

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

YURI JOSÉ FERNANDES COSTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIADERENTE DO
ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

PATOS-PB

2023

YURI JOSÉ FERNANDES COSTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIADERENTE DO
ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

PATOS-PB

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SISTEMOTECA/UFMG

C837a

Costa, Yuri José Fernandes

Avaliação do potencial antibacteriano e antiaderente do óleo essencial da *Citrus sinensis* contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* / Yuri José Fernandes Costa. – Patos, 2023.

43 f.

Orientador: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Odontologia.

1. Fitoterapia. 2. Microbiologia. 3. Odontologia. I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de, *orient.* II. Título.

CDU 616.314:1:665.52

Bibliotecário-documentalista: Bárbara Costa – CRB-15/806

YURI JOSÉ FERNANDES COSTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIADERENTE DO
ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado à Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade Federal de Campina
Grande, como parte dos requisitos para obtenção
do título Bacharel em Odontologia.

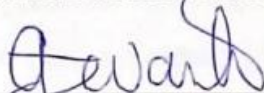
Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira
Filho.

Aprovado em: 17/05/23

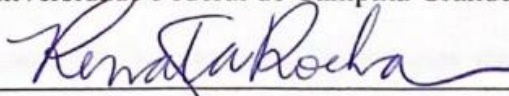
BANCA EXAMINADORA



Prof.º Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal De Campina Grande – UFCG



Prof.ª Dr. George João Ferreira do Nascimento – 1º membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Prof.ª Dra. Renata Andrea Salvitti de Sá Rocha – 2º membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e ao Nosso Senhor Jesus Cristo, seu único filho, pois sem Eles eu não teria chegado até aqui e enfrentado os obstáculos apresentados na minha trajetória. Quando achei que não havia mais solução para os problemas que surgiam, quando achei que tinha fracassado ou até mesmo quando duvidei de mim mesmo me perguntando se era realmente isso o que eu queria para minha vida depois de um dia cansativo, o Senhor me acolheu, me levantou, me deu forças e me mostrou o caminho para que pudesse seguir em frente. Deixo aqui minha eterna gratidão e devoção.

Agradeço a toda minha família, que é o meu alicerce e me ajudou de todas as formas possíveis, seja financeiramente, com uma palavra de amor, de carinho, conforto e de motivação. Aos meus pais, avós, tios e tias, primos, saibam que todos agregam uma parcela nessa conquista.

À Antônia Elenilda Costa Fernandes, minha mãezinha, não sei expressar o tamanho do meu amor e gratidão por tudo que já fez e faz por mim. A senhora foi a pessoa que mais acreditou nos meus sonhos e me apoiou nas minhas decisões, buscando sempre o melhor com seus conselhos. Saiba que sem estes, sem as lições que me dava e sem teu amor, não seria metade do homem que sou hoje. Vejo na senhora sinônimos de Força, Mulher Guerreira e Determinação, um exemplo de ser humano a ser seguido, pois jamais vi alguém com um coração tão grande igual ao teu. Lembra de quando veio me deixar em Patos? Chorando falei para senhora que eu faria todo esforço valer a pena? Me esforcei muito para isso e espero que esteja conseguindo. Suas ligações diárias e preocupação comigo eram bastante importantes, as palavras de apoio quando te ligava angustiado, desabafando sobre o dia-a-dia, no qual muitas vezes com uma única frase a senhora me confortava: “Não se preocupe, meu filho, tudo é no tempo de Deus”. Obrigado, minha mainha, por nunca ter medido esforços para me ver feliz e batalhar para que eu pudesse realizar meu sonho. Amo a senhora indescritivelmente e sou eternamente grato por todas as coisas.

Ao meu pai, Antônio Fernandes de Brito, um homem simples, íntegro, agricultor que batalhou muito na vida e desde cedo me incentivou a buscar o caminho da educação, me criando com honestidade, ensinando o certo e o errado e a virtude de ajudar o próximo. Com poucas palavras, mas grandiosos gestos, mostra o amor e cuidado que tens por mim. Saiba que o amo muito e busco sempre o melhor para te orgulhar.

Aos meus avós paternos Francisco Fernandes (em memória) e Antônia Dias (em memória) e avós maternos, Manoel Bento (em memória) e Maria Basília, por todos os

conselhos, cuidado e amor dados a minha pessoa. Em especial, a minha vovó Maria Basília, um dos maiores exemplos de mulher batalhadora que já vi, conseguiu criar seus três filhos em tempos difíceis, sempre mostrando que o estudo era a melhor opção, conseguindo formar duas professoras com muito trabalho árduo e determinação, como a mesma me conta sempre que estou por casa em sua companhia. Amo escutar todas as suas histórias e o carinho que tem por mim, expresso muitas vezes em um simples: “Meu filho não vai comer, não? Já jantou? Sempre rezo por você, para que Deus guie seu caminho”. Espero dar como presente a senhora, o tão sonhado diploma que a senhora se preocupa tanto em “alcançar” com vida a minha jornada, como a senhora fala. A senhora estará eternamente em meu coração.

Às minhas tias Apolônia Elieth e Raimunda Fernandes, as quais sempre me incentivaram a ir em busca do meu sonho e me deram total apoio durante toda essa caminhada acadêmica. Por tudo que fizeram ao seu alcance para me ajudar nesses longos anos morando aqui, pelos conselhos, pelas visitas e por todo amor.

À minha namorada Millena Fernandes, que além de companheira é confidente, melhor amiga e mãe de Mel, nosso amor fora do peito de quatro patas. Sou grato por sempre ter me tirado as melhores gargalhadas, ter me apoiado e deixado os meus dias mais leves, mesmo quando a saudade impedida pela distância deixava o coração apertado. Por sempre demonstrar genuinamente o quanto me ama e estar presente em todos os momentos da minha vida, seja nos piores ou nos melhores, afinal, como a gente diz “somos carne e unha!” e juntos podemos enfrentar qualquer batalha, assim como festejar nossas vitórias. A amo imensamente!

Aos meus amigos Roberto Jerônimo e Éverton Figueiredo, com quem tive a felicidade de dividir moradia por mais de 3 anos, nos ajudando da forma que podia, fosse num simples ato de pegar uma quentinha na hora do almoço, dividir o dia a dia do curso, tomar um café da tarde com uma boa conversa, dentre outros bons momentos ao longo desse tempo. Vocês, sem dúvida, tornaram essa caminhada mais leve.

À Viton Dyrk, Paulo Guilherme e Ângelo Moura, grandes amigos que a universidade me proporcionou e quero levar pro resto da vida. Viton, minha dupla de graduação desde o 1º período formada através de uma amizade que deu muito certo, tanto dentro quanto fora da clínica. Paulo Guilherme, também potiguar, foi a primeira pessoa com quem assisti um jogo de futebol ao chegar em Patos, onde surgiu uma grande amizade. Ângelo Moura, quem tive a honra de dividir apartamento, é a pessoa de coração mais puro e inocente que vi em toda vida, que me

tira muitas risadas mesmo após um dia cansativo quando sentamos para tomar café. Agradeço a todos por todos os momentos divididos e espero levar a amizade de vocês para o resto da vida.

À Ruberdson Pinheiro, Áleffe, Josilany e Jayne Oliveira, vocês ajudaram muito nessa longa trajetória. Ruberdson com seu jeito fechado, sério e teimoso, nunca imaginei que desenvolveria uma amizade tão grande a ponto de se tornar meu melhor amigo em Patos. Obrigado por todas as aventuras vividas, conhecimento dividido e momentos compartilhados, guardarei cada um em minha memória. Josilany, uma das pessoas mais inteligentes que já conheci, me socorreu muitas vezes nas minhas dúvidas repentinas, quando estava fazendo algo e não estava entendendo tal coisa, sabia a quem procurar. Jayne, uma pessoa determinada e encantadora que cativa todos ao seu redor, tive o prazer de partilhar bons momentos, desabafos, trocas de conselhos, dentre várias outras alegrias. Áleffe, um grande amigo que me ajudou muito em várias fases do curso. Tenho certeza que serão grandes profissionais. A vocês, toda a minha admiração, carinho e gratidão.

A minha turma XVIII, onde consegui me sentir acolhido de uma forma como nunca senti em outra, sempre consegui me dar bem com todos os colegas e arrancar um pouco de sorriso de cada um. Não tenho dúvidas que serão excelentes profissionais.

Ao meu professor e orientador Abrahão Alves de Oliveira Filho, por ter acreditado em mim e proporcionar a oportunidade de desenvolver trabalhos acadêmicos. Acredito que Deus abençoa pessoas com dons, e o do senhor é o de lecionar, com uma didática impecável que faz com que os alunos absorvam os conteúdos de uma forma leve e clara, como foi meu caso nas disciplinas de bioquímica e fitoterapia, a qual me despertou interesse na área quando as paguei. É uma das pessoas mais pontuais, organizadas e comprometidas que já vi, sem dúvidas tens amor pela profissão que escolheu. Deixo aqui minha gratidão por todos os ensinamentos repassados, paciência e orientações ao longo do curso, sem esquecer da oportunidade de fazer parte da Liga Acadêmica de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), onde pude aprender, desenvolver e apresentar experimentos, além de trabalhos científicos.

À professora Renata Andrea Salvitti de Sá Rocha, uma profissional extremamente capacitada, empenhada, que cumpre com maestria e amor o seu trabalho. Tive a oportunidade de ser seu monitor na disciplina de Psicologia Aplicada a Odontologia por dois períodos e pude acompanhar de perto a alegria expressada em suas boas risadas e leveza em transmitir conhecimento para seus alunos, sobretudo aqueles que estão acabando de ingressar no curso.

Obrigado por ser essa professora tão acessível e que torna a sala de aula/clínicas um ambiente alegre e de boas energias.

Aos professores George Nascimento, Cyntia Helena e Leorik Pereira, professores da graduação que nos acompanham desde as disciplinas teóricas até às clínicas, os quais também compõem o corpo docente da Liga Acadêmica de Diagnóstico Oral (LADO), um projeto de extrema relevância social para a sociedade, o qual tenho orgulho em fazer parte. Professor George com seu jeito extrovertido, acaba tirando muitas risadas dos seus alunos e quebrando um pouco da tensão entre aluno/paciente, mas também nos ensina desde os primeiros períodos buscar nos tornar profissionais humanos com nossos pacientes. Professora Cyntia e Professor Leorik, ambos com seus perfis mais sérios, cobram que seus alunos estudem, para chegar na clínica preparados, o que sempre funciona e prepara a gente não só para parte prática, mas também para vida profissional. Meu muito obrigado por cada ensinamento e experiências acadêmicas. Deixo aqui minha admiração e apreço por todos.

Ao professor Julierme Ferreira, por ter acreditado, confiado e me dado a oportunidade de fazer parte da Liga Acadêmica de Cirurgia (LAC), projeto de extensão numa área deslumbrante e que sempre tive desejo de participar. Expressa sempre sua paixão pela arte de lecionar, o que acaba despertando grande admiração de todos seus alunos e inspiração para muitos.

Agradeço também aos demais professores que compõem o corpo docente do curso de odontologia da UFCG que tive o prazer de ser aluno. Em especial a professora Elizandra Penha, a qual foi minha supervisora na disciplina de Infantil II e tive a honra de aprender sob seus ensinamentos, compartilhar boas risadas, além de bons momentos de descontração. Tássia Pinto e Rosana Rosendo, que dominam a área da endodontia e me despertaram o interesse pela especialidade. Minha gratidão por ter contribuído tanto ao longo da graduação.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Campina Grande – CSTR e todo corpo de funcionários que compõem a instituição, em especial aos da Clínica Escola de Odontologia da UFCG. Sobretudo, Damião, porteiro da central de aulas 02, um ser humano carismático e adorador por todos, a quem tenho muito respeito e admiração.

RESUMO

Grande parte das infecções odontológicas ocorrem por meio de contaminação cruzada. A *P. aeruginosa*, é uma bactéria que tem a umidade favorável ao seu desenvolvimento, seja através da água presente nos sistemas odontológicos, aparelhos utilizados nos procedimentos, assim como tubulações que estão ligadas à cadeira odontológica, podendo alcançar desta forma a cavidade oral. Sendo assim, devido à resistência bacteriana desta espécie desenvolvida frente a antimicrobianos e soluções desinfetantes, buscam-se novos meios para combater com eficácia esses patógenos, em especial, os produtos naturais. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antiaderente do óleo essencial da *Citrus sinensis* contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram realizados os ensaios em duplicata com placa de 96 orifícios, empregando as técnicas de microdiluição para determinação do potencial antibacteriano por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da atividade bactericida por meio da Concentração Bactericida Mínima (CBM), por fim, a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), por meio da técnica de tubos inclinados em 30°, na presença de 5% de sacarose. Com isso, o óleo essencial da *Citrus sinensis* obteve uma CIM de 1000 ug/mL contra as linhagens de *P. aeruginosa* (PA104 e PA109) e CBM de 1000 mg/mL e >1000 ug/mL para as cepas PA104 e PA109, respectivamente. A CIMA do óleo essencial contra as cepas em estudo não foi capaz de inibir a aderência ao tubo, quando comparada com a CIMA de 1:4 pelo Digluconato de Clorexidina a 0,12% (controle positivo da pesquisa). Desta forma, conclui-se que o óleo essencial da Laranja apresentou moderada atividade antimicrobiana, para ambas estirpes testadas, se mostrou bactericida para a cepa PA104 e bacteriostático para a cepa PA109, contudo não apresentou ação antiaderente para a cepa de *P. aeruginosa* em estudo, na metodologia utilizada.

Palavras-chave: Fitoterapia, Microbiologia, Odontologia.

ABSTRACT

Most dental infections occur through cross-contamination. *P. aeruginosa* is a bacterium that has humidity favorable to its development, either through the water present in dental systems, devices used in procedures, as well as pipes that are connected to the dental chair, thus being able to reach the oral cavity. Therefore, due to the bacterial resistance of this species developed against antimicrobials and disinfectant solutions, new means are sought to effectively combat these pathogens, in particular, natural products. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial and antiadherent activity of *Citrus sinensis* essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Assays were performed in duplicate with a 96-hole plate, using microdilution techniques to determine the antibacterial potential through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the bactericidal activity through the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), finally, the Concentration Minimum Inhibitory Adherence (MIAC), using the 30° inclined tube technique, in the presence of 5% sucrose. Thus, the essential oil of *Citrus sinensis* obtained a MIC of 1000 ug/mL against *P. aeruginosa* strains (PA104 and PA109) and CBM of 1000 mg/mL and >1000 ug/mL for strains PA104 and PA109, respectively. The CIMA of the essential oil against the strains under study was not able to inhibit adherence to the tube, when compared with the CIMA of 1:4 for the 0.12% Chlorhexidine Digluconate (positive control of the research). Thus, it is concluded that the essential oil of Orange showed moderate antimicrobial activity for both strains tested, it was bactericidal for strain PA104 and bacteriostatic for strain PA109, however it did not show antiadherent action for the strain of *P. aeruginosa* under study, in the methodology used.

Key Words: Phytotherapy, Microbiology, Dentistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> contra cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> contra cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> e Digluconato de Clorexidina 0,12 % contra a cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA104)	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH – Ágar Mueller-Hinton

C. albicans – *Candida albicans*

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIMA – Concentração Inibitória Mínima de Aderência

C. lemon – *Citrus lemon*

C. sinensis – *Citrus sinensis*

CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural

DMSO – Dimetilsulfóxido

E. coli - *Escherichia coli*

mL – Mililitro

MO – Microrganismo

OE – Óleo Essencial

OEs – Óleos Essenciais

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

p/v – Peso por volume

S. sanguinis - *Streptococcus sanguinis*

S. oralis - *Streptococcus oralis*

S. mitis – *Strptococcus mitis*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

µg – Micrograma

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

μm – Micrômetro

v/v – Volume de soluto / volume de solução

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Biofilme Bucal.....	16
2.2 <i>Citrus sinensis</i>	19
REFERÊNCIAS.....	22
3 ARTIGO.....	26
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
ANEXO A - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA	33

1 INTRODUÇÃO

Um vasto número de bactérias compõe a microbiota da cavidade oral, encontradas nos tecidos moles e duros da boca. Quando há uma disbiose do meio bucal, pode ocorrer uma infecção local ou até sistêmica a depender do procedimento odontológico (ANDRADE *et al.*, 2011). Um conjunto bem organizado de microrganismos forma o que se conhece como biofilme, aderido aos tecidos bucais por uma matriz de polissacarídeos (TEIXEIRA; BUENO; CORTÊS, 2010).

Bactérias colonizadoras iniciais da película aderida servem como meio de atração e adesão para outras bactérias tardias. Após passar por processo de maturação, o biofilme sofre uma mudança, onde bactérias gram-positivas aeróbicas são substituídas por gram-negativas anaeróbicas mais propensas ao desenvolvimento de doenças (gengivite ou até mesmo periodontite, por exemplo), como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis ssp*, *Treponnema ssp*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (BRASIL, 2017).

De acordo com FREITAS; SAND; SIMONETTI (2010) a umidade favorece o crescimento do biofilme por bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, ressaltando a capacidade da *P. aeruginosa* de crescer facilmente diante da presença de água em sistemas odontológicos.

Nos procedimentos odontológicos, os aparelhos utilizados podem aspirar patógenos para dentro das tubulações e neste local abrigar-se uma colônia de bactérias, fungos ou protozoários. Sendo assim, a água que provém e faz o percurso por essas superfícies também leva consigo estes microorganismos até a boca do paciente, assim como o aerossol produzido pelas canetas de alta rotação, que em conjunto, aumentam o risco de infecção cruzada para a equipe profissional e quem frequenta o ambiente (XAVIER; SILVA; JÁCOME-JÚNIOR, 2013).

Barbosa *et. al* (2010), mostra em seu estudo através do Lavado Broncoalveolar (LBA), hemocultura e secreção traqueal que a *Pseudomonas aeruginosa* está presente em pacientes com pneumonia nosocomial. Embora bactérias gram-negativas não sejam comuns da microbiota oral, quando há um desequilíbrio do meio bucal devido ao aumento do biofilme e a doença periodontal, elas se fazem presentes, trazendo grande risco para infecções sistêmicas.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam resistência pela produção de b-lactamases, no caso dos b-lactâmicos e pode também estar ligada ao fato de desenvolver uma

barreira impermeável (GUZMÁN-BLANCO; CASELLAS; SADER, 2000). Muito se discute sobre o uso de forma irracional e recreativa dos medicamentos farmacêuticos pela população, o que ocasiona um grau de resistência bacteriana aos antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções por diversas espécies de bactérias. Contrapondo a isso, buscam-se novas alternativas terapêuticas como forma de tratamento, um exemplo é a fitoterapia (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

A fitoterapia é conhecida por encontrar finalidades terapêuticas no efeito farmacológico das plantas (DE MELO ALELUIA *et al.*, 2015). Antigamente a população carente era quem mais utilizava dos meios das plantas medicinais como opção terapêutica, já que é mais acessível financeiramente e até mesmo pelo fato do cultivo e colheita de algumas espécies que geralmente temos em nossa própria casa (BOHNEBERGER *et al.*, 2019). Sendo assim, diante do crescente número de estudos no mundo acerca da fitoterapia, produtos naturais à base de plantas vêm sendo pesquisados como alternativa terapêutica na odontologia com ação antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica, anestésica e até no controle de ansiedade (EVANGELISTA, S. S. *et al.*, 2013).

Um produto natural bastante estudado é o óleo essencial da laranja (*Citrus sinensis*) que se trata de uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, o qual é oxidado à presença de luz, ar e umidade, composto em sua maior parte por R-limoneno (composto orgânico da família dos terpenos) que juntamente com o citruleno são responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais do gênero *Citrus* (HEBERLE *et al.*, 2016).

DO NASCIMENTO; LOPES; QUEIROZ (2018) comprovaram em suas análises que o óleo da laranja doce apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias participantes do estudo, sendo o óleo com os maiores halos de inibição entre os outros óleos essenciais, inclusive contra a *P. aeruginosa* (bactéria gram-negativa), no entanto, são necessários mais estudos utilizando outras metodologias para detalhar esse efeito antibacteriano do óleo essencial contra cepas de *P. aeruginosa*.

Sendo assim, deve-se buscar a possibilidade de novas alternativas em soluções antissépticas e terapêuticas, explorando as atividades biológicas do extrato natural da laranja. Esse trabalho, tem como objetivo geral avaliar a ação antibacteriana e antiaderente do óleo essencial da *Citrus sinensis* frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com objetivos específicos: determinar a Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e

Concentração Inibitória Mínima de Aderência do óleo essencial da *Citrus sinensis* contra espécies de *Pseudomonas aeruginosa*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biofilme Bucal

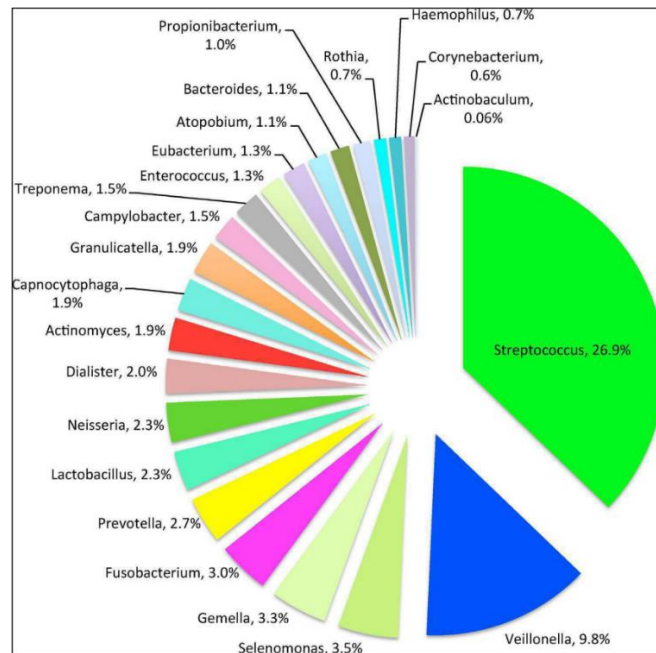
Bactérias são microrganismos procariontes com núcleo espalhado no citoplasma que vivem isoladas ou em conjunto (colônias) (TEIXEIRA, 2020). As células procarióticas são bastante pequenas quando comparadas às eucarióticas e possuem várias formas, que permitem distinguir os tipos de bactérias, sendo importantes ecologicamente (MADIGAN *et al.*, 2016). Esses microrganismos podem variar de 1 a 10 μm , e as formas dessas células bacterianas são classificadas em: cocos, bacilos, espirilos, espiroquetas e vibriões (NOGUEIRA; FILHO, 2015).

Os microrganismos são classificados de acordo com o grau de nocividade ao hospedeiro, assim como sua produtividade a este. Sendo assim, podem ser comensais (não prejudicial) e patogênicos (prejudiciais) (TEIXEIRA, 2020). As bactérias em colônias que se aderem a estrutura dentária forma o que é chamado de biofilme bucal, estudado na medicina e principalmente, na odontologia. Este se adapta a diferentes condições de estresse ambiental, se caracterizando como um tecido organizado (GRANER, *et al.*, 2005).

Aproximadamente cerca de 1000 espécies de bactérias são encontradas no biofilme, onde metade pode ser cultivada, chegando até 10^{11} UFC/mL⁻¹ (Figura 1). A placa bacteriana inicial surge como microcolônias periféricas de cocos e bacilos gram-positivos divididos e uma região central com a presença de várias bactérias como *S.sanguinis*, *S.oralis* e *S. mitis*, as quais juntas compreendem aproximadamente 80% das espécies cultiváveis. Durante o desenvolvimento do biofilme dental, as condições ambientais podem se alterar, propiciando a colonização de bactérias tardias, que são mais agressivas e em sua maioria estritamente anaeróbicas, causando o processo de sucessão bacteriana (WOJCIK, 2009).

A película adquirida, caracterizada por uma camada de lipídeos, proteínas, fluido do sulco gengival, glicoproteínas salivares e fosfoproteínas, desempenha importante papel na adesão das bactérias à estrutura dental. A não desorganização desse biofilme, permite a evolução deste de acordo com o crescimento em tamanho e complexidade (CASAIS, *et al.*, 2013).

Figura 1: Proporções das bactérias presentes na cavidade bucal humana



Fonte: COSTALONGA; HERZBERG, 2014.

Posteriormente à adesão dos colonizadores iniciais, ocorre a proliferação dessas bactérias e adesão de outras células por meio dos receptores de ligação, que são as adesinas e selectinas, os quais permitem a agregação à outros tipos de microrganismos. A *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* se destacam no processo cariogênico, enquanto no processo patogênico dos tecidos periodontais a atenção é voltada para a *Fusobacterium nucleatum* e a *Porphyromonas gingivalis* (SILVA, 2016).

A total limpeza dos canais radiculares em tratamento endodôntico é um grande desafio, e o insucesso nesta etapa abre portas para a recolonização por microrganismos distintos, sendo comum a presença da *P. aeruginosa*, caracterizado como um patógeno humano comumente encontrado em infecções nosocomiais. Trata-se de um bacilo gram-negativo, facilmente reconhecido pelas suas propriedades morfológicas especiais (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

Pacientes internados, com cirurgias invasivas ou imunossuprimidos ficam expostos a patógenos oportunistas como a *P. aeruginosa*, encontrada com facilidade em ambientes que tem a presença de água e presente em diversas infecções, como: Pneumonia por Ventilação Mecânica, infecções devido a queimaduras ou úlceras, além de infecções ósseas (GAJDÁCS, *et al.*, 2021).

Segundo Colombo *et al.* (2016), a presença de muitos fatores ecológicos diferentes no ecossistema oral pode criar condições ideais para a colonização de microrganismos que geralmente não são considerados habitantes da microbiota oral normal. Ela mostra em seu estudo, que enterobactérias gram-negativas e *Pseudomonas ssp.* foram encontradas com alta frequência em vários sítios da cavidade bucal, incluindo biofilme oral e mucosa. Essas espécies oportunistas podem ser encontradas em proporções maiores em pessoas com doença periodontal e/ou resposta imune do que em pacientes imunocompetentes e/ou periodontais saudáveis. Por exemplo, *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram encontrados na cavidade oral em 68,4%, 43,7% e 57,1% dos idosos após tratamento de câncer oral primário.

A água desempenha um papel muito importante nos procedimentos realizados pelos dentistas, pois permite o resfriamento e enxágue de canetas e outros aparelhos odontológicos, além das estruturas dentárias, evitando superaquecimento e removendo impurezas do meio bucal (DE MEDEIROS AMANCIO *et al.*, 2020). Confirmando o potencial de desenvolvimento da *P. aeruginosa* em meio aquático XAVIER; SILVA; JÁCOME-JÚNIOR (2013), em seu trabalho que avaliou amostras de água utilizadas em equipamentos odontológicos, constataram presença de *Pseudomonas aeruginosa* em 30% nos reservatórios de água e 70% na seringa tríplice.

A bacteremia por bactérias gram-negativas é uma das causas da pneumonia nosocomial e estes microrganismos podem chegar até o trato respiratório por meio de microaspiração de secreções estabelecidas por eles, presentes na cavidade oral ou faringe (BARBOSA *et al.*, 2010).

De acordo com PIRES *et al.* (2009), a *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista por natureza, e os pacientes hospitalizados não são apenas debilitados por sua condição, também por fatores hospitalares, como ventilação mecânica, medicamentos e ao próprio estado mental da internação. Desta forma, essa bactéria difunde-se facilmente em meio hospitalar, com resistência a desinfetantes químicos e antissépticos que tem em sua composição amônio, fenol e hexaclorofeno, além da resistência aos antimicrobianos, evidenciando-se a necessidade de mais estudos para buscar alternativas terapêuticas para combater a formação de biofilme e possíveis infecções através deste, como produtos naturais à base de plantas medicinais.

2.2 *Citrus sinensis*

O gênero *Citrus* é um importante gênero do reino vegetal. A *Citrus sinensis*, conhecida popularmente como laranja doce, é nativa da Ásia, porém encontra-se por todo o Pacífico e áreas de elevadas temperaturas no mundo inteiro. A árvore possui uma floração duradoura, atingindo de 9 a 10 metros de altura com folhas que exalam um odor cítrico característico devido à grande quantidade de óleo presente (FAVELA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016) (Figura 2). Faz parte da família Rutaceae e seu óleo essencial pode ser encontrado em cascas, folhas e flores da planta. É amplamente utilizado com diversos fins, desde fragrâncias, sabores, até a medicina, com potencial anticancerígeno, relaxamento psicológico, controle de ansiedade, atividade antioxidante, dentre outras (KAMMOUN; ALTYAR; GAD, 2021).

Figura 2: Árvore da *Citrus sinensis*



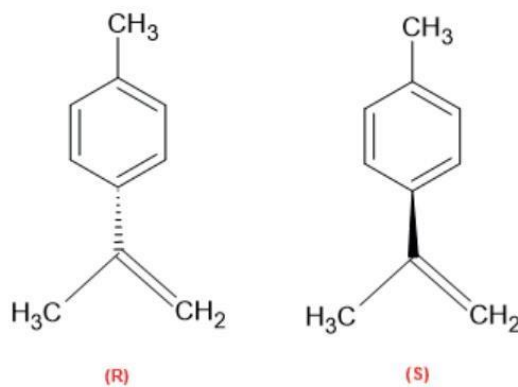
Fonte: google imagens

O óleo essencial da *Citrus sinensis* possui vários componentes como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres e aldeídos. Os óleos cítricos em si são constituídos por cerca de 70% a 95% de hidrocarbonetos monoterpênicos, tendo o d-limoneno como principal em todos os óleos de laranja doce já estudados. Além disso, as frutas cítricas são bastante ricas de vitamina C, compostos fenólicos e minerais que reduzem o acúmulo de gordura, melhorando o funcionamento hepático, além de produzir atividade antioxidante (GERACI *et al.*, 2016).

O limoneno, principal componente encontrado no OE da laranja é formado pelo 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno. Os etanômeros são formados pelos monoterpênicos, que se divide em L-Limoneno (presente nas plantas e ervas) e D-Limoneno (comum nas cascas de limão e laranja) (Figura 3), sendo o D-limoneno a forma mais comum (DE ANDRADE *et al.*, 2022).

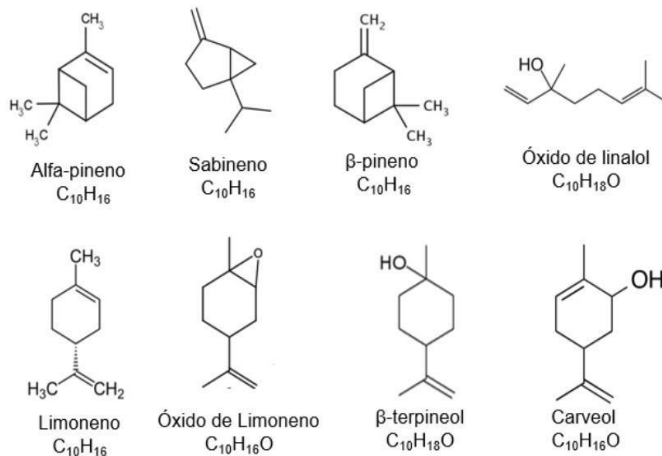
Outros compostos do OE são α -pineno, sabineno, β -pineno, óxido de linalol, limoneno, Óxido de limoneno, beta terpineol e carveol (SILVA, 2021) (Figura 4). Ainda no gênero *Citrus*, acredita-se que a presença de terpenos, flavonoides, carotenos e cumarinas seja responsável por suas fortes propriedades antioxidantes e antibacterianas, sendo constatado que o OE de laranja doce inibe o crescimento de várias bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (DOSOKY; SETZER, 2018).

Figura 3: Fórmula do D-Limoneno e L-Limoneno



Fonte: DE ANDRADE *et. al.*, 2022.

Figura 4: Estruturas químicas dos constituintes do OE da *C. sinensis*



Fonte: SILVA, 2021

Em seu trabalho, MACHADO (2011) analisou a ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana utilizando diversos tipos de OEs, dentre eles o da Laranja contra cepas clínicas humanas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apesar do OE da laranja

em sua concentração máxima não apresentar atividade antibacteriana contra a *Pseudomonas aeruginosa*, que é uma bactéria bastante resistente, capaz de produzir pigmentos hidrossolúveis e se desenvolver em ambientes hospitalares, apresentou atividade inibitória por meio da CIM, de 16,5 para *S. aureus*, patógeno gram-positivo também presente em ambientes hospitalares.

CAMÕES *et al.* (2010) em seu trabalho comparou o óleo essencial da laranja (Figura 5) e do eucalipto como solventes desobturadores, não havendo diferença relevante entre os dois, mas concluindo que ambos apresentaram bons resultados, com eficácia no amolecimento e remoção do material obturador. Diante disso, sabendo que os solventes orgânicos xilol e clorofórmio podem atuar como depressores do sistema cardiovascular, neurotóxicos, cancerígenos e até poluentes ambientais, surge uma alternativa destes solventes (óleo da laranja e eucalipto) como auxiliares para desobturação de canais radiculares na rotina clínica.

A atividade antibacteriana *in vitro* vem sendo bastante estudada contra os mais variados tipos de bactérias, mas a chegada de novos MO multirresistentes significa uma grande dificuldade no controle de infecções. Sendo assim, são necessários mais experimentos com métodos diferentes buscando novas substâncias com propriedades antibacterianas como forma de combate a estas bactérias (MACHADO, 2011).

Figura 5: Solvente desobturador à base de óleo essencial da laranja



Fonte: google imagens

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Igor Pena *et al.* Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microorganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 13, n. 3, 2011.
- BARBOSA, Jamille Cristina de Souza *et al.* Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, p. 201-206, 2010.
- BOHNEBERGER, Gabriela *et al.* Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los?. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3504-3517, 2019.
- BRASIL, Laila de Oliveira. Medicina Periodontal na Atualidade. **Monografia]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, 2017.
- CAMÕES, Izabel Coelho Gomes. Comparação entre os solventes: óleo de laranja e eucalipto no retratamento de canais radiculares. **Revista fluminense de odontologia**, 2010.
- CASAI, Paula Milena Melo *et al.* Placa bacteriana dental como um biofilme. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, v. 43, n. 1, p. 61-66, 2013.
- COLOMBO, Ana Paula Vieira *et al.* Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial pathogenesis**, v. 94, p. 27-34, 2016.
- COSTALONGA, Massimo; HERZBERG, Mark C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunology letters**, v. 162, n. 2, p. 22-38, 2014.
- DE ANDRADE, Michelle Félix *et al.* Óleos essenciais de alecrim-pimenta, laranja e cravo da Índia como aditivos naturais antimicrobianos: uma revisão narrativa. 2022.
- DE MEDEIROS AMANCIO, Amanda *et al.* Análise microbiológica da água de equipamentos odontológicos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e23996818-e23996818, 2020.

DE MELO ALELUIA, Camila *et al.* Fitoterápicos na odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 27, n. 2, p. 126-134, 2015.

DO NASCIMENTO, Nathalia Lauria; LOPES, Paula Silva; QUEIROZ, Paulo Roberto Martins. EXTRATOS VEGETAIS COM CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO. **Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa**, v. 3, n. 1, 2017.

DOSOKY, Noura S.; SETZER, William N. Biological activities and safety of *Citrus spp.* essential oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1966, 2018.

EVANGELISTA, S. S. *et al.* Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 513-519, 2013.

FAVELA-HERNÁNDEZ, Juan Manuel J. *et al.* Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 247, 2016.

FREITAS, Valdionir da Rosa; SAND, Sueli Teresinha van der; SIMONETTI, Amauri Braga. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, p. 193-200, 2010.

GAJDÁCS, Márió *et al.* No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1134, 2021.

GERACI, Anna *et al.* Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. **Natural product research**, v. 31, n. 6, p. 653-659, 2017.

GRANER, Renata O. Mattos *et al.* Disciplina: Pré-Clínica II (DP-201) Aspectos microbiológicos da placa dental.

GUZMÁN-BLANCO, Manuel; CASELLAS, José María; SADER, Helio Silva. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America: The giant is awakening. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 67-81, 2000.

Heberle, T., *et al.* "Atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja." In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25.; CIGR SESSION 6 INTERNATIONAL TECHNICAL SYMPOSIUM, 10., 2016, Gramado. Alimentação: árvore que sustenta a vida. Anais... Gramado: SBCTA Regional, 2016.

- KAMMOUN, Ahmed K.; ALTYAR, Ahmed E.; GAD, Haidy A. Comparative metabolic study of *Citrus sinensis* leaves cultivars based on GC–MS and their cytotoxic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 113991, 2021.
- MACHADO, Bruna Fernanda Murbach Teles. Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana. 2011.
- MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
- NOGUEIRA, Alexandre Verzani *et al.* **Microbiologia**. UFSC, 2015.
- OLIVEIRA, Flávia *et al.* Avaliação da eficácia de distintas preparações de hidróxido de cálcio sobre *Pseudomonas aeruginosa*. **Hospital Universitário**, v. 40, n. 1/2, p. 49-53, 2014.
- PIRES, Eduardo José Valença Cordeiro *et al.* Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.
- SILVA, Bruno Rocha da. Atividade antimicrobiana e antibiofilme do peptídeo kr-12 e seu análogo [w7] kr12-kaek contra bactérias relacionadas à patologias orais. 2016.
- SILVA, Kimberly Stefanny da *et al.* Composição química, avaliação antidepressiva e antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce). 2021.
- TEIXEIRA, D. A. Microbiologia Básica. **Teófilo Otoni: Núcleo de Investigação Científica (NICE)**, 2020.
- TEIXEIRA, Karina Imaculada Rosa; BUENO, Audrey Cristina; CORTÉS, Maria Esperanza. Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie. **Quim. nova esc**, v. 32, n. 3, p. 145-50, 2010.
- TOMAZZONI, Marisa Ines; NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato; CENTA, Maria de Lourdes. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, p. 115-121, 2006.
- WOJCIK, Leandro Roberto. Caracterização do biofilme dental formado in situ em presença de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio.
- XAVIER, Geyziane Maiara Silva; SILVA, F. C. E.; JÁCOME JÚNIOR, Agenor Tavares. Avaliação de indicadores higiênico-sanitários em águas utilizadas em equipamentos

odontológicos. **Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Biomedicina, Universidade Católica de Pernambuco, 2013.**

Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antiaderente do Óleo Essencial da *Citrus sinensis* Contra Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Yuri José Fernandes Costa, Abrahão Alves de Oliveira Filho

ABSTRACT

Grande parte das infecções odontológicas ocorrem por meio de contaminação cruzada. A *P. aeruginosa* é uma bactéria que tem a umidade favorável ao seu desenvolvimento, seja através da água presente nos sistemas odontológicos, aparelhos utilizados nos procedimentos, assim como tubulações que estão ligadas à cadeira odontológica, podendo alcançar desta forma a cavidade oral. Sendo assim, devido à resistência bacteriana desta espécie desenvolvida frente a antimicrobianos e soluções desinfetantes, buscam-se novos meios para combater com eficácia esses patógenos, em especial, os produtos naturais. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antiaderente do óleo essencial da *Citrus sinensis* contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram realizados os ensaios em duplicata com placa de 96 orifícios, empregando as técnicas de microdiluição para determinação do potencial antibacteriano por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da atividade bactericida por meio da Concentração Bactericida Mínima (CBM), por fim, a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), por meio da técnica de tubos inclinados em 30°, na presença de 5% de sacarose. Com isso, o óleo essencial da *Citrus sinensis* obteve uma CIM de 1000 µg/mL contra as linhagens de *P. aeruginosa* (PA104 e PA109) e CBM de 1000 mg/mL e >1000 µg/mL para as cepas PA104 e PA109, respectivamente. A CIMA do óleo essencial contra as cepas em estudo não foi capaz de inibir a aderência ao tubo, quando comparada com a CIMA de 1:4 pelo Digluconato de Clorexidina a 0,12% (controle positivo da pesquisa). Desta forma, conclui-se que o óleo essencial da Laranja apresentou moderada atividade antimicrobiana, para ambas estirpes testadas, se mostrou bactericida para a cepa PA104 e bacteriostático para a cepa PA109, contudo não apresentou ação antiaderente para a cepa de *P. aeruginosa* em estudo, na metodologia utilizada.

Palavras-chave: Fitoterapia, Microbiologia, Odontologia.

Submitted :

Published :

ISSN: 2593-8339

DOI: 10.24018/ejmed.YEAR.Vol.Issue.ID

Y.J.F, Costa*

Laboratório de Microbiologia, Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.
(e-mail: yurij738@gmail.com)

A.A.D.O, Filho

Laboratório de Microbiologia, Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.

(e-mail: abrahão.

alves@professor.ufcg.edu.br)

*Yuri José Fernandes Costa

I. INTRODUÇÃO

Um vasto número de bactérias compõe a microbiota da cavidade oral, encontradas nos tecidos moles e duros da boca. Quando há uma disbiose do meio bucal, pode ocorrer uma infecção local ou até sistêmica a depender da veracidade do procedimento odontológico [1]. Um conjunto bem organizado de microrganismos forma o que se conhece como biofilme, aderido aos tecidos bucais por uma matriz de polissacarídeos [2].

Bactérias colonizadoras iniciais da película aderida servem como meio de atração e adesão para outras bactérias tardias. Após passar por processo de maturação, o biofilme sofre uma

mudança, onde bactérias gram-positivas aeróbicas são substituídas por gram-negativas anaeróbicas mais propensas ao desenvolvimento de doenças (gingivite ou até mesmo periodontite, por exemplo), como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* ssp, *Treponnema* ssp, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [3].

De acordo com Da Rosa Freitas; Van Der Sand e Simonetti [4] a umidade favorece o crescimento do biofilme por bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, ressaltando a capacidade da *P. aeruginosa* de crescer facilmente diante da presença de água em sistemas odontológicos.

Nos procedimentos odontológicos, os aparelhos utilizados podem aspirar patógenos para dentro das tubulações e neste local abrigar-se uma colônia de bactérias, fungos ou protozoários. Sendo assim, a água que provém e faz o percurso por essas superfícies também leva consigo estes microrganismos até a boca do paciente, assim como o aerossol produzido pelas canetas de alta rotação, que em conjunto, aumentam o risco de infecção cruzada para a equipe profissional e quem frequenta o ambiente [5].

Barbosa *et al.* [6], mostra em seu estudo através do Lavado Broncoalveolar (LBA), hemocultura e secreção traqueal que a *Pseudomonas aeruginosa* está presente em pacientes com pneumonia nosocomial. Embora bactérias gram-negativas não sejam comuns da microbiota oral, quando há um desequilíbrio do meio bucal devido ao aumento do biofilme e a doença periodontal, elas se fazem presente, trazendo grande risco para infecções sistêmicas.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam resistência pela produção de b-lactamases, no caso dos b-lactâmicos e pode também estar ligada ao fato de desenvolver uma barreira impermeável [7]. Muito se discute sobre o uso de forma irracional e recreativa dos medicamentos farmacêuticos pela população, o que ocasiona um grau de resistência bacteriana aos antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções por diversas espécies de bactérias. Contrapondo a isso, buscam-se novas alternativas terapêuticas como forma de tratamento, um exemplo é a fitoterapia [8].

A fitoterapia é conhecida por encontrar finalidades terapêuticas no efeito farmacológico das plantas [9]. Antigamente a população carente era quem mais utilizava dos meios das plantas medicinais como opção terapêutica, já que é mais acessível, financeiramente e até mesmo pelo fato do cultivo e colheita de algumas espécies que geralmente temos em nossa própria casa [10]. Sendo assim, diante do crescente número de estudos no mundo acerca da fitoterapia, produtos naturais à base de plantas vêm sendo pesquisados como alternativa terapêutica na odontologia com ação antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica, anestésica e até no controle de ansiedade [11].

Um produto natural bastante estudado é o óleo essencial da laranja (*Citrus sinensis*) que se trata de uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, o qual é oxidado à presença de luz, ar e umidade, composto em sua maior parte por R-limoneno (composto orgânico da família dos terpenos) que juntamente com o citruleno são responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais do gênero *Citrus* [12].

Do Nascimento; Lopes e Queiroz [13] comprovaram em suas análises que o óleo da laranja doce apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias participantes do estudo, sendo o óleo com os maiores halos de inibição entre os outros óleos essenciais, inclusive contra a *P. aeruginosa* (bactéria gram-negativa), no entanto, são necessários mais estudos utilizando outras metodologias para detalhar esse efeito antibacteriano do óleo essencial contra cepas de *P. aeruginosa*.

Sendo assim, deve-se buscar a possibilidade de novas alternativas em soluções antissépticas e terapêuticas, explorando as atividades biológicas do extrato natural da laranja. Esse trabalho, tem como objetivo geral avaliar a ação antibacteriana e antiaderente do óleo essencial da *Citrus sinensis* frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com objetivos específicos: determinar a Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima de Aderência do óleo essencial da *Citrus sinensis* contra espécies de *Pseudomonas aeruginosa*.

II. METODOLOGIA

A. Período e Local de Estudo

Os experimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, campus Patos – PB (CSTR), em 2023.

B. Substâncias-Teste

O óleo essencial de *Citrus sinensis* foi obtido na Quinari, na cidade de Ponta Grossa – PR. Os ensaios farmacológicos foram realizados com a substância (OE) solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) com concentração menor que 0,1% v/v e diluída em água destilada.

C. Microrganismos e Meios de Cultura

Foram utilizadas as cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* Pa104 E Pa109. Todas as cepas foram mantidas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) à temperatura de 4°C. Os inóculos bacterianos, obtidos em caldo Mueller-Hinton, incubados a 37°C e diluídos em solução salina estéril para obter concentração de 1,5 x10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), tomando como método de comparação a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland [14],[15].

D. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em “U”. Em uma placa de 96 cavidades, foram adicionados 100 µl caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado, e 100 µl do óleo essencial da laranja, nas concentrações de 1000 a 31,2 µg/ml. A determinação da CIM foi conduzida com 10 µl do microrganismo em cada cavidade, aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/ml. O penúltimo contendo 200 µl do caldo, foi inoculado com a suspensão de microrganismo, sendo o controle do crescimento, e o último poço recebeu apenas 200 µl do caldo, sendo o controle negativo. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com as bactérias, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, adicionados 20 µl de solução de resazurina sódica (SIGMA), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador

colorimétrico de óxido-redução para bactérias. A leitura procedeu-se, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo. Foi feita uma nova incubação a 37 °C. A CIM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo e também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do microrganismo [16]-[18], [14].

E. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculos (10 µl) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100 µl/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada para a determinação da CBM. Após a incubação a 37 °C por 24 horas adicionou-se 20 µl de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37°C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador [19], [20].

F. Determinação da Concentração Mínima de Aderência (CIMA)

De acordo com Albuquerque *et al.* [21] com modificações, a concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do óleo essencial da laranja foi determinada na presença de sacarose a 5% com concentrações referentes a substância até a diluição 1:128. Mediante ao crescimento bacteriano a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, foi cultivada a 37°C, em caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), após, foram distribuídos 0,9 mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, 0,1 mL da solução correspondentes a diluição do composto. A incubação foi feita por 24 horas à 37°C, com os tubos inclinados em 30°. E a verificação da leitura, feita através da aderência das bactérias a parede do tubo (formação de uma parábola) visíveis a olho nu, após a agitação do mesmo. O mesmo procedimento foi realizado para controle positivo, utilizando digluconato de clorexidina à 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA). Determinou a CIMA a menor concentração do agente em contato com a sacarose capaz de inibir a aderência ao tubo.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante dos experimentos laboratoriais, constatou-se que o OE da *Citrus sinensis* foi capaz de inibir o desenvolvimento microbiano das estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* mediante o valor de 1000 µg/mL, considerada a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de ambas as cepas testadas (PA104 e PA109), caracterizando assim a CIM.

Após incubação da placa de 96 poços, para realizar nova leitura e alcançar a concentração bactericida mínima, obteve-se o valor de 1000 µg/mL para a cepa PA104 e >1000 µg/mL para a cepa PA109. Estes resultados referentes a atividade antibacteriana do óleo essencial da Laranja contra as espécies de *Pseudomonas aeruginosa* testadas encontram-se detalhadamente nas tabelas I e II.

Tabela I. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentrações	Cepas Testadas	
	PA104	PA109
1000 µg/mL	+	+
500 µg/mL	-	-
250 µg/mL	-	-
125 µg/mL	-	-
62,5 µg/mL	-	-
31,2 µg/mL	-	-

Legenda: (+) inibiu o crescimento do microrganismo, (-) não inibiu o crescimento do microrganismo

Fonte: autoria própria, 2023

Tabela II. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentrações	Cepas Testadas	
	PA104	PA109
1000 µg/mL	+	-
500 µg/mL	-	-
250 µg/mL	-	-
125 µg/mL	-	-
62,5 µg/mL	-	-
31,2 µg/mL	-	-

Legenda: (+) inibiu o crescimento do microrganismo, (-) não inibiu o crescimento do microrganismo

Fonte: autoria própria, 2023

De acordo com Sartoratto *et al.* (2004), a atividade antimicrobiana para os óleos essenciais é considerada forte quando se tem uma CIM de até 500 µg/mL, moderada para

CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM com valor superior a 1500 µg/mL. Desta maneira, os resultados deste trabalho trazem uma moderada atividade antibacteriana do óleo essencial da laranja diante das cepas testadas (PA104 e PA109), visto que se obteve uma CIM de 1000 µg/mL.

A substância é considerada bactericida ou bacteriostática segundo a sua CBM, quando esta for respectivamente, igual ou duas vezes maior que a CIM, tal como a CBM for duas vezes maior que a CIM (HAFIDH et al., 2011). Tendo em vista isto, os resultados obtidos nesta pesquisa apontam que o óleo essencial da Laranja apresenta potencial bactericida para a cepa PA104 e bacteriostático para a cepa PA109.

Na literatura, relatam que o óleo da Laranja doce (*Citrus Sinensis*) inibe o crescimento de várias bactérias oportunistas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e inclusive, a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), todavia por técnica diferente (difusão em disco) da utilizada no presente trabalho, quando o óleo obtido através do fruto maduro. Já o OE da *Citrus aruantium* (laranja amarga) apresentou atividade antibacteriana e teve sucesso no controle de biofilme de multiespécies. Por meio desses efeitos, o OE da laranja amarga é utilizado para tratar resfriados, pele sem brilho, gripe, bronquite crônica e até boca e gengiva, se mostrando uma alternativa a medicamentos com resistência bacteriana [24]-[26].

No seu trabalho de obtenção e caracterização do óleo essencial dos resíduos da casca de laranja, Orso et al. [27] avaliaram a CIM do OE contra cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053) pela técnica de microdiluição em caldo com placa de 96 poços, no entanto, com cepa de origem diferente. Ademais, foi necessária uma concentração superior à máxima utilizada no estudo para inibir o crescimento deste microrganismo. Em contrapartida, nosso estudo teve atividade antibacteriana moderada frente a mesma bactéria. Essa resposta, possivelmente pode estar associada a pequena concentração de limoneno obtida na amostra do óleo utilizado na bactéria, a qual, por ser gram-negativa e possuir lipopolissacarídeos em sua parede celular, apresenta resistência ao composto, em razão da baixa permeabilidade do óleo através da parede e membrana celular. No entanto, houve inibição total e parcial de crescimento para outras bactérias gram-negativas e gram-positivas testadas.

Goulart et al. [28], em seu estudo, avaliou pelo método de difusão em ágar, a atividade antibacteriana do óleo essencial da laranja pêra, que tinha como componente principal o limoneno, contra cepas de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, onde foram colocadas estirpes em uma placa de petri contendo o óleo essencial e uma sem o óleo, comprovando assim a inibição de crescimento bacteriano na placa que continha o OE de Laranja Pêra contra bactérias gram-negativas, classe pertencente ao microrganismo utilizado nesse estudo e que apresentam uma maior resistência aos óleos essenciais.

Já em relação a atividade antiaderente, pôde-se observar que o óleo essencial em questão não teve eficácia contra a adesão da cepa testada (PA104) de *P. aeruginosa* à parede do tubo em nenhuma das concentrações que foram utilizadas nessa metodologia, se comparadas aos resultados obtidos pelo controle positivo de Digluconato de Clorexidina 0,12%, o qual foi capaz de inibir a adesão do microrganismo na concentração de até 1:4 µg/mL. Os resultados estão expostos na tabela III.

Tabela III. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA) DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Citrus sinensis* CONTRA CEPA BACTERIANA (PA104) DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentrações em µg/mL	Cepa Bacteria	
	Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	Digluconato de clorexidina 0,12%
1:1	-	+
1:2	-	+
1:4	-	+
1:8	-	-
1:16	-	-
1:32	-	-
1:64	-	-
1:128	-	-

Legenda: (+) inibiu a aderência à parede do tubo de vidro, (-) não inibiu a aderência à parede do tubo de vidro

Fonte: autoria própria, 2023

Apesar de não encontrar na literatura resultados de CIMA do Óleo essencial da Laranja contra *P. aeruginosa* nessa mesma metodologia, em outro trabalho, Silva [29] avaliou o potencial antibiofilme de óleos essenciais contra duas variantes de *Rhodococcus erythropolis*, uma produtora de exo-polímeros (DCL14-R) e outra não produtora (DCL14-S). Onde utilizou OEs de diferentes espécies, dentre eles o *Citrus lemon* e o *Citrus sinensis*, em concentrações de 20%, 10% e 5% da sua CIM em meio mineral e Mueller-Hinton. O OE de *Citrus lemon* se destacou como o mais eficiente referente as três dosagens utilizadas contra a variante rugosa (DCL14-R), inibindo o biofilme em 59,9-67,1%, comparado aos biofilmes sem o óleo, já o *C. sinensis*, apresentou padrão inverso a dosagem. Quando utilizado frente a variante mucosa (DCL14-S), o óleo *C. lemon* foi o mais eficiente inibindo o biofilme em 73,1-79,7% e o da laranja variou entre 50-75%.

Outra pesquisa desenvolvida por Lou et al. [30] analisou o potencial inibitório da *Citrus medica L. var. sarcodactylis*

(planta conhecida como “Mão de buda, também da família Rutaceae, que tem como componente principal o Limoneno) contra *S. aureus*, patógeno gram-positivo comum em mucosas (nariz e boca) e presente em ambientes hospitalares, com resistência a antibióticos. Os dois tipos de óleo apresentaram atividade antibiofilme, sendo que o óleo essencial puro inibiu em 55,6% a formação de biofilme na concentração de 0,24 mg/mL e na nanoemulsificação 91,5%. Na concentração de 0,48 mg/mL o óleo nanoemulsificado, inibiu completamente a formação de biofilme, já que a erradicação de aderência é essencial para prevenção de formação de biofilme.

Já em seu estudo, Subramenium; Vijayakumar; Pandiam [31] explorou o potencial antibiofilme do Limoneno, principal componente das frutas cítricas, contra cepas de bactérias do gênero *Streptococcus*. Obtendo-se uma redução na formação de biofilme em todas as estirpes testadas: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*, com concentração inibitória mínima de biofilme de 400 µg/mL, possuindo uma atividade antibiofilme de 75-95% contra os patógenos que foram testados.

Contudo, mesmo que a CIMA não tenha apresentado resultados satisfatórios com a metodologia utilizada, vale ressaltar a importância e originalidade desse estudo no ambiente científico e acadêmico, o qual pode servir de base referencial para outros trabalhos, futuramente.

IV. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Citrus sinensis* apontou moderada atividade antibacteriana frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e foi classificado como bactericida e bacteriostático para as cepas PA104 e PA109, respectivamente. Entretanto, não apresentou eficácia na inibição de aderência da cepa representativa do microrganismo na parede do tubo de ensaio pela metodologia usada no presente trabalho.

Tendo em vista isto, mais estudos são primordiais, testando outras metodologias e outros microrganismos para verificar o comportamento e eficácia deste composto, que pode sugerir uma alternativa a soluções desinfetantes e antibacterianas frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente, pode-se desenvolver pesquisas *in vivo*, para analisar sua atividade diante do corpo humano.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Universidade Federal de Campina Grande, sobretudo pela disponibilidade do laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não têm qualquer conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- [1] Andrade IP, Xavier KBC, Nunes APF, Fardin RF. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microorganismos da cavidade oral. *Revista brasileira de pesquisa em saúde*. 2011;13(3), 10-16.
- [2] Teixeira KIR, Bueno AC, Cortés ME. Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie. *Quim. nova esc*. 2010; 32(3), 145-50.
- [3] Brasil LDO. Medicina Periodontal na Atualidade. *Monografia. Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas*; 2017.
- [4] Da Rosa Freitas V, Van Der Sand ST, Simonetti AB. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. *Rev Odontol UNESP*. 2010; 39(4), 193-200.
- [5] Xavier GMS, Silva FCE, Jácome Júnior AT. (2013). Avaliação de indicadores higiênico-sanitários em águas utilizadas em equipamentos odontológicos. *Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Biomedicina, Universidade Católica de Pernambuco*; 2013.
- [6] Barbosa JCDS, Lobato PS, Menezes SAFD, Menezes TODA, Pinheiro HHC. Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. *Rev. odontol. UNESP (Online)*. 2010; 39(4), 201-206.
- [7] Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America: The giant is awakening. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2000; 14(1), 67-81.
- [8] Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa MDL. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto Enfermagem*, v. 15, p. 115-121, 2006.
- [9] De Melo Aleluia C, de Cássia Procópio V, Oliveira MTG, Furtado PGS, Giovannini, JFG, de Mendonça SMS. Fitoterápicos na odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2015; 27(2), 126-134.
- [10] Bohneberger G, Machado MA, Debiasi MM, Dirschnabel AJ, De Oliveira Ramos G. Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los?. *Brazilian Journal of Health Review*. 2019; 2(4), 35043517.
- [11] Evangelista SS, Sampaio FC, Parente RC, Bandeira MFCL. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Revista Brasileira de plantas medicinais*. 2013; 15, 513-519.
- [12] Heberle T, Kringel DH, Dannenberg G, Evangelho J, De Oliveira RP, Dias ARG. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja. *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida*, 25. *CIGR Session 6 International Technical Symposium*, 10. 2016, 24-27 de outubro. Gramado, Rio Grande do Sul. Gramado: SBCTA, 2016.
- [13] Do Nascimento NL, Lopes PS, Queiroz PRM. Extratos Vegetais com Capacidade de Inibição de Biofilme Microbiano. *Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa*. 2017; 3(1).
- [14] Bona EAMD, Pinto FGDS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura ACD. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2014; 81, 218-225.
- [15] Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015; 15, 316-320.
- [16] Palomino JC, Martín A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002; 46(8), 2720-2722.
- [17] Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima ME, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18, 301-307.
- [18] Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais, Wayne. Documento CLSI MO7- A9. Norma aprovada, 9ª edição. *Métodos de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana de Diluição para Bactérias que Crescem Aerobicamente*. Pennsylvania: CLSI; 2012.

- [19] Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*. 2008; 7(12), 1797-1806.
- [20] Guerra FQS, Mendes JM, Oliveira WA, Costa JGM, Coutinho HDM, Lima EO. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre estirpes de *Acinetobacter spp.* resistentes a múltiplas drogas. *Revista de Biologia e Farmácia*. 2012; 8(1):62-70
- [21] Albuquerque ACL, Pereira MDSV, Pereira JV, Pereira LF, Silva DF, Macedo-Costa MR, Higino JS (2010). Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. *Rev Odontol UNESP*. 2010; 39(1), 21-5.
- [22] Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composição e actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista Brasileira de Microbiologia*. 2004; 35(4):275-280.
- [23] Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inibição do crescimento de agentes patogênicos bacterianos e fúngicos altamente resistentes por um produto natural. *A Revista Microbiológica Aberta*. 2011; 5:96.
- [24] Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Saïdani Tounsi M. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012, 1-10.
- [25] Franco-Vega A, Reyes-Jurado F, Cardoso-Ugarte GA, Sosa-Morales ME, Palou E, López-Malo A. Sweet orange (*Citrus sinensis*) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press. 2016; 783-790.
- [26] Dosoky NS, Setzer WN. Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(7), 1966.
- [27] Orso VT, Rodrigues, WL, Dalla Cort J, Zanetti M, Colpani GL, Zeferino RCF. Obtenção e Caracterização do Óleo Essencial de Laranja Obtido a Partir de Resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia'. *Research, Society and Development*. 2022; 11(9), e34211931876-e34211931876.
- [28] Goulart ALRM, Vieira HG, Magalhaes JC, Lima MIP, Creton JRG. Atividade antibacteriana do óleo essencial extraído da casca da laranja pêra frente às bactérias da família *Enterobacteriaceae*. *Acta Biomedica Brasiliensia*. 2018; 9(2), 117-123.
- [29] Silva MTSDC. Avaliação da capacidade de extratos voláteis de plantas aromáticas para inibir a formação de biofilmes bacterianos. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências; 2011.
- [30] Lou Z, Chen J, Yu F, Wang H, Kou X, Ma C, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT*. 2017; 80, 371-377.
- [31] Subramenium GA, Vijayakumar K, Pandian SK. Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors. *Journal of medical microbiology*. 2015; 64(8), 879890.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *Citrus sinensis* apontou moderada atividade antibacteriana frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e foi classificado como bactericida e bacteriostático para as cepas PA104 e PA109, respectivamente. Entretanto, não apresentou eficácia na inibição de aderência da cepa representativa do microrganismo na parede do tubo de ensaio pela metodologia usada no presente trabalho.

Tendo em vista isso, mais estudos são primordiais, testando outras metodologias e outros microrganismos para verificar o comportamento e eficácia deste composto, que pode sugerir uma alternativa a soluções desinfetantes e antibacterianas frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente, pode-se desenvolver pesquisas *in vivo*, para analisar sua atividade diante do corpo humano.

ANEXO A – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA

European Journal of Medical and Health Sciences (EJMED) é uma revista internacional revisada por pares publicada pela European Open Science bimestralmente. A revista publica:

- Artigos de pesquisa completos de última geração
- Avaliações
- Estudos de caso - Comunicações curtas relacionadas com todas as áreas das Ciências Médicas e da Saúde.

Todos os artigos submetidos:

- deve ser original
- devem ser resultados de pesquisa inéditos
- deve ser experimental ou teórico
- e será revisado por pares
- não pode ser considerado para publicação em outro lugar a qualquer momento durante o período de revisão

A EJMED está aceitando manuscritos para publicação em inglês. A revista considera artigos que não foram publicados anteriormente nem submetidos simultaneamente em outro lugar em qualquer idioma. O formulário de direitos autorais será fornecido pelo editor para os trabalhos aceitos.

A relevância científica cada vez maior dos artigos publicados e a melhoria da qualidade dos exemplares impressos é o principal objetivo de nossa política editorial.

Taxas do autor

European Journal of Medical and Health Sciences (EJMED) segue um modelo de publicação que nos permite minimizar os custos de publicação. Este modelo visa delegar os esforços de edição/adaptação de layout do manuscrito aos autores para que eles não tenham que pagar por esses serviços.

A revista cobra as seguintes taxas do autor:

- Taxa de publicação do artigo: 69,00 GBP (obrigatório)

- Taxa de suporte do modelo: 50 GBP (opcional)

Se um manuscrito for aceito para publicação, os autores serão solicitados a pagar uma taxa de publicação de artigo (APF) para cobrir os custos de publicação.

NOTA: Os autores de todos os manuscritos aceitos são obrigados a adaptar o layout de seus trabalhos de acordo com o modelo da revista. Se os autores não puderem adaptar o manuscrito submetido ao nosso modelo, a equipe de suporte da EJMED pode fornecer esse serviço aos autores cobrando uma taxa de suporte de modelo de 50 libras esterlinas.

ESQUEMA DE DESCONTO:

- Autores têm desconto de 20% para publicação recorrente em até 5 meses após a data da primeira publicação.

- Para mais informações, consulte a página de descontos.

Indexação

O conteúdo da revista é indexado em CrossRef e atribuído a um Digital Object Identifier (DOI). Isso significa que todas as nossas referências são disponibilizadas e as citações podem ser rastreadas pela comunidade editorial com um número DOI.

Além disso, esta revista está indexada no Google Scholar, ROAD, SCILIT, WorldCat, ScienceOpen.

Tolerância zero para plágio

Esta revista tem uma política de “Tolerância Zero ao Plágio”. Verificamos o problema de plágio por meio de dois métodos: verificação do revisor e ferramenta de prevenção de plágio (iThenticate.com). Todos os envios serão verificados pelo software de prevenção de plágio antes de serem enviados aos revisores.

Foco e Escopo

European Journal of Medical and Health Sciences (EJMED) é um jornal on-line de alta qualidade, acesso aberto, internacional, revisado por pares, que visa publicar mensalmente

artigos de pesquisa originais completos, revisões e estudos de caso relacionados a todas as áreas das Ciências Médicas e da Saúde como:

- Anestesia
- Anatomia
- Bioquímica
- Pesquisa de câncer/oncologia
- Cardiologia
- Medicina Comunitária
- Odontologia
- Dermatologia e Doenças Venéreas
- Diabetes
- Endocrinologia
- Medicina forense
- Gastroenterologia
- Cirurgia geral
- Genética
- Geriatria/Envelhecimento
- Hematologia
- Doenças infecciosas
- Medicina Interna
- Educação médica

- Microbiologia
- Neurologia/Neurocirurgia
- Nefrologia
- Obstetrícia & ginecologia
- Oftalmologia
- Ortopedia
- Otorrinolaringologia
- Farmacologia
- Patologia
- Fisiologia
- Pediatria
- Medicina Pulmonar
- Psiquiatria
- Radiologia
- Reumatologia
- Cirurgia
- Urologia

Processo de Revisão por Pares

O processo de revisão é considerado crítico para estabelecer um corpo confiável de pesquisa e conhecimento. O processo de revisão visa fazer com que os autores atendam aos padrões de sua disciplina e da ciência em geral.

Usamos um sistema duplo-cego para revisão por pares; as identidades dos revisores e dos autores permanecem anônimas entre si. O artigo será revisado por dois ou três especialistas; um é da equipe editorial e os outros dois são revisores externos.

O editor passará os manuscritos aceitos para publicação a uma editora que será responsável pela organização dos serviços editoriais e impressão online da publicação.

Política de Acesso Aberto

Esta revista fornece acesso aberto imediato ao seu conteúdo com base no princípio de que tornar a pesquisa disponível gratuitamente após a publicação no site da EJMED ao público apoia uma maior troca global de conhecimento.

Declaração de plágio

A EJMED tem uma política de Tolerância Zero ao Plágio. Verificamos o problema de plágio por meio de dois métodos: verificação do revisor e ferramenta de prevenção de plágio (iThenticate.com).

Todos os envios serão verificados pelo software de prevenção de plágio antes de serem enviados aos revisores.

Declaração de ética de publicação e má prática de publicação

A publicação de um artigo no European Journal of Medical and Health Sciences (EJMED) revisado por pares é um alicerce essencial no desenvolvimento de uma rede de conhecimento coerente e respeitada. É um reflexo direto da qualidade do trabalho dos autores e das instituições que os apoiam. Artigos revisados por pares apóiam e incorporam o método científico. Portanto, é importante concordar com os padrões de comportamento ético esperado para todas as partes envolvidas no ato de publicar: os autores, os editores do periódico, os revisores, o editor e a sociedade.

As declarações de ética para nosso periódico são baseadas nas Diretrizes de Melhores Práticas do Comitê de Ética de Publicação (COPE) para Editores de Periódicos.

Políticas de Retirada e Reembolso de Manuscritos

Os autores podem retirar seus manuscritos em qualquer estágio de submissão, revisão por pares e procedimentos de edição de texto. No entanto, retiradas após o início do processo de edição de texto não estão sujeitas a reembolso da taxa de processamento do artigo.

Elaboração de Trabalhos para Revista Europeia de Ciências Médicas e da Saúde (EJMED)

Primeiro A. Autor, Segundo B. Autor e Terceiro C. Autor

ABSTRACT

(Por favor, leia atentamente o resumo do modelo). Estas instruções fornecem diretrizes para a preparação de artigos para esta revista. A configuração do papel deve ser no tamanho A4 com Margem: Superior 1,78 cm, Parte inferior 1,78 cm, Esquerda 1,65 cm, Direita 1,65 cm, Calha 0 cm e Posição Superior da Calha. O artigo deve estar em uma coluna após o nome dos autores. Todo o artigo deve estar com: Nome da fonte Times New Roman, Tamanho da fonte 10, Espaçamento entre linhas 1,05, recuo de 0,36 cm primeira linha EXCETO Resumo, Palavras-chave, Título do artigo, Referências, Perfil do autor (na última página do artigo, máximo de 400 palavras), Todos os títulos e Detalhes do manuscrito (Primeira página, lado direito). O título do artigo deve estar no tamanho da fonte 20 com espaçamento entre linhas simples. O Nome dos Autores deve estar no Tamanho da Fonte 11, Antes do Espaçamento 0, Após o Espaçamento 16, com Espaçamento entre Linhas Simples. Por favor, não escreva o e-mail do autor ou o endereço do autor no lugar do nome do autor. O e-mail dos autores e seus endereços devem estar nos detalhes do manuscrito. O resumo e as palavras-chave devem estar no tamanho da fonte 9, negrito com espaçamento entre linhas simples. Todos os TÍTULOS PRINCIPAIS devem estar em Numeração em Caixa Alta, Centro e Romana (I, II, III... etc.), Antes do Espaçamento 12, Após o Espaçamento 6, com espaçamento entre linhas simples. Todos os subtítulos devem estar em caixa maiúscula, 0,25 cm à esquerda, itálico e numeração do alfabeto (A, B, C... etc.), Antes do Espaçamento 6, Após o Espaçamento 3, com Espaçamento entre Linhas Simples. Os detalhes do manuscrito devem estar no tamanho da fonte 8, primeira página e lado direito com espaçamento entre linhas simples. As referências devem estar no tamanho da fonte 8, pendente 0,63 com espaçamento entre linhas simples. O Perfil do Autor deve estar no Tamanho da Fonte 8, com espaçamento entre linhas simples. A legenda das tabelas e figuras deve estar no tamanho da fonte 8. O texto da tabela deve estar no tamanho da fonte 8 com espaçamento entre linhas 1,1.

Palavras-chave: Cerca de quatro palavras-chave ou frases em ordem alfabética, separadas por vírgulas.

Submetido : 1 de Outubro de 2021

Publicado : 30 de outubro de 2021

versão impressa ISSN: 2593-8339

DOI: 10.24018/ejmed.ANO.Vol.Issue.ID

F. A. Autor*

Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Boulder, CO, EUA.
(e-mail: autor@boulder.nist.gov)

S. B. Autor

Universidade Rice, Houston, TX, EUA.
(e-mail: autor@lamar.colostate.edu)

T. C. Autor

Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade do Colorado, Boulder, CO EUA.

(e-mail: autor@nrim.go.jp)

**Endereço para correspondência*

I. INTRODUÇÃO

Realce uma seção que você deseja designar com um determinado estilo e selecione o nome apropriado no menu de estilo. O estilo ajustará suas fontes e espaçamento entre linhas. **Não altere os tamanhos de fonte ou o espaçamento entre linhas para espremer mais texto em um número limitado de páginas.** Use itálico para ênfase, não sublinhe.

Para inserir imagens *no Word*, posicione o cursor no ponto de inserção e use Inserir | Imagem | De Arquivo ou copie a imagem para a área de transferência do Windows e, em seguida, Editar | Colar Especial | Imagem (com a opção "Flutuar sobre o texto" desmarcada).

A revista reserva-se o direito de fazer a formatação final do seu trabalho.

II. PROCEDIMENTOS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS

A. Etapa de Revisão

Submeta seu manuscrito eletronicamente para revisão.

B. Fase final

Ao submeter sua versão final, após a aceitação do trabalho, prepare-a em formato de duas colunas, incluindo figuras e tabelas.

C. Figuras

Como dito, para inserir imagens no Word, posicione o cursor no ponto de inserção e use Inserir | Imagem | De Arquivo ou copie a imagem para a área de transferência do Windows e, em seguida, Editar | Colar Especial | Imagem (com a opção "Flutuar sobre o texto" desmarcada).

Os autores dos manuscritos aceitos receberão um formulário de direitos autorais e o formulário deverá acompanhar sua submissão final.

III. MATEMÁTICA

Se você estiver usando *o Word*, use o Microsoft Equation Editor ou o complemento *MathType* (<http://www.mathtype.com>) para equações em seu documento (Inserir | Objeto | Criar Novo | Equação Microsoft ou Equação MathType). "Flutuar sobre o texto" *não deve* ser selecionado.

IV. UNIDADES

Use SI (MKS) ou CGS como unidades primárias. (As unidades SI são fortemente encorajadas.) As unidades inglesas podem ser usadas como unidades secundárias (entre parênteses). **Isso se aplica aos papéis em armazenamento de dados.** Por exemplo, escreva "15 Gb/cm² (100 Gb/in²)". Uma exceção é quando unidades em inglês são usadas como identificadores no comércio, como "31/2 na unidade de disco". Evite combinar unidades SI e CGS, como corrente em amperes e campo magnético em oersteds. Isso muitas vezes leva à confusão porque as equações não se equilibram dimensionalmente. Se você precisar usar unidades mistas, indique claramente as unidades para cada quantidade em uma equação.

A unidade SI para a intensidade do campo magnético H é A/m. No entanto, se você deseja usar unidades de T, consulte a densidade de fluxo magnético B ou a intensidade do campo magnético simbolizada como $\mu_0 H$. Use o ponto central para separar unidades compostas, por exemplo, "A·m²".

V. DICAS ÚTEIS A.

Figuras e Tabelas

Como a formatação final do seu trabalho é limitada em escala, você precisa posicionar figuras e tabelas na parte superior e inferior de cada coluna. Figuras e tabelas grandes podem abranger ambas as colunas. Coloque legendas de figuras abaixo das figuras; Coloque os títulos das tabelas acima das tabelas. Se sua figura tiver duas partes, inclua os rótulos "(a)" e "(b)" como parte do trabalho artístico. Por favor, verifique se as figuras e tabelas que você menciona no texto realmente existem. **Não coloque bordas do lado de fora de suas figuras.** Use a abreviatura "Fig." mesmo no início de uma frase. As figuras são numeradas com algarismos arábicos. Não abreviar "Tabela". As tabelas são numeradas com algarismos romanos.

Inclua uma nota com o trabalho final indicando que você solicita a impressão colorida. **Não use cores a menos que**

seja necessário para a interpretação adequada de suas figuras.

Os rótulos dos eixos das figuras são frequentemente uma fonte de confusão. Use palavras em vez de símbolos. Como exemplo, escreva a quantidade "Magnetização", ou "Magnetização M", e não apenas "M". Coloque as unidades entre parênteses. Não rotule eixos apenas com unidades. Como na Fig. 1, por exemplo, escreva \square "Magnetização (A/m)" ou "Magnetização (A m⁻¹)", não apenas "A/m". Não rotule eixos com uma proporção de quantidades e unidades. Por exemplo, escreva "Temperatura (K)", não "Temperatura/K".

Os multiplicadores podem ser especialmente confusos. Escreva "Magnetização (kA/m)" ou "Magnetização (10³ A/m)". Não escreva "Magnetização (A/m) 1000 \square " porque o leitor não saberia se a etiqueta do eixo superior na Fig. 1 significava 16000 A/m ou 0,016 A/m. As etiquetas das figuras devem ser legíveis, aproximadamente do tipo 8 a 12 pontos. O formato de número decimal deve ser o mesmo para o eixo (por exemplo, 1.0, 1.2 e não 1, 1.2). Insira gráficos editáveis. Não insira tabelas como imagens. A quebra automática de texto para tabelas deve ser nenhuma. As figuras devem ser inseridas em linha com o texto. Os números devem ser de alta qualidade. O texto sobre figuras deve ser distinto e não borrado.

QUADRO I: A DISPOSIÇÃO DOS CANAIS

Canais	Grupo 1	Grupo 2	...	Grupo c
Canal principal	Canal 1	Canal 2	...	Canal c
Canal do assistente	Canal 2	Canal 3	...	Canal 1

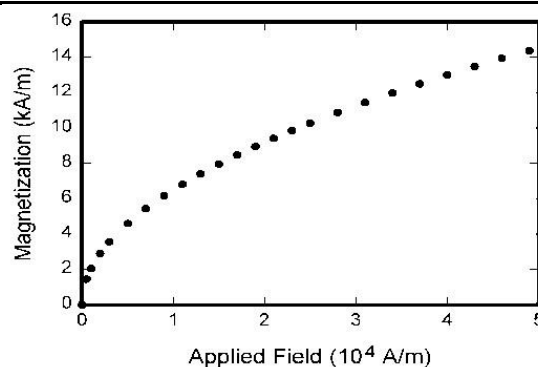


Fig. 1. Magnetização em função do campo aplicado.

B. Referências

Use o estilo de referência Vancouver. As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que são mencionadas pela primeira vez. Coloque cada número de referência entre colchetes [1] ao longo do texto, tabelas e legendas. Se a mesma referência for usada novamente, reutilize o número original. A pontuação da sentença segue os parênteses [2]. Múltiplas referências [2], [3] são

¹ Recomenda-se evitar notas de rodapé. Em vez disso, tente integrar as informações da nota de rodapé ao texto.

numeradas com colchetes separados [1]–[3]. Ao citar uma seção de um livro, forneça os números de página relevantes [2]. Nas frases, refira-se simplesmente ao número de referência, como em [3]. Não use "Ref. [3]" ou "referência [3]", exceto no início de uma frase: "A referência [3] mostra ...". Quando os nomes dos autores forem usados na citação do texto, siga as seguintes regras: até 3 autores – nomeie 3 autores e depois coloque referência, por exemplo, "Smith, Jones e McDonald [1] relataram que..."; mais de 3 autores – por exemplo, "Smith *et al.* [1] relataram que..." Numerar notas de rodapé separadamente em sobrescritos (Inserir | Nota de rodapé).¹ Coloque a nota de rodapé real na parte inferior da coluna em que é citada, não coloque notas de rodapé na lista de referências (notas de fim). Use letras para notas de rodapé de tabela.

Observe que as referências no final deste documento estão no estilo de referência preferido. Indicar o nome de todos os autores; Não use "*et al.*" a menos que haja seis autores ou mais. Use um espaço após as iniciais dos autores.

Artigos que não foram publicados devem ser citados como

"inéditos". Os trabalhos submetidos para publicação devem ser citados como "submetidos para publicação". Artigos que foram aceitos para publicação, mas ainda não especificados para um número, devem ser citados como "a serem publicados". Por favor, forneça afiliações e endereços para comunicações privadas.

Coloque apenas a primeira palavra em maiúsculas no título de um artigo, exceto substantivos próprios e símbolos de elementos. Para artigos publicados em revistas de tradução, por favor, forneça a citação em inglês primeiro, seguida da citação original em língua estrangeira.

C. Abreviaturas e Siglas

Defina abreviaturas e siglas na primeira vez que forem utilizadas no texto, mesmo depois de já terem sido definidas no resumo. Abreviações como SI, ac e dc não precisam ser definidas. Abreviações que incorporam períodos não devem ter espaços: escreva "C.N.R.S.", não "C.N. R. S." Não use abreviações no título, a menos que sejam inevitáveis (por exemplo, "título" no título deste artigo).

D. Equações

Equações numéricas consecutivamente com números de equações entre parênteses na margem direita, como em (1). Primeiro, use o editor de equações para criar a equação. Em seguida, selecione o estilo de marcação "Equação". Pressione a tecla Tab e escreva o número da equação entre parênteses. Para tornar suas equações mais compactas, você pode usar o solidus (/), a função exp, ou expoentes apropriados. Use parênteses para evitar ambiguidades nos denominadores. Pontuar equações quando elas fazem parte de uma frase, como em

(1)

$$\int_0^1 \exp(-x/z_j - z_j/x) dx = J_1(r) J_0(2r) dr$$

Certifique-se de que os símbolos em sua equação foram definidos antes que a equação apareça ou imediatamente a seguir. O tamanho dos símbolos nas equações deve ser do tamanho da fonte 10. Símbolos em itálico (T pode se referir à temperatura, mas T é a unidade tesla). Consulte "(1)", não "Eq. (1)" ou "equação (1)", exceto no início de uma frase: "A equação (1) é ...".

E. Outras recomendações

Use um espaço após pontos e dois pontos. Modificadores complexos de hífen: "magnetização resfriada por campo zero". Evite participios pendurados, como, por exemplo, "Usando (1), o potencial foi calculado". [Não está claro quem ou o que usou (1).] Em vez disso, escreva "O potencial foi calculado usando (1)" ou "Usando (1), calculamos o potencial".

Use um zero antes dos pontos decimais: "0,25", não ".25". Use "cm³", não "cc". Indique as dimensões da amostra como "0,1 cm 0,2 cm", e não "0,1 0,2 cm²". Use um espaço entre o número e a unidade: 0,1 cm, não 0,1 cm. A abreviação de "segundos" é "s", não "sec". Não misture grafias completas e abreviaturas de unidades: use "Wb/m²" ou "webers por metro quadrado", não "webers/m²". Ao expressar um intervalo de valores, escreva "7 a 9" ou "7-9", e não "7 ~9".

Uma declaração entre parênteses no final de uma frase é pontuada fora do parêntese de fechamento (como este). (Uma frase entre parênteses é pontuada entre parênteses.) No inglês americano, pontos e vírgulas estão entre aspas, como "este período". Outra pontuação é "fora"! Evite contrações; Por exemplo, escreva "Não fazer" em vez de "Não". A vírgula serial é preferida: "A, B e C" em vez de "A, B e C".

Se desejar, você pode escrever na primeira pessoa do singular ou plural e usar a voz ativa ("Eu observei que..." ou "Observamos que..." em vez de "Observou-se que..."). Lembre-se de verificar a ortografia. Se a sua língua nativa não for o inglês, peça a um colega nativo que fale inglês para revisar seu artigo.

VI. ALGUNS ERROS COMUNS

A palavra "dados" é plural, não singular. O subscrito para a permeabilidade do vácuo μ_0 é zero, não uma letra minúscula "o". O termo para magnetização residual é "remanência"; o adjetivo é "remanent"; não escreva "remanescente" ou "remanescente". Use a palavra "micrômetro" em vez de "mícron". Um gráfico dentro de um gráfico é uma "inserção", não uma "inserção". A palavra "alternativamente" é preferida à palavra "alternadamente" (a menos que você realmente queira dizer algo que alterne). Use a palavra "enquanto" em

r2

$$\int_0^1 F(r, x) dr dx = [r/(2x)]$$

vez de "enquanto" (a menos que você esteja se referindo a eventos simultâneos). Não use a palavra "essencialmente" para significar

"aproximadamente" ou "efetivamente". Não use a palavra "problema" como eufemismo para "problema". Quando as composições não forem especificadas, separe os símbolos químicos por traços; por exemplo, "NiMn" indica o composto intermetálico Ni_{0,5}Mn_{0,5} enquanto "Ni-Mn" indica uma liga de alguma composição Ni_xMn_{1-x}.

Esteja atento aos diferentes significados dos homófonos "afeto" (geralmente um verbo) e "efeito" (geralmente um substantivo), "complemento" e "elogio", "discreto" e "discreto", "principal" (por exemplo, "investigador principal") e "princípio" (por exemplo, "princípio de medição"). Não confunda "implicar" e "inferir".

Prefixos como "non", "sub", "micro", "multi" e "ultra" não são palavras independentes, devem ser unidos às palavras que modificam, geralmente sem hífen. Não há período após o "et" na abreviatura latina "et al." (também está em itálico). A abreviatura "i.e.", significa "isto é", e a abreviatura "e.g.", significa "por exemplo" (essas abreviaturas não estão em itálico).

Um excelente manual de estilo e fonte de informação para escritores de ciência é [9].

VII. POLÍTICA EDITORIAL

O autor responsável por submeter um artigo é responsável por obter a concordância de todos os coautores e qualquer consentimento necessário dos patrocinadores antes de submeter um artigo. É obrigação dos autores citarem trabalhos prévios relevantes.

Os autores de artigos rejeitados podem revisá-los e reenviá-los à revista novamente.

VIII. PRINCÍPIOS DE PUBLICAÇÃO

O conteúdo da revista é revisado por pares e arquivado. A revista publica artigos acadêmicos de valor arquivístico, bem como exposições tutoriais e revisões críticas de assuntos clássicos e tópicos de interesse atual.

Os autores devem considerar os seguintes pontos:

- 1) Artigos técnicos submetidos para publicação devem avançar o estado do conhecimento e devem citar trabalhos anteriores relevantes.
- 2) A extensão de um artigo submetido deve ser proporcional à importância, ou adequada à complexidade, do trabalho. Por exemplo, uma extensão óbvia de trabalhos publicados anteriormente pode não ser apropriada para publicação ou pode ser adequadamente tratada em apenas algumas páginas.
- 3) Os autores devem convencer tanto os revisores quanto os editores do mérito científico e técnico de um artigo; Os padrões de prova são mais elevados quando resultados extraordinários ou inesperados são relatados.

- 4) Como a replicação é necessária para o progresso científico, os artigos submetidos para publicação devem fornecer informações suficientes para permitir que os leitores realizem experimentos ou cálculos semelhantes e usem os resultados relatados. Embora nem tudo precise ser divulgado, um artigo deve conter informações novas, utilizáveis e totalmente descritas. Por exemplo, a composição química de um espécime não precisa ser informada se o objetivo principal de um artigo é introduzir uma nova técnica de medição. Os autores devem esperar ser desafiados pelos revisores se os resultados não forem apoiados por dados adequados e detalhes críticos.

IX. CONCLUSÃO

Uma seção de conclusão não é necessária. Embora uma conclusão possa rever os pontos principais do artigo, não replique o resumo como conclusão. Uma conclusão pode elaborar sobre a importância do trabalho ou sugerir aplicações e extensões.

APÊNDICE

Apêndices, se necessário, aparecem antes do reconhecimento.

RECONHECIMENTO

A grafia preferida da palavra "acknowledgment" no inglês americano é sem um "e" após o "g". Use o título singular mesmo que você tenha muitos reconhecimentos. Evite expressões como "Um de nós (S.B.A.) gostaria de agradecer...". Em vez disso, escreva "F. A. Autor agradece...".

FINANCIAMENTO

Agradecimentos de patrocínio e apoio financeiro podem ser colocados nesta seção.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

(Artigo de revista, até 6 autores)

- [1] Johnston KJ, Hammond G, DJ Meyers, Joynt Maddox KE. Associação de raça e etnia e tipo de programa medicare com acesso à atenção ambulatorial e medidas de qualidade. *JAMA*. 2021 17 ago;326(7):628–636. DOI: 10.1001/jama.2021.10413.
- [2] Naderi SH, Bestwick JP, Wald DS. Adesão aos medicamentos que previnem a doença cardiovascular: metanálise em 376.162 pacientes. 2012; 125(9): 882–887.e1.

(Artigo de revista, mais de 6 autores)

- [3] Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Mauger DT, Boehmer SJ, Szeffler SJ, *et al.* Corticosteroides inalatórios de longa duração em pré-escolares de alto risco para asma. *N Engl J Med.* 2006 Maio 11;354(19):1985–1997.

(Artigos de periódicos pré-print)

- [4] Silas P, Yates JR, Haynes PD. A ser publicado na Physical Review B. Arxiv. [Pré-impressão] 2008. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/0810.1692> [Acesso em 23 jul. 2010].

(Estilo livro)

- [5] Arens AA. *Auditoria na Austrália: uma abordagem integrada*. 5ª ed., Frenchs Forest: Pearson Education Australia; 2002.
- [6] Simons NE, Menzies B, Matheus M. Um curso de curta duração em *Engenharia de Solos e Taludes Rochosos*. Londres: Thomas Telford Publishing; 2001.

(Capítulo de livro)

- [7] Chen WK. *Redes e Sistemas Lineares*, Belmont, CA: Wadsworth, 1993, pp. 123–135.
- [8] Pobre H. *Uma Introdução à Detecção e Estimativa de Sinais*; Nova Iorque: Springer-Verlag, 1985, cap. 4.

(Estilo de livro com título e editor)

- [9] Scholtz RA. O conceito de espectro espalhado. In: *Acesso Múltiplo*. Piscataway, NJ: IEEE Press, 1993, cap. 3, pp. 121-123.
- [10] Jovem vai. Estrutura sintética de plásticos industriais. In" *Plásticos*, 2ª ed., vol. 3, Peters J, Ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1964, pp. 15-64.

(Publicado no estilo Anais da Conferência)

- [11] Kasmani MB. Um Estudo Sociolinguístico da Harmonia Vogal em Persa (Diferentes Grupos Etários Uso da Perspectiva da Harmonia Vogal. *International Proceedings of Economics Development and Research*, ed. Chen Dan, pp. 359-366, vol. 26, Singapura, 2011.
- [12] Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editores. Tumores de células germinativas V. *Anais da 5ª Conferência de Tumores de Células Germinativas*; 13 a 15 de setembro de 2001; Leeds, Reino Unido. Nova Iorque: Springer; 2002.

(Estilo de Tese ou Dissertação)

- [13] Williams J. Analisador de banda estreita. Tese de Doutorado. Universidade de Harvard; 1993.
- [14] Kawasaki N. Estudo paramétrico do fluxo térmico e químico de bocais de não-equilíbrio. Tese de Mestrado, Universidade de Osaka 1993.

(Estilo patente)

- [15] J. P. Wilkinson. Dispositivos de circuito ressonante não linear. U.S. Patent 3 624 12, 16 de julho de 1990.

(Estilo padrão)

- [16] *Símbolos de letras para quantidades*. Padrão ANSI Y10.5-1968.
- [17] Instituição Britânica de Normalização. BS EN 1993-1-2:2005. Eurocódigo 3. *Projeto de estruturas metálicas. Regras gerais. Projeto estrutural de incêndio*. Londres: BSI; 2005.

(Estilo manual)

- [18] *Transmission Systems for Communications*, 3ª ed., Western Electric Co., Winston-Salem, NC, 1985, pp. 44-60.
- [19] *Manual de dados Motorola Semiconductor*, Motorola Semiconductor Products Inc., Phoenix, AZ, 1989.

(Artigos não em inglês)

- [20] Forneau E, Bovet D. Pesquisa sobre a ação simpaticolítica de um novo derivado de dioxano. *Arch Int Farmacodina*. 1933;46:178–191. Francês.

(Página Web/ Website)

- [21] Wikipedia.org. *Introdução à relatividade geral [Internet]. 2021* [atualizado 28 de maio de 2021; citado em 13 de julho de 2021]. [9 telas]. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Introduction_to_general_relativity.
- [22] Universidade de Tecnologia de Queensland. *Redação de revisões de literatura*. [Internet] 2010 [atualizado 2020 jun 23; citado 2020 dez 6]; Disponível em: <http://www.citewrite.qut.edu.au/write/litreviews.jsp>.

(Todos os autores podem incluir biografias com fotos ao final dos trabalhos regulares.)

Author's formal photo

Primeiro A. O autor e os demais autores podem incluir biografias ao final dos trabalhos regulares. O primeiro parágrafo pode conter um local e/ou data de nascimento (local da lista, depois data). A seguir, é listada a formação acadêmica do autor. Os diplomas devem ser listados com o tipo de diploma em que área, qual instituição, cidade, estado ou país, e ano de graduação foram obtidos. O campo de estudo principal do autor deve ser minúsculo.

O segundo parágrafo usa o pronome da pessoa (ela) e não o sobrenome do autor. Ele lista experiência militar e de trabalho, incluindo empregos de verão e de bolsa. Os cargos estão em maiúsculas. O trabalho atual deve ter um local; os cargos anteriores podem ser listados sem um. Informações sobre publicações anteriores podem ser incluídas. Tente não listar mais de três livros ou artigos publicados. O formato para listar editores de um livro dentro da biografia é o título de um livro (cidade, estado: nome da editora, ano) semelhante a uma referência. Interesses de pesquisa atuais e anteriores encerram o parágrafo.

O terceiro parágrafo começa com o título e sobrenome do autor (por exemplo, Dr. Smith, Prof. Jones, Mr. Kajor, Ms. Hunter). Listar quaisquer membros de sociedades profissionais que não a IAENG. Por fim, liste os prêmios e trabalhos para comitês e publicações. Se uma fotografia for fornecida, a biografia será recuada em torno dela. A fotografia é colocada no canto superior esquerdo da biografia. Hobbies pessoais serão excluídos da biografia.