



UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara



RENATA SERIGNOLI FRANCISCONI

**Efeito do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e de seu principal  
componente Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans*  
resistentes**

Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara



RENATA SERIGNOLI FRANCISCONI

**Efeito do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e de seu principal componente Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Dentística, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio

Araraquara

2014

**RENATA SERIGNOLI FRANCISCONI**

**Efeito do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e de seu principal componente Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Madalena Palomari Spolidorio

**2º examinador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Duque

**3º examinador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Maria Puppim-Rontani

**Araraquara, 12 de março de 2014.**

## **DADOS CURRICULARES**

RENATA SERIGNOLI FRANCISCONI

**Nascimento:** 29/12/1987, Jaú, SP

**Filiação:** Luiz Armando Francisconi

Isabel Cristina Serignoli Francisconi

**2007-2011:** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara  
FOAr/UNESP

**2008-2009:** Estágio de Iniciação Científica em Informática pela Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

**2009-2011:** Estágio de Iniciação Científica em Patologia pela Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

**2013-2013:** Estágio Docência em Patologia Geral pela Faculdade de Odontologia de  
Araraquara – FOAr/UNESP

**2013-2013:** Estágio Docência em Dentística Restauradora pela Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

**2013-2013:** Estágio Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de  
Araraquara – FOAr/UNESP

**2012-** : Especialização em Ortodontia pela Faculdade Mozarteum de São Paulo  
(Gestos – Araraquara)

**2012-2014:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Dentística Restauradora, nível Mestrado pela faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

## **DEDICATÓRIA**

### **Ao Senhor meu Deus**

Agradeço a Deus, que me confiou a vida e tudo que nela tenho. Pela fé, esperança e força concedida em todos os momentos. Agradeço por mais esta benção concedida.

### **Aos meus pais, Luiz Armando e Cristina**

Que me passaram a base de uma vida honrada e honesta e que me ensinaram a lutar sempre para ser melhor hoje do que no dia de ontem. As palavras são poucas para expressar tamanho amor e admiração que tenho por vocês. Talvez não consiga agradecer o suficiente ou até mesmo o devido. Espero que um dia eu possa retribuir tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim.

### **À minha irmã, Patrícia**

Minha melhor amiga que me acompanha em todos os momentos e participou ativamente nessa conquista. Agradeço pelo seu companheirismo e apoio em todos os momentos.

### **Ao meu namorado, amigo e companheiro Antônio João (Tony)**

Que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, incentivando e trabalhando junto. Por todo amor, carinho e paciência.

**Amo muito vocês!**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À família Spolidorio (Luis, Denise, Fernando e Eduardo), pelo carinho demonstrado; vocês me acolheram como sendo da família abrindo as portas de sua casa para tornar-se a minha casa também. Sou inteiramente grata a vocês. Muito Obrigada.

À Denise, responsável direta pelos meus primeiros passos na Pós-graduação. Agradeço a amizade, confiança, oportunidade de trabalhar e crescer com todo o apoio e dedicação. Agradeço diariamente pela Mestre com a qual tive a oportunidade de trabalhar por vários anos.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, representados pela digníssima Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon; e pela Vice-Diretora Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representada pelo Chefe de Departamento Prof. Fábio Luiz Camargo Villela e pelo Vice-Chefe Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Aos amigos e funcionários José Antônio (Zé), Juliana e as técnicas Aline, Laura pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho sempre com muita alegria, paciência e disposição.

Às minhas amigas Arlete, Leia, Joyce, Priscila, Sâmara, Carolina Santezi, Cristina, Marina, Héliida, Mariana, Kéren, Vanessa, Adriana, Laura pela amizade e companheirismo.

À Família Laboratório de Microbiologia, Nicole, Marília, Caroline, Patrícia, Ester, Juliana, Aline, Telma pelo ótimo convívio diário e colaboração nas etapas do meu mestrado.

Às amigas e companheiras de laboratório Érica Dorigatti, Renata Estrela, Rosa, Profa. Fernanda, Profa. Elisa pela companhia e ensinamentos.

Aos alunos de Iniciação Científica, Ester Bordini, Caroline Tonon e Pedro Sundfeld por serem ótimos alunos, no qual tive a oportunidade de conviver, ensinar e aprender durante esses anos.

À minha amiga Janaína Sardi, Amanda Fontana e Amanda Wady que colaboraram intensamente com seus conhecimentos e com sua amizade.

À minha prima Camila que esteve comigo durante todos os momentos, pela amizade e que esteve me apoiando e ajudando.

À minha amiga e companheira de casa Marina, pela amizade e ótimo convívio diário.

Ao Cnpq pela ajuda financeira através da bolsa de mestrado.

À FAPESP, pela ajuda financeira através da bolsa e da reserva técnica.

À todos os meus amigos pelo companheirismo. Agradeço o apoio e as palavras de incentivo, pois vocês nunca serão esquecidos.

E à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Francisconi RS. Efeito do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e de seu principal componente Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) é um extrato de ação antifúngica e preventiva em escala farmacêutica ou cosmética. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do TTO e Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans*. Este estudo foi realizado em três fases: 1- Identificação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) do TTO (0,25 a 2%) e Terpinen-4-ol (0,11 a 0,95%) sobre *C. albicans* na forma planctônica. 2- Análise das diferentes concentrações do óleo sobre biofilme monoespécie de *C. albicans* por meio da contagem das UFC/mL e avaliação da atividade metabólica das células pelo método colorimétrico de XTT. 3- Análise da ação inibitória das soluções de TTO e Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *C.albicans* (cepa padrão e isolados clínicos) formados em corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente cobertos com saliva humana, por meio do teste de XTT e por microscopia confocal de varredura à laser (MCVL). A nistatina (Sigma) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que isolados de *C. albicans* planctônicos foram sensíveis ao TTO 1%, Terpinen-4-ol 0,47% e Nistatina 8 µg/mL. As menores concentrações fungicidas para os isolados foram TTO 2 %, Terpinen-4-ol 0,95 % e Nistatina 16 µg/mL. Quando analisado em biofilme através da quantificação (UFC/mL) e teste de XTT as concentrações de TTO 2 % e Terpinen-4-ol 0,95 % foram eficazes quando comparado ao controle, sendo que as amostras da genotipagem A2 e B1 foram as mais resistentes. Os resultados de MCVL mostraram que todos os biofilmes desenvolvidos em corpos de resina acrílica apresentaram-se semelhantes à ação da Nistatina. Os extratos avaliados apresentaram ação antifúngica para os isolados clínicos e podem ser considerados tratamento alternativo para paciente com candidíase.

**Palavra-chaves:** Óleo de *Melaleuca*, *Candida albicans*, biofilme

Francisconi RS. Effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component Terpinen-4-ol against clinical isolates of *Candida albicans* resistant [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## **ABSTRACT**

The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (TTO) is an extract of antifungal action and preventive in pharmaceutical or cosmetic scale. The aim of this study was to evaluate the efficacy of TTO and Terpinen-4-ol against clinical isolates of *Candida albicans*. This study was conducted in three phases: 1- Identification of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and CFM (Minimum Fungicidal Concentration) of TTO (0.25 to 2%) and Terpinen-4-ol (0.11 to 0.95 %) on *C. albicans* in planktonic form . 2- Analysis of different concentrations of oil on *C. albicans* biofilm single species by counting CFU/mL and evaluation of the metabolic activity of cells by XTT colorimetric method. 3- Analysis of the inhibitory action of TTO and Terpinen-4-ol solutions on *C. albicans* biofilms (standard strain and clinical isolates) formed in specimens of polymerizable resin acrylic microwave previously coated with human saliva , by means of the XTT test and confocal laser scanning microscopy (CLSM) . The nystatin (Sigma) was used as a positive control. The results showed that isolates of *C. albicans* planktonic were sensitive to TTO 1%, Terpinen-4-ol 0.47% and Nystatin 8 mg/mL. The smaller fungicidal concentrations for the isolates were TTO 2%, Terpinen-4-ol 0.95% and Nystatin 16 mg / mL. When analyzed by quantifying biofilm (CFU / ml) and XTT test, the concentrations TTO 2% and Terpinen-4-ol 0.95% were effective when compared to the control, and genotyping of samples A2 and B1 were more resistant. The CLSM results showed that all biofilms developed in bodies of acrylic resin were similar to the action of Nystatin. The extracts showed antifungal action for the clinical isolates and can be considered an alternative treatment for patients with candidiasis.

Key Word : Oil of *Melaleuca* , *Candida albicans*, biofilm

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>3 CAPÍTULO .....</b>	<b>20</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>6 APÊNDICES .....</b>	<b>54</b>

# *Introdução*



## 1 INTRODUÇÃO

O interesse em plantas medicinais para tratamento de diversas doenças tem aumentado nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80% da população utiliza medicamentos naturais, pois é uma alternativa acessível, eficaz para diversos tratamentos, de fácil manipulação e utilização (Oliveira et al.<sup>16</sup>, 2011).

Esses produtos mostram ser fármacos potencialmente interessantes, no que se refere a sua atividade antimicrobiana ou antifúngica (Carson et al.<sup>3</sup>, 2006). Dentre eles se destaca o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também conhecido como TTO (tea tree oil) que possui amplo espectro de ação contra bactérias e fungos (Mondello et al.<sup>13</sup>, 2006; Traboulsi et al.<sup>24</sup>, 2008; Catalán et al.<sup>3</sup> 2008 ; Oliveira et al.<sup>16</sup>, 2011; Hammer et al.<sup>10</sup>, 2012; Ninomiya et al.<sup>14</sup>, 2012; Sudjana et al.<sup>23</sup>, 2012).

Esse óleo é composto por aproximadamente 100 componentes, sendo os principais o terpinen-4-ol, 1,8-cineole,  $\gamma$ -terpinen e  $\alpha$ -terpinen (Cox et al.<sup>5</sup>, 2001; Hammer et al.<sup>8</sup>, 2004). A atividade antimicrobiana do óleo é atribuída, principalmente, ao terpinen-4-ol, presente em concentrações de 30 a 40%, sendo responsável pela indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia bacteriana (Oliveira et al.<sup>16</sup>, 2011).

A porcentagem de cada componente é estabelecida pela Norma Internacional (ISO 4730) (Hammer et al.<sup>8</sup>, 2004) e sua composição é analisada por cromatografia gasosa a fim de verificar se o TTO está dentro na norma estabelecida (Carson et al.<sup>2</sup>, 2006). Há um grande interesse no uso de plantas com ação antimicrobiana na Odontologia. O óleo de *Melaleuca alternifolia* tem mostrado ação bactericida e fungicida contra diversos microrganismos da cavidade bucal (Hammer et al.<sup>12</sup>, 2003; Oliveira et al.<sup>16</sup>, 2011; Ninomiya et al.<sup>14</sup>, 2012). Há evidências científicas que o TTO possa ser utilizado na manutenção da higiene e prevenção de doenças bucais, como

proposto por Hammer et al.<sup>7</sup> (2003), que avaliaram a ação do óleo *Melaleuca alternifolia* sobre isolados bacterianos bucais, concluindo que o óleo poderia ser utilizado em produtos de higiene bucal, como bochecho ou pastas.

Da mesma maneira, Kulik et al.<sup>11</sup> (2000) avaliaram a atividade bacteriostática e bactericida/fungicida *in vitro* da solução de TTO sobre diferentes microrganismos bucais, concluindo que o óleo possui ação contra fungos e bactérias da cavidade oral.

Dentre as doenças bucais mais comuns, deve-se destacar as infecções fúngicas que ocorrem principalmente em pacientes portadores de próteses dentárias. Estas são constituídas por resina acrílica e, por sua vez, são sítios favoráveis para sítios favoráveis à adesão de microrganismos. Além disso, traumatismos ocasionados por próteses mal adaptadas, má higiene, dimensão vertical inadequada são causas que levam os pesquisadores a associarem a presença de prótese a processos patológicos na cavidade bucal (Suárez, Andreu<sup>22</sup>, 2003).

A infecção fúngica mais importante da cavidade bucal é a candidíase que é uma infecção causada pela levedura do gênero *Candida* e, na dependência de fatores predisponentes, torna-se patogênico (Da Silva et al.<sup>6</sup>, 2008). É a infecção oportunista mais comum associada a lesões bucais, fortemente correlacionada com a deficiência do sistema imune, podendo desenvolver lesões recidivantes e de difícil tratamento. Existem outros fatores que influenciam o aparecimento de candidíase bucal, tais como hipossalivação, diabetes mellitus, utilização de próteses, antibioticoterapia, radioterapia e corticoterapia prolongada (Spolidorio et al.<sup>21</sup>, 2001; Chami et al.<sup>4</sup>, 2004).

A espécie de maior importância clínica, pelo fato de ser o agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade bucal, é *C. albicans* e sua ocorrência neste local representam 60 a 70% dos isolados. *C. albicans* apresenta alguns fatores de virulência, tais como a capacidade de aderência aos tecidos bucais, habilidade

de produzir enzimas hidrolíticas (proteínases e fosfolipases) (Rörrig et al.<sup>18</sup>, 2009), fatores de invasão tecidual e mecanismos de escape do sistema de defesa do hospedeiro (Shinobu et al.<sup>20</sup>, 2007). A rápida identificação das espécies envolvidas nas doenças é essencial para um tratamento rápido e específico, por isso há o interesse em novos testes para identificação molecular dos microrganismos.

Avanços tecnológicos baseados na biologia molecular têm permitido o aumento de informações sobre a diversidade genética de *C. albicans*. Os genótipos existentes têm sido associados com diferentes locais de infecção, bem como, com a susceptibilidade a antifúngicos (Shinobu et al.<sup>20</sup>, 2007).

Muitas drogas antifúngicas estão disponíveis, como a anfotericina B, nistatina e fluconazol. Entretanto, tem sido observado o aumento na frequência de infecções, que se tornaram resistentes à terapia antifúngica padrão, devido ao uso intensivo e repetitivo de antifúngicos (Chami et al.<sup>4</sup>, 2004). Assim, para evitar o aparecimento de microrganismos resistentes, os medicamentos devem ser indicados corretamente. Dentre eles, a Nistatina, é o padrão ouro para o tratamento de candidíase bucal, com características fungicida e fungistática e atua desestruturando a membrana celular de fungos e leveduras, agindo na permeabilidade da membrana celular (Lavra et al.<sup>12</sup>, 2008). Porém, pelo fato de alguns fungos serem resistentes a esses medicamentos, o uso de plantas medicinais poderia ser uma alternativa terapêutica.

Dessa forma, diversos autores avaliaram a eficácia terapêutica do óleo *Melaleuca alternifolia* e/ou de seu principal componente, terpinen-4-ol na cavidade bucal. Ninomiya et al.<sup>14</sup> (2012) demonstraram redução dos sinais clínicos de candidíase e dos níveis de *Candida* em ratos. Sudjana et al.<sup>23</sup> (2012) demonstraram que baixas quantidades de TTO diminuem a adesão de *Candida* spp. em células humanas, diminuindo a formação de biofilme e a hidrofobicidade da superfície celular.

Avaliando a susceptibilidade de *Candida* spp. ao TTO, Vazquez et al.<sup>26</sup> (2000) e Vazques, Zawawi<sup>27</sup> (2002) demonstraram atividade contra espécies de *Candida* do óleo e de soluções com ou sem álcool de *Melaleuca alternifolia*.

O óleo tem demonstrado excelentes resultados microbiológicos, porém deve ser utilizado com cautela a fim de evitar interações medicamentosas indesejadas. Com o objetivo de verificar essas possíveis interações, van Vurren et al.<sup>25</sup> (2009), examinaram o efeito da associação de produtos naturais (*Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis*) e antimicrobianos convencionais (ciprofloxacina/anfotericina B) que mostram variadas interações (sinérgicos, aditivos e/ou antagonistas), embora a eficácia seja dependente da presença de ambos. Esses autores verificaram que houve antagonismo entre TTO e anfotericina, quando utilizados simultaneamente. Porém, Rosato et al.<sup>19</sup> (2008) observaram um possível efeito sinérgico anti-*Candida* entre *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* e os compostos antifúngicos de anfotericina B. A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de diluição em ágar em linhagens de *Candida*. Portanto, há controvérsia nos resultados e por isso essas interações devem ser muito bem estudadas antes de prescrevê-las.

Apesar dos diversos estudos que confirmam seu poder antimicrobiano, há pouca evidência científica sobre o potencial tóxico do TTO. Hammer et al.<sup>9</sup> (2006), concluíram que altas concentrações de TTO causam irritação na pele e reações alérgicas em indivíduos predispostos. Porém, se utilizado em concentrações baixas, esses sintomas podem ser evitados.

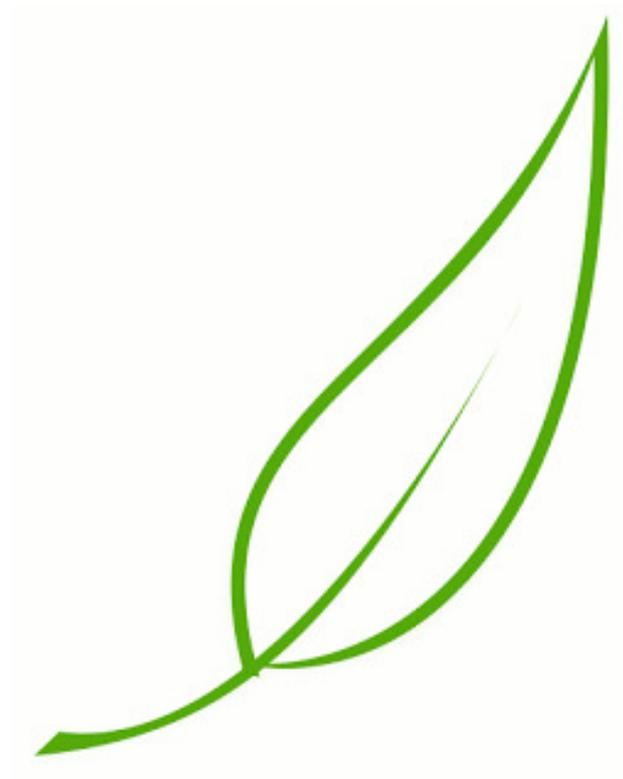
A citotoxicidade do óleo para diversos tipos celulares foi avaliada por Hammer et al.<sup>9</sup> (2006) atribuindo ao terpinen-4-ol, seu principal componente, a atividade antimicrobiana (Oliva et al.<sup>15</sup>, 2003) e citotóxica (Hammer et al.<sup>9</sup>, 2006), podendo estar

relacionadas à propriedade dos terpenos, a alteração na fluidez de membranas (Hammer et al.<sup>8</sup>, 2004). Porém, o perfil tóxico do óleo indica que são raras as reações quando TTO não é ingerido. As reações são dose-dependentes, sendo que a concentração de 100% deve ser evitada, principalmente em crianças por apresentarem baixo peso e consequentemente maiores efeitos tóxicos sobre o organismo (Hammer et al.<sup>9</sup>, 2006)

As citotoxicidades do TTO e Terpinen-4-ol foram avaliadas em ceraticócitos imortalizados (OKF6/TERT2) por Ramage et al.<sup>17</sup> (2012) e os resultados afirmam que a citotoxicidade aumenta conforme aumenta o tempo de contato (tempo-dependente).

Com base na literatura apresentada e no aumento da resistência das espécies de *Candida* aos tratamentos convencionais, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação inibitória do óleo TTO e seu componente Terpinen-4-ol sobre cultura plactônica e biofilme de cepas padrão e isolados clínicos de *Candida albicans*.

*Proposição*



## **2 PROPOSIÇÃO**

### **Proposição Geral**

Avaliar a ação inibitória do óleo TTO e seu componente Terpinen-4-ol sobre cultura planctônica e biofilme de cepas padrão e isolados clínicos de *Candida albicans*.

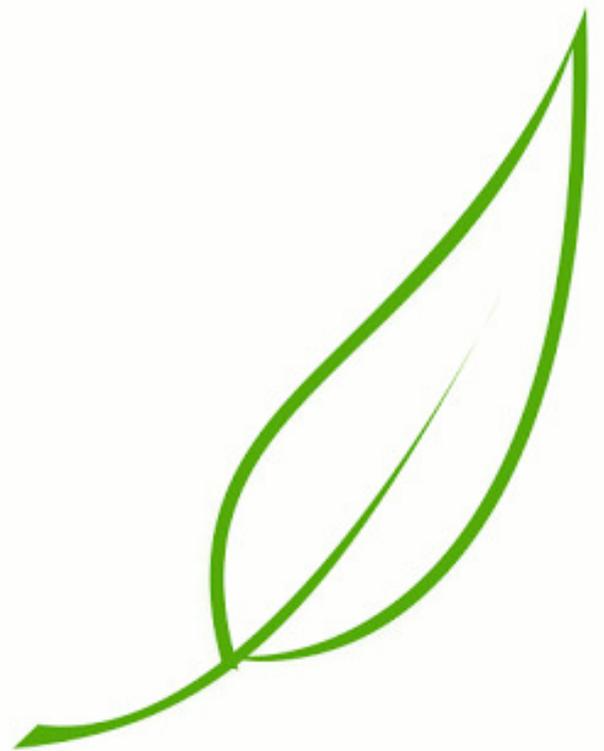
### **Proposição Específica**

- Identificar a CIM e CFM do TTO e Terpinen-4-ol sobre culturas planctônicas de *Candida albicans*.

- Avaliar a atividade inibitória de diferentes concentrações do óleo e do Terpinen-4-ol sobre biofilmes monoespécies de *C. albicans* por meio da contagem das UFC/mL e avaliação da atividade metabólica das células pelo método colorimétrico de XTT;

- Avaliar a ação das soluções de TTO e Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *C. albicans* (cepas padrão e isolados clínicos) formados em corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente cobertos com saliva humana, por meio do teste de XTT e por microscopia confocal de varredura à laser (MCVL).

*Capítulo*



### 3 CAPÍTULO

#### **Ação antifúngica do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e de seu principal componente Terpinen-4-ol sobre cepas de referências e isolados clínicos de *Candida albicans* \***

R.S. Francisconi<sup>a</sup>, M.N.M. Nogueira<sup>b</sup>, C.C. Tonon<sup>b</sup>, M.F. Correia<sup>c</sup>, Sardi J.C.O.<sup>d</sup>, D.M.P. Spolidorio<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Rodovia Washington Luis, Km 01, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>e</sup> Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

**\* Autor para Correspondência**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Department of Physiology and Pathology / Laboratory of Microbiology e Biology Molecular

Street Humaitá, 1680 – Zip Code: 14.801-903, Araraquara, SP - Brazil

Phone: + 55 (16) 3301-6402 / FAX: + 55 (16) 3301-6488

e-mail: dmps@foar.unesp.br

**Título abreviado:** TTO e isolados clínicos de *Candida albicans*.

\* O artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Phytomedicine*.

## RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) é um extrato de ação antifúngica e preventiva em escala farmacêutica ou cosmética. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do TTO e Terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans*. Este estudo foi realizado em três fases: 1- Identificação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) do TTO (0,25 a 2%) e Terpinen-4-ol (0,11 a 0,95%) sobre *C. albicans* na forma planctônica. 2- Análise das diferentes concentrações do óleo sobre biofilme monoespécie de *C. albicans* por meio da contagem das UFC/mL e avaliação da atividade metabólica das células pelo método colorimétrico de XTT. 3- Análise da ação inibitória das soluções de TTO e Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *C. albicans* (cepa padrão e isolados clínicos) formados em corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável previamente cobertos com saliva humana, por meio do teste de XTT e por microscopia confocal de varredura à laser (MCVL). A nistatina (Sigma) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que isolados de *C. albicans* planctônicos foram sensíveis ao TTO 1%, Terpinen-4-ol 0,47% e Nistatina 8 µg/mL. As menores concentrações fungicidas para os isolados foram TTO 2 %, Terpinen-4-ol 0,95 % e Nistatina 16 µg/mL. Quando analisado em biofilme através da quantificação (UFC/mL) e teste de XTT as concentrações de TTO 2 % e Terpinen-4-ol 0,95 % foram eficazes quando comparado ao controle, sendo que as amostras da genotipagem A2 e B1 foram as mais resistentes. Os resultados de MCVL mostraram que todos os biofilmes desenvolvidos em corpos de resina acrílica apresentaram-se semelhantes à ação da Nistatina. Os extratos avaliados apresentaram ação antifúngica para os isolados clínicos e podem ser considerados tratamento alternativo para paciente com candidíase.

**Palavra-chaves:** Óleo de *Melaleuca*, *Candida albicans*, biofilme

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde 80% depende da utilização de plantas para tratamento primário. Isso se justifica pelo fato de ser uma alternativa eficaz, acessível e de fácil manipulação. (Oliveira et al., 2011)

Dentre esses compostos o óleo essencial, TTO (tea tree oil), possui efeito antibacteriano de amplo espectro, antifúngico, antiviral e anti-inflamatório comprovado e, segundo a norma internacional ISO 4730, deve ser obtido por destilação a vapor das folhas de *Melaleuca alternifolia* com teor mínimo de 30% do terpinen-4-ol e teor máximo de 15% de 1,8-cineol. O TTO possui propriedades antimicrobianas (Oliveira et al., 2011; Hammer et al. 2003) e o Terpinen-4-ol é o seu principal componente. TTO age em membranas biológicas, danificando a integridade da mesma e inibe a ação de enzimas incorporada à membrana aumentando sua fluidez, com subsequente extravasamento de componentes intracelulares (Cox and Markham, 2007)

O TTO demonstra amplo espectro de atividades biológicas, inclusive por grande variedade de microrganismos podendo ser utilizado para melhorar estratégias de tratamento de infecções crônicas, como por exemplo, a candidíase. *Candida albicans* é um fungo presente normalmente na pele, membranas mucosas, cavidade oral e pode se disseminar para todo o organismo e em indivíduos sadios comportam-se como oportunistas. O medicamento conhecido como padrão ouro de infecções fúngicas orais causadas por *C.albicans* é a nistatina. (Lavra et al., 2008) Porém, pela capacidade de aderência, fatores de invasão tecidual e mecanismos de escapar do sistema de defesa, há relatos na literatura que existem *C.albicans* resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado. (Shinobu et al., 2007) Por isso, existe um grande interesse em tratamentos alternativos, ou associação de novos medicamentos para o controle mais efetivo desse tipo de infecção.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação do óleo de *Melaleuca alternifolia* e de seu principal componente Terpinen-4-ol sobre cepas de referências e isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Cepas de *Candida albicans* utilizadas no estudo**

Foram utilizados dois isolados clínicos da genotipagem A, dois isolados da genotipagem B coletados de pacientes diabéticos com periodontite crônica (Comitê de Ética 062/2008), a cepa SC 5314 e a cepa de referência ATCC 90028 *C. albicans*. (Sardi et al., 2012)

### **Reativação das espécies**

Os isolados foram reativados em 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) pH 7.0 (0.165 M MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico)), acrescido com 2 % de glicose e mantidos a 37°C por 18 h. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e as células lavadas 2 vezes com solução salina estéril. Em seguida, o material resultante teve sua densidade óptica ajustada a 600 nm (Eppendorf Biophotometer), para uma solução estoque de  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Westwater et al., 2005; Silva et al., 2008).

### **Reagentes**

TTO e Terpinen-4-ol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A concentração dos componentes foi determinada pela análise de cromatografia gasosa (proporção especificada pelo padrão internacional ISO 4730) (APÊNDICE 1 e 2). TTO e terpinen-4-ol foram diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e DMSO (Dimethyl sulfoxide) 0,4 % (Sigma, MO, USA) como agente solubilizante (Traboulsi et al., 2008). O TTO foi utilizado nas concentrações que variaram de 0,25 % a 2 % e o Terpinen-4-ol variou de 0,11 % a 0,95 %. O intervalo das

concentrações foi estabelecido segundo a literatura (Hammer et al., 2004; Bagg et al., 2006).

A solução de Nistatina (Sigma, MO, USA) foi preparada (em DMSO) como solução estoque na concentração de 64 µg/mL e posteriormente diluída em 10 soluções intermediárias que variaram entre 0,03125 – 64 µg/mL segundo a norma M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

### **Análise antimicrobiana do TTO e Terpine-4-ol em cultura planctônica**

#### *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A CIM, foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (segundo a norma M27-A2 do CLSI) utilizando placa de microtitulação (96-poços). Os grupos experimentais foram *C.albicans* com as diversas concentrações do TTO e Terpinen-4-ol e os grupos controles foram os microrganismos em meio RPMI, *C. albicans* com DMSO e as concentrações de Nistatina.

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço recebeu separadamente 200 µL das diluições do óleo e de sua porção solúvel e 2 µL da suspensão de cada amostra de *C. albicans* que resultou numa concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em mesa agitadora a 75 rpm (Incubadora, 430, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) e posteriormente foram avaliados visualmente e por absorbância a 590 nm (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França). (Hasenoehrl et al., 2006). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

### *Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)*

Dos poços que não mostraram crescimento visível, ou seja,  $DO_{600nm} \leq 0.05$ , foram retirados 10  $\mu$ L das amostras e plaqueadas em meio de cultura Saboraud Dextrose Agar (SDA) e mantidas a 37°C por 48 horas.

A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento.

### **Análise antimicrobiana do TTO e do Terpinen-4-ol em biofilme**

#### *Formação do biofilme*

A formação do biofilme foi desenvolvida como descrito por Thein et al. (2007). Culturas foram reativadas e o biofilme foi realizado em placa de 96 poços com única espécie (SSB: single-species biofilms), sendo nove poços ( $n = 9$ ) para cada grupo experimental e controle. Os grupos experimentais foram *C. albicans* com as diferentes concentrações do TTO e do Terpinen-4-ol preparadas. Os grupos controles foram os microrganismos com o meio RPMI, suspensões de *C. albicans* com DMSO (para demonstrar que o DMSO não interfere no crescimento), e as concentrações de nistatina. Foram aplicados 100  $\mu$ L das suspensões isoladas de *C. albicans* em placa de microtitulação. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos (fase de adesão). Após o período de adesão, a suspensão celular foi aspirada e o poço foi lavado duas vezes com solução salina estéril para a remoção de microrganismos não aderidos.

Em seguida, 100  $\mu$ L de RPMI 1640 foram adicionados para promover o crescimento do biofilme e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h a 75 rpm. Após 24h, o RPMI 1640 foi trocado por 100  $\mu$ l do mesmo meio para melhor crescimento do biofilme. As soluções do óleo, terpinen-4-ol e nistatina foram adicionadas após 48 horas de incubação do biofilme (Cao et al., 2008, Punithavathy et al., 2012).

### *Quantificação das células viáveis*

O método de contagem das células viáveis foi utilizado para avaliar a ação dos componentes sobre o biofilme. O biofilme foi lavado com salina estéril duas vezes e foi adicionado 100 µl de solução salina em cada poço. A massa do biofilme aderido foi raspada cuidadosamente, aspirada, colocada em solução salina e agitada por um minuto.

Essa suspensão foi diluída e inoculada em placas de meio de cultura SDA. As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas. Os resultados foram quantificados em UFC/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

### *Análise do metabolismo celular (Teste de XTT)*

O ensaio de XTT (Cox et al., 2001) é um teste colorimétrico e permite uma estimativa do metabolismo ativo microbiano por redução das enzimas desidrogenase presentes no sistema de transporte de elétrons em cristal solúvel em água, o formazano. O sal de XTT (Sigma, MO, USA) foi preparado em água ultra purificada na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi filtrada e estocada a -80 °C até o uso. Solução de menadiona (Sigma, MO, USA) foi preparada em acetona a 0.4 mM anteriormente ao experimento (Silva et al., 2001). Após as 24 horas de ação dos componentes (TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina) sobre as amostras fúngicas, as soluções foram removidas e os poços foram lavados 2 vezes com solução salina estéril. Cada poço recebeu 200 µL de solução de XTT (contendo 158 µL de PBS com 200 mM glicose, 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona diluída). As placas foram incubadas por 3 h no escuro a 37 °C. A absorbância foi determinada em 492 nm por espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

## **Análise da ação do TTO e do Terpinen-4-ol em biofilme desenvolvido na superfície de resina acrílica**

### *Obtenção dos corpos de prova de resina acrílica*

Os corpos de prova (n = 160) de resina acrílica (Vipi Wave) foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas, com cavidades de 10 mm de diâmetro por 2 mm de profundidade. As amostras foram submetidas à avaliação da rugosidade superficial (Ra) (0,2 $\mu$ m) pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surfest SJ-401, Mitutoyo Corporation, Japão) e distribuídos nos grupos experimentais e controle, a partir destes valores, por aleatorização por restrição. O valor de 0,2  $\mu$ m tem sido considerado como o limite de rugosidade média abaixo do qual a quantidade de adesão bacteriana não pode ser reduzida significativamente (Elter et al. 2008). Previamente ao experimento, as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno.

### *Coleta da saliva para formação de película adquirida*

Saliva humana não estimulada (CAAE 06687412.5.0000.5416) foi coletada por expectoração de um doador saudável de 30 anos de idade, voluntário, sem lesões de cárie ativas ou doenças periodontais. A saliva foi esterilizada por meio de dispositivos de filtração de uso único e armazenada a -70°C até o uso (Zamperini et al., 2010).

### *Formação do biofilme*

As amostras foram colocadas em poços da placa de microtitulação (24-wells) e adicionados 1.0 mL de saliva humana estéril por 1 hora para a formação da película adquirida. Posteriormente, foram removidas e suspensões de 1 mL de *C. albicans* foram dispensados em poços diferentes para formação do biofilme e incubados a 37°C por 1 hora e 30 minutos a 75 rpm. Após o período de adesão, a suspensão celular foi aspirada

e cada espécime foi lavado duas vezes com solução salina estéril e adicionados 700  $\mu$ L de RPMI 1640 e incubados por 48 horas, a 37°C e 75 rpm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

#### *Efeito do TTO, Terpinen-4-ol e da Nistatina*

Após a formação do biofilme, as amostras dos corpos de prova foram imersas nas soluções de TTO (2 %), Terpinen-4-ol (0,95 %), Nis (256  $\mu$ g/mL) e solução salina (0,9%) por 60 segundos, simulando o tempo de um enxaguatório bucal. Posteriormente, foram lavadas em solução salina e a viabilidade celular do biofilme resultante foi avaliada por ensaio de XTT e visualização dos mesmos por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

#### *Análise da viabilidade celular através do teste XTT*

Nove amostras (n = 9) de cada grupo controle e experimental foram lavadas e imersas em tubos contendo 1 mL de solução salina e submetidos à ultrassom (Cristófoli, Potência 160Watts/ Frequência ultrassônica 42 KHz) por 20 minutos. A suspensão resultante nos tubos foi centrifugada e ressuspensa em 1 mL de solução de XTT. Os tubos foram incubados por 3 h no escuro a 37° C. Duas alíquotas de cada poço (100  $\mu$ L cada) foram transferidas para placa de 96 poços e analisada em 492 nm por espectrofotômetro.

#### *Análise da viabilidade fúngica por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)*

Para identificação das células viáveis e não viáveis do biofilme formado sobre os corpos de prova, uma amostra de cada grupo experimental e controle foram analisados. Os blocos foram lavados duas vezes com solução salina. No momento da análise no

microscópio confocal laser, as amostras foram transferidas para poços da placa de microtitulação e coradas utilizando-se o kit Live/Dead Baclight - L7012 (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente 1,5 mL de solução A (SYTO 9) e 1,5 mL de solução B (Iodeto de Propídio) foram adicionados à 997 mL de água deionizada estéril e, após a homogeneização completa, 700 µL foram adicionados a cada poço contendo as amostras de resina com biofilme a ser analisados. Após aplicação dos corantes a placa foi fechada e envolta por papel laminado e mantidos a 37°C por 15 minutos. A seguir, as amostras foram posicionadas sobre lamínula, de modo a deixar a superfície a ser analisada em contato com a mesma, o que possibilitou a análise do biofilme formado em microscópio confocal (Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica TCS SPE). Sessões seriadas no plano xyz foram observadas.

### **Análise estatística**

Todos os dados foram analisados em relação à presença de outliers e quanto aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homogeneidade das variáveis (teste de Levene). Após avaliados esses pré-requisitos, utilizou-se ANOVA a um critério seguido pelo teste de Tukey para identificar a existência de diferenças significantes entre todos os tratamentos utilizados para cada cepa estudada e as variáveis dependentes analisadas foram: viabilidade celular do biofilme desenvolvida em placas de microtitulação e sobre corpos de prova (teste do XTT) e Unidades formadoras de colônia (UFC/ml) após serem transformadas em Log (UFC/ml). As análises inferenciais foram executadas com o software SPSS (v.17, SPSS Inc, Chicago, IL), considerando-se estatisticamente significativos os efeitos cujo p-value foi inferior ou igual a 0,05.

## RESULTADO

### Análise antimicrobiana do TTO e Terpinen-4-ol em cultura planctônica

A Tabela 1 mostra a ação antimicrobiana do TTO e Terpinen-4-ol em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que as concentrações capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* variaram entre 0,25 - 1% para o TTO, 0,11 - 0,95% para o Terpinen-4-ol e 2 - 8 µg/mL para a Nistatina. Em geral, houve maior resistência das cepas clínicas.

**Tabela 1** - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina sobre culturas planctônicas de *Candida albicans* (Análise Visual e Absorbância).

	TTO		Terpinen-4-ol		Nistatina	
	Análise Visual	Absorbância	Análise Visual	Absorbância	Análise Visual	Absorbância
<i>Candida albicans</i> (SC 5314)	1%	1%	0,47%	0,24%	4µg/mL	4µg/mL
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	1%	0,25%	0,24%	0,11%	8µg/mL	4µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem A1)	0,5%	0,25%	0,24%	0,11%	8µg/mL	4µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem A2)	1%	1%	0,47%	0,47%	8µg/mL	4µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem B1)	1%	1%	0,47%	0,24%	8µg/mL	2µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem B2)	1%	0,5%	0,47%	0,11%	8µg/mL	4µg/mL

A Tabela 2 ilustra a Concentração Fungicida Mínima capaz de inibir o crescimento das amostras. Houve uma variação de 1 - 2% para o TTO, 0,47 - 0,95% para o Terpinen-4-ol 0,95% e 4 - 16 µg/mL para Nistatina.

**Tabela 2** – Concentrações Fungicidas Mínima (CFM) do TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina sobre culturas planctônicas de *Candida albicans*

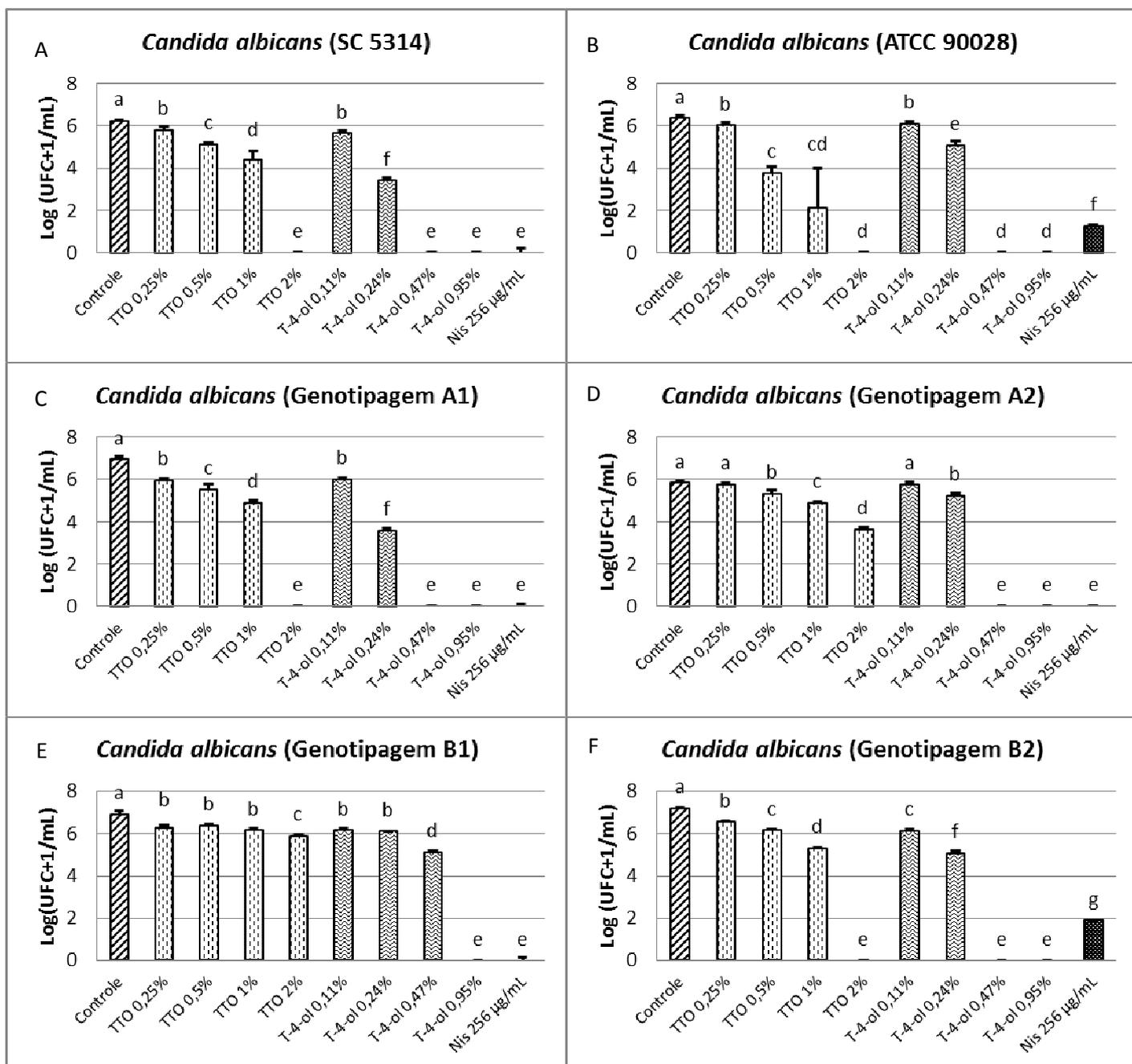
Espécies	TTO	Terpinen-4-ol	Nistatina
<i>Candida albicans</i> (SC 5314)	2%	0,47%	4 µg/mL
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	1%	0,47%	16 µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem A1)	1%	0,47%	8 µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem A2)	1%	0,47%	16 µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem B1)	2%	0,95%	16 µg/mL
<i>Candida albicans</i> (Genotipagem B2)	2%	0,95%	16 µg/mL

### Análise antimicrobiana do TTO e do Terpinen-4-ol em biofilme

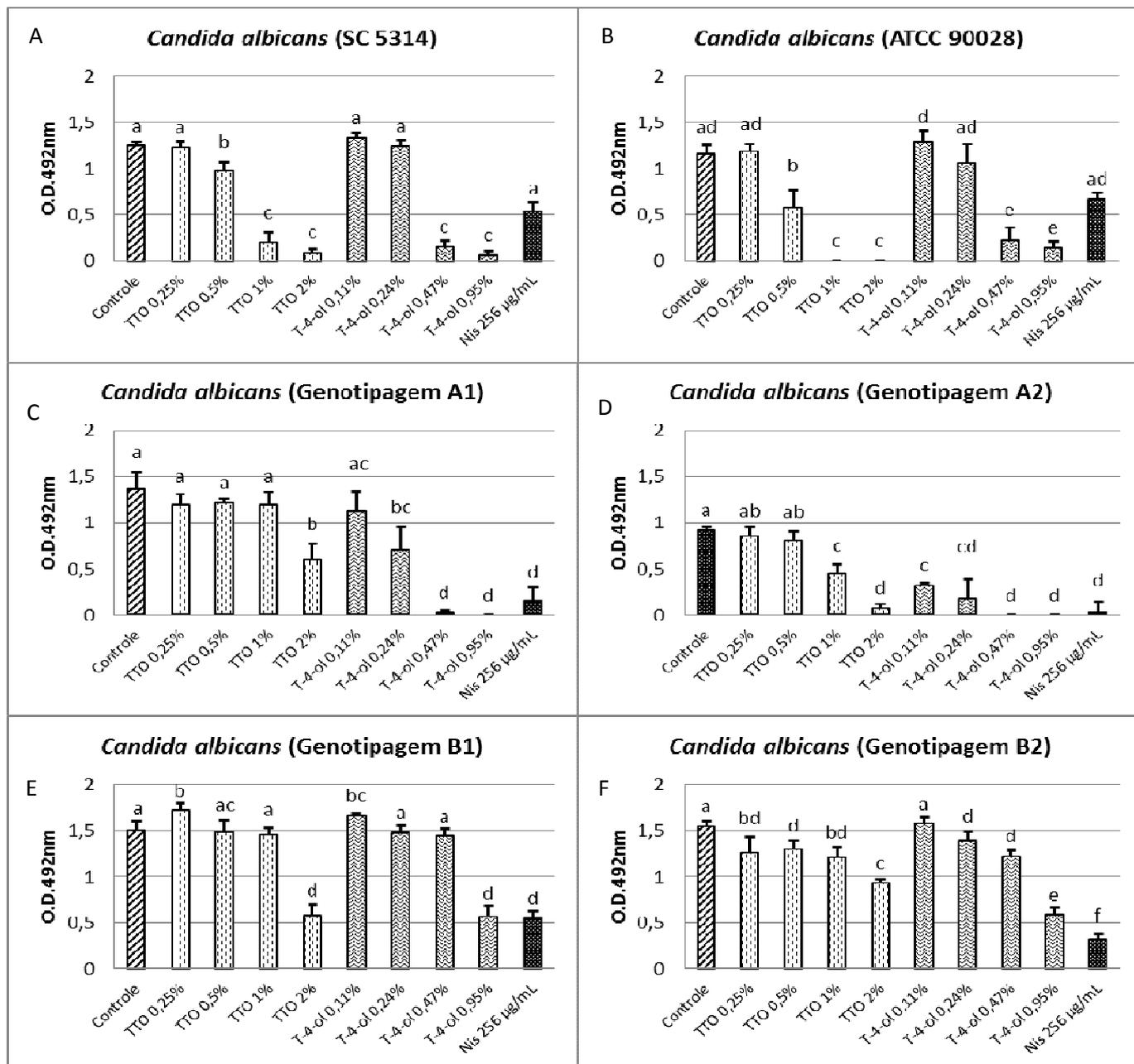
A Figura 1 e 2 ilustra o efeito do TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina na formação do biofilme por quantificação de células viáveis e por XTT. O TTO 2% eliminou todo o biofilme formado pelas amostras SC 5314, ATCC 90028, Genotipagem A1 e B2. Para *C. albicans* genotipagem A2 e B1 houve redução estatisticamente significativa quando comparado ao controle, mas não tão eficaz quando comparado à Nistatina.

O Terpinen-4-ol 0,47% eliminou todos os biofilmes formados, exceto para *C. albicans* Genotipagem B1. Dessa forma, considerou-se a concentração do Terpinen-4-ol 0,95% capaz de diminuir a viabilidade celular em todos os isolados.

As ações das diferentes concentrações da Nistatina estabelecidas pelas normas NCCLSI estão representadas nos APÊNDICES 3 e 4 (Figuras A e B).



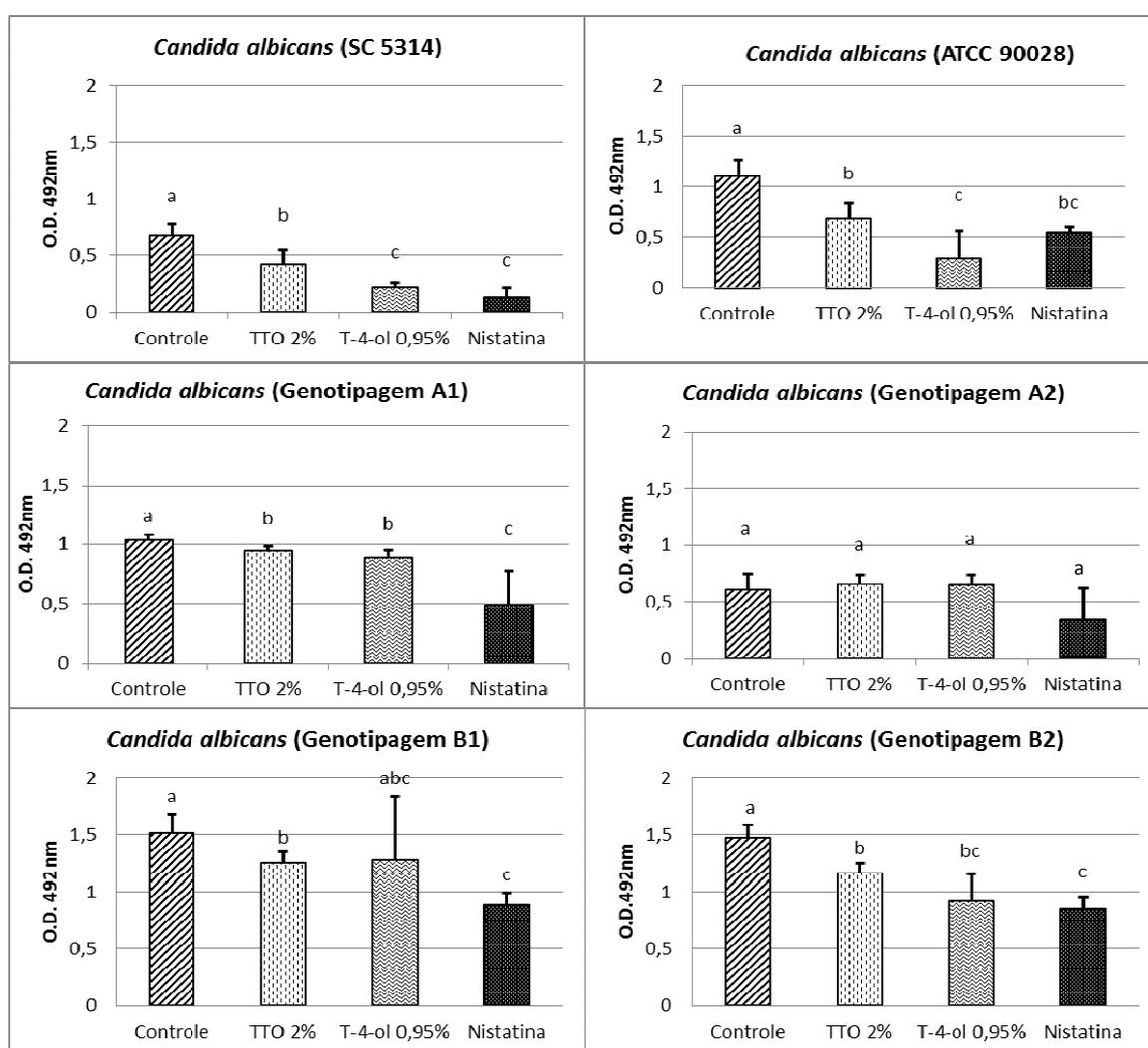
**Figura 1** – Quantificação do biofilme (UFC/mL) de *Candida albicans* (ATCC 5314) (A), *Candida albicans* (ATCC 90028) (B), *Candida albicans* (Genotipagem A1) (C), *Candida albicans* (Genotipagem A2) (D), *Candida albicans* (Genotipagem B1) (E), *Candida albicans* (Genotipagem B2) (F) após tratamento com TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina. Resultados estatisticamente significantes são representados por letras diferentes.



**Figura 2** – Análise da viabilidade celular (XTT) do TTO, Terpinen-4-ol e Nistatina sobre biofilme de *Candida albicans* (SC 5314) (A), *Candida albicans* (ATCC 90028) (B), *Candida albicans* (Genotipagem A1) (C), *Candida albicans* (Genotipagem A2) (D), *Candida albicans* (Genotipagem B1) (E), *Candida albicans* (Genotipagem B2) (F). Resultados estatisticamente significantes são representados por letras diferentes.

### Ação do TTO e Terpinen-4-ol em biofilme desenvolvido em resina acrílica

A Figura 3 mostra a atividade antifúngica do TTO 2%, Terpinen-4-ol 0,95% e Nistatina 256 µg/mL quando adicionados e mantidos durante o tempo de um minuto na formação do biofilme (simulação da ação de enxaguatório bucal). Todos os componentes diferiram estatisticamente do controle e apresentaram capacidade antifúngica. Entretanto, para *C. albicans* Genotipagem A2 os resultados não foram estatisticamente significantes para nenhum dos componentes, incluindo a nistatina.



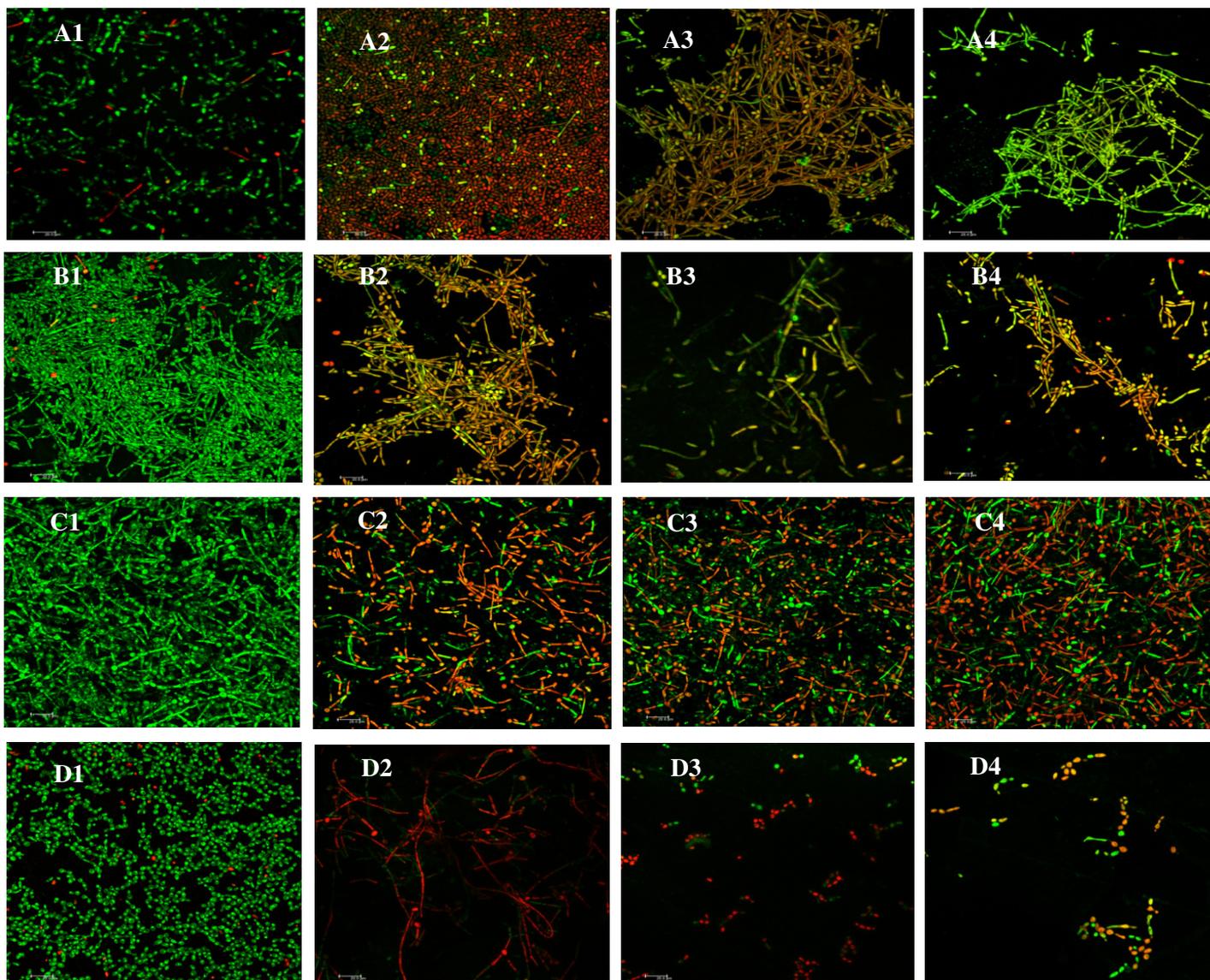
**Figura 3** – Atividade antifúngica do TTO 2%, Terpinen-4-ol (0,95%) e Nistatina (256µg/mL) sobre biofilmes desenvolvidos em corpos de resina acrílica de *Candida albicans* (ATCC 5314) (A), *Candida albicans* (ATCC 90028) (B), *Candida albicans* (Genotipagem A1) (C), *Candida albicans* (Genotipagem A2) (D), *Candida albicans* (Genotipagem B1) (E), *Candida albicans* (Genotipagem B2) (F). Resultados estatisticamente significantes são representados por letras diferentes.

As concentrações eficazes no tratamento do biofilme aderidos nas superfícies das placas (96 poços) foram selecionadas para realização da simulação de um bochecho em biofilmes desenvolvidos sobre amostras de resina acrílica. A ação do TTO 2% e Terpinen-4-ol 0,95% que foram avaliadas por MCVL estão ilustradas na Figura 4. Os microrganismos viáveis foram corados com a coloração verde e os não-viáveis apresentaram coloração amarela-avermelhada.

A diferença na coloração se justifica pelo fato do SYTO® 9 corar membranas íntegras e membranas rompidas. Ao contrário, o iodeto de propídeo penetra apenas nas membranas rompidas, causando uma redução do SYTO® 9 através da transferência de energia por ressonância (RET) ao mecanismo de transferência de energia de forma não-radiativa entre dois cromóforos, sem a necessidade de reabsorção de radiação eletromagnética (Gilbert & Baggott, 1991).

Uma massa homogênea de microrganismos viáveis e algumas células mortas, possivelmente pela falta de nutrientes foi observado no grupo controle (coluna 1). A ação da Nistatina (coluna 2), TTO (coluna 3) e Terpinen-4-ol (coluna 4) apresentaram coloração amarelo-avermelhada o que significa células não-viáveis e além disso, na maioria das amostras, o biofilme apresentou-se com baixa densidade em algumas áreas.

Como apresentado nos resultados da atividade antimicrobiana e analisando-se as imagens do MCVL, pode-se observar que os componentes analisados (TTO e Terpinen-4-ol) obtiveram resultados semelhantes à nistatina, exceto para a Genotipagem A2 que foi a amostra mais resistente à ação dos componentes e da nistatina.



**Figura 4** – Imagens de Microscopia Confocal de Varredura à Laser da ação óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) e do Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 (A), SC 5314 (B), Genotipagem A2 (C) e Genotipagem B1 (D) desenvolvidos em corpos de prova. O grupo controle negativo (salina) é representado pela coluna 1, controle positivo (Nistatina) coluna 2, Terpinen-4-ol coluna 3 e TTO coluna 4.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigado o potencial de atividade antifúngica do TTO e terpinen-4-ol sobre isolados clínicos de *Candida albicans* utilizando experimentos em cultura planctônica e biofilme. Os resultados obtidos demonstraram que o TTO e terpinen-4-ol inibem significativamente o crescimento in vitro de *C. albicans*.

A composição dos extratos do óleo da planta pode variar de acordo com o método de extração e região geográfica em que a planta foi obtida. Portanto, para ser referenciada como padrões de TTO, a ISO 4730 estabeleceu concentrações conhecidas dos componentes (Carson et al., 2006). A cromatografia gasosa confirmou os padrões ISO do TTO e os resultados foram expressos como concentrações relativas dos componentes, sendo o principal, o terpinen-4-ol, justificando assim a utilização desse componente do presente estudo, já que se apresenta como o principal composto ativo do óleo (Carson et al., 2006).

A capacidade da *Candida albicans* aderir e formar biofilme é essencial para o desenvolvimento da candidíase. Os resultados apresentados demonstraram que o TTO e o Terpinen-4-ol são eficazes em culturas planctônicas e biofilmes em cepas de referências e isolados clínicos de *Candida albicans*. A atividade do TTO e Terpinen-4-ol demonstrou sua habilidade em controlar a proliferação in vitro das amostras. O CIM e CFM obtidos nos experimentos (Tabelas 1 e 2) em cultura planctônica foram eficazes e comparáveis com os resultados de Hammer et al. (2003), Ramage et al. (2012) e Bagg et al. (2006).

A atividade antimicrobiana do TTO e seu principal componente em organismos responsáveis pela candidíase oral já foi observada. Sua ação antifúngica sobre culturas planctônicas de *C. albicans* foi relatado por Ramage et al. (2012); Hammer et al. (2002);

Hammer et al. (2003) e Ninomiya et al. (2012). Entretanto, poucos relatos são encontrados sobre a ação do TTO e Terpinen-4-ol em biofilme.

A eficácia do óleo e seu componente aplicado sobre biofilmes foram quantificados em UFC/mL e por análise da viabilidade celular utilizando teste de XTT. Os resultados demonstraram a eficácia do TTO 2% e Terpinen-4-ol 0,95% para todas as amostras e as cepas de referências foram mais susceptíveis quando comparados aos isolados clínicos.

Os componentes avaliados foram capazes de eliminar o biofilme das cepas de referências (ATCC 90028 e SC 5314), porém sobre os biofilmes dos isolados clínicos, os resultados mostraram redução quando comparado ao controle, mas não foram eficazes na eliminação completa. As concentrações mais elevadas foram utilizadas a fim de justificar o fato dos microrganismos em biofilme, tornarem-se mais resistentes do que em forma planctônica, pois ocorrem trocas metabólicas intra e interespecies (Marsh 2004).

A eficácia do óleo e seu principal componente em biofilme foram observados por Ramage et al. (2012), utilizando o teste de XTT e verificaram que TTO 0,5% e Terpinen-4-ol 0,25% reduziram no tempo de uma hora a massa do biofilme em 50%.

No presente estudo também foi avaliada a viabilidade do biofilme nos corpos de prova de resina acrílica, utilizando-se os testes de XTT e MCVL. Os resultados dessa investigação demonstraram que as imagens obtidas por MCVL confirmam que o TTO 2% e Terpinen-4-ol 0,95% aplicados por 60 segundos (simulação do tempo do bochecho), são eficazes e comparáveis ao tratamento padrão com Nistatina e interferem no desenvolvimento do biofilme. Esses resultados foram confirmados pelo teste do XTT. Emira et al., 2013 verificaram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi

eficaz tanto no tratamento de culturas planctônicas como na interferência da adesão de *C.albicans* para formação do biofilme em corpos de prova de resina acrílica.

Estudos in vivo têm sido realizados para avaliar o efeito do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* no tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por *Candida* spp. Ninomyia et al. (2012) realizaram estudos com camundongos no qual avaliaram a eficácia do óleo e do Terpinen-4-ol na cavidade oral dos animais com candidíase oral e obtiveram redução dos sinais clínicos de candidíase.

Os resultados apresentados neste trabalho apresentam divergências quando comparados aos existentes na literatura, demonstrando que a metodologia e condições de trabalho podem variar. Assim, este estudo contribui com informações adicionais sobre o TTO e Terpinen-4-ol, sugerindo que estes possam ser utilizados como tratamento alternativo tanto para prevenção como para tratamento de infecções fúngicas. Além disso, também podem ser utilizados para desinfecção de próteses orais confeccionadas com resina acrílica. A candidíase oral tem aumentado, principalmente, em pacientes com o sistema imunológico comprometido e as cepas estão se tornando cada vez mais resistentes aos medicamentos existentes no mercado. Por isso, deve-se destacar que o TTO e o Terpinen-4-ol apresentaram ação inibitória contra cepas clínicas de *Candida albicans* tanto quando utilizados em cultura planctônica quanto em biofilme, demonstrando maior resistência das cepas clínicas a estes agentes.

## CONCLUSÃO

- Os resultados mostraram que as concentrações capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* variaram entre 0,25-1% para TTO, 0,11-0,47% para Terpinen-4-ol e 2-8 µg/mL para Nistatina.

- TTO 2% eliminou biofilme de cepas de *C. albicans* padrão e duas cepas clínicas e Terpinen-4-ol 0,47% eliminou biofilme de todas as cepas testadas, com exceção de *C. albicans* genotipagem B1.

- TTO e Terpinen-4-ol reduziram significativamente os níveis de *C. albicans* (cepas padrão e isolados clínicos) de biofilmes formados em corpos de prova de resina acrílica.

## REFERÊNCIAS

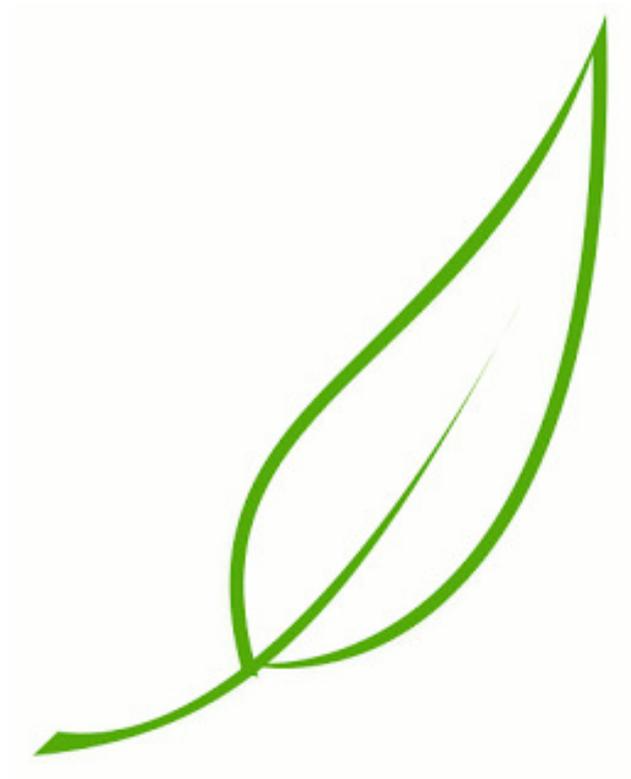
1. Bagg, J., Jackson, M.S., Sweeney, M.P., Ramage, G., Davies, N.A., 2006. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the muths of patients with advanced cancer. *Oral Ocology* 42, 487-492.
2. Cao, Y.Y., Dai, B., Wang, Y., Huang, S., Xu, Y., Cao, Y., Gao, P., Zhu, Z.Y., Jiang, Y.Y., 2008. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 32, 73-77.
3. Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 50-62.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standart. 2nd edition. Pennsylvania: NCCLS; 2002: 33-35.
5. Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 91(3), 492–497.
6. Cox, S.D., Markham, J.L., 2007. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J. Appl. Microbiol.* 103(4), 930–936.
7. Da Silva, W.J., Seneviratne, J., Parahitiyawa, N., Rosa, E.A., Samaranayake, L.P., Del Bel Cury, A.A., 2001. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz. Dent. J.* 19, 364-369.
8. Elter, C., Heuer, W., Demling, A., Hannig, M., Heidenblut, T., Bach, F.W., Stiesch-Scholz, M., 2008. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 23, 327-334.

9. Emira, N., Mejdi, S., Aouni, M., 2013. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils on oral *Candida* biofilm formation on polymethylmethacrylate. *J. Med. Plants Res.* 7(20), 1461-1466.
10. Gilbert, A., Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1991.
11. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2002. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 195–199.
12. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* 95, 853–860.
13. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 1081-1085.
14. Hasenoehrl, A., Galić, T., Ergović, G., Maršić, N., Skerlev, M., Mittendorf, J., Geschke, U., Schmidt, A., Schoenfeld, W., 2006. In Vitro Activity and In Vivo Efficacy of Icofungipen (PLD-118), a Novel Oral Antifungal Agent, against the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(9): 3011–3018.
15. Kumar, C.P.G., Hanafy, A.M., Katsu, M., Mikami, Y., Menon, T., 2006. Molecular analysis and susceptibility profiling of *Candida albicans* isolates from immunocompromised patients in South India. *Micopathologia* 161, 153-159.
16. Lavra ZMM, Sonogo F, Silva RMF, Medeiros FPM. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz J Pharm Sci.* 2008; 44, 637-43.
17. Marsh, P.D., 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 38, 204-211.

18. Ninomiya, K., Maruyama, N., Inoue, S., Ishibashi, H., Takizawa, T., Oshima, H., Abe, S., 2012. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol. Pharm. Bull.* 35(6), 861-865.
19. Oliveira, A.C.M., Fontana, A., Negrini, T.C., Nogueira, M.N.M., Bedran, T.B.L., Andrade, C.R., Spolidorio, L.C., Spolidorio, D.M.P., 2011. Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. *Rev. Bras. Pl. Med.* 13(4), 492-499.
20. Punithavathy, P.M., Nalina, K., Menon, T., 2012. Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 55(1), 72-74.
21. Ramage, G., Milligan, S., Lappin, D.F., Sherry, L., Sweeney, P., Williams, C., Bagg, J., Culshaw, S., 2012. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front. Microbiol.* 3, 220-240.
22. Sardi, J.C.O., Duque, C., Höfling, J.F., Gonçalves, R.B., 2012. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Medical Mycology.* 50, 467-475.
23. Shinobu, C.S., Ogatta, S.F.Y., Bizerra, F., Furlaneto, L., Peralta, R.M., Svidzinski, T.I.E., Consolaro, M.E.L., 2007. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. *Braz. J. Microbiol.* 38: 467-471.
24. Silva, W.J., Seneviratne, J., Parahitiy Awa, N., Rosa, E.A.R., Samaranayake, L.P., Del Bel Cury, A.A., 2001. Improvement of XTT assay performance for studies

- involving *Candida albicans* biofilms. Braz Dent J. 2008; 19(4):364-9. Pesqui. Odontol. Bras. 15(4): 354-358.
25. Sudjana, A.N., Carson, C.F., Carson, K.C., Riley, T.V., Hammer, K.A., 2012. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. Med. Mycol. 50(8), 863-870.
26. Thein, Z.M., Smaranayake, Y.H., Smaranayake, L.P., 2007. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. APMIS. 115(11), 1241-1251.
27. Traboulsi, R.S., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., 2008. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. Isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. Int. J. Antimicrob. Agents 31(3), 272-276.
28. Westwater, C., Balish, E., Schofield, A., 2005. Schofield. *Candida albicans*-Conditioned Medium Protects Yeast Cells from Oxidative Stress: a Possible Link between Quorum Sensing and Oxidative Stress Resistance. Eukaryot Cell. 4(10): 1654–1661.
29. Zamperini, C.A., Machado, A.L., Vergani, C.E., Pavarina, A.C., Giampaolo, E.T., Da Cruz, N.C., 2010. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch. Oral Biol. 55, 763-770.

*Conclusão*



#### 4 CONCLUSÃO

Como conclusão, os resultados por esse experimento in vitro demonstram que o TTO é eficaz contra isolados clínicos resistentes tanto na forma planctônica como em biofilme, demonstrando maior resistência das cepas clínicas a estes agentes. Este estudo considera que o óleo de *Melaleuca* pode ser uma alternativa no tratamento de infecções fúngicas.

# Referências



## 5 REFERÊNCIAS\*

1. Bagg J, Jackson MS, Sweeney MP, Ramage G, Davies NA. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 2006; 42(5): 487-92.
2. Carson CF, Hammer KA, Riley TV, 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 50-62.
3. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(3): 327-32.
4. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(3) : 217-26.
5. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 492–7.
6. Da Silva WJ, Senevirante J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2001; 19(4): 364-9.
7. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(4): 853–60.
8. Hamme KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(6): 1081-5.

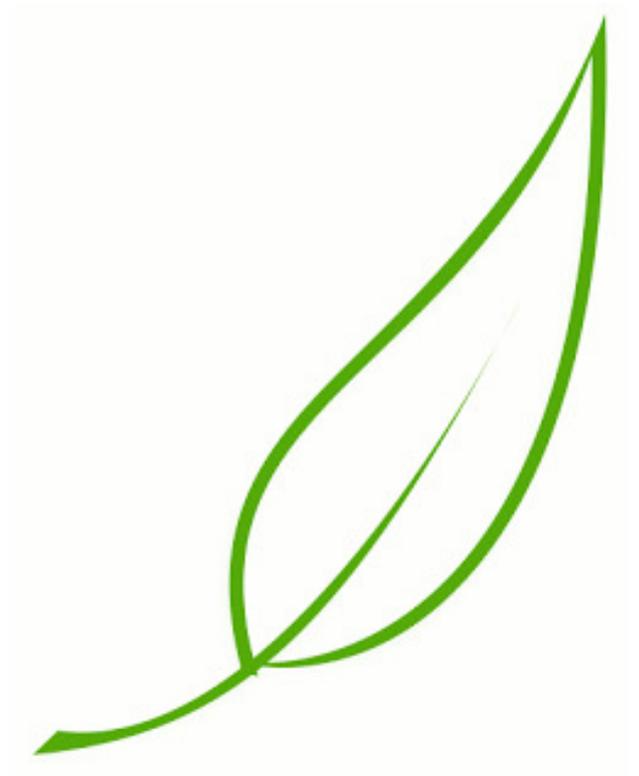
\* De acordo com o manual FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponíveis nos site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(2): 909-15.
10. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(5): 616-25.
11. Kulik E, Lenkeit K, Meyer J. Antimicrobial effects of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on oral microorganisms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2000; 110(11): 125-30.
12. Lavra ZMM, Sonogo F, Silva RMF, Medeiros FPM. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz J Pharm Sci.* 2008; 44(4): 637-43.
13. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Salvatore AC, Giuseppe S. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 158-65.
14. Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, Ishibashi H, Takizawa T, Oshima H, et al. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(6): 861-5.
15. Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37(2): 185-7.

16. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, et al. Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. Rev Bras Pl Med. 2011; 13(4): 492-9.
17. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. Front Microbiol. 2012; 3: 220-40.
18. Rörig KCO, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factors for pathogenic species of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(2): 225-7.
19. Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine. 2008; 15(8): 635-8.
20. Shinobu CS, Ogatta SFY, Bizerra F, Furlaneto L, Peralta RM, Svidzinski TIE, et al. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. Braz J Microbiol. 2007; 38(3): 467-71.
21. Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Barbeiro RH, Höfling JF, Bernardo WLC, Pavan S. Quantitative evaluation of *Streptococcus mutans* and *Candida* spp and salivary factors in the oral cavity of patients submitted to radiotherapy. Pesqui Odontol Bras. 2001; 15(4): 354-8.
22. Suárez VL, Andreu CMF. Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina. Rev Cubana Med Trop. 2003; 55(3): 138-45.

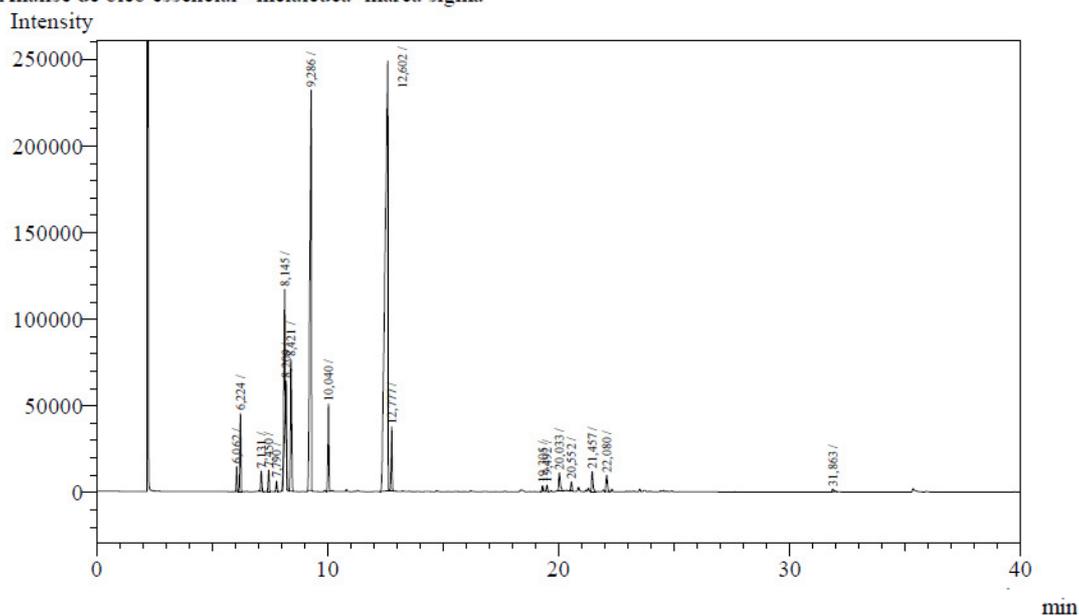
23. Sudjana AN, Carson CF, Carson KC, Riley TV, Hammer KA. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Med Mycol.* 2012; 50(8): 863-70.
24. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. Isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(3): 272-6.
25. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48(4): 440-6.
26. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Vaishampayan JK, Akins RA. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17: 60-3.
27. Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *HIV Clin Trials.* 2002; 3(5): 379-85.

# *Apêndices*



## APÊNDICE 1 Análise de cromatografia gasosa do óleo de *Melaleuca*.

Analysis Date & Time : 8/2/2011 09:17:58  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : 0802/2011 - Nicole  
 Sample ID : analise de melaleuca  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume :  
 ISTD Amount :  
  
 Data Name : C:\Paulo\nicole\ol-sigma.gcd  
 Method Name : C:\Paulo\aula\essencias\essencia.gcm  
 [Description]  
 HP 1 - 50  
 60(2), 5, 250 (15)-  
 Analise de oleo essencial - melaleuca- marca sigma



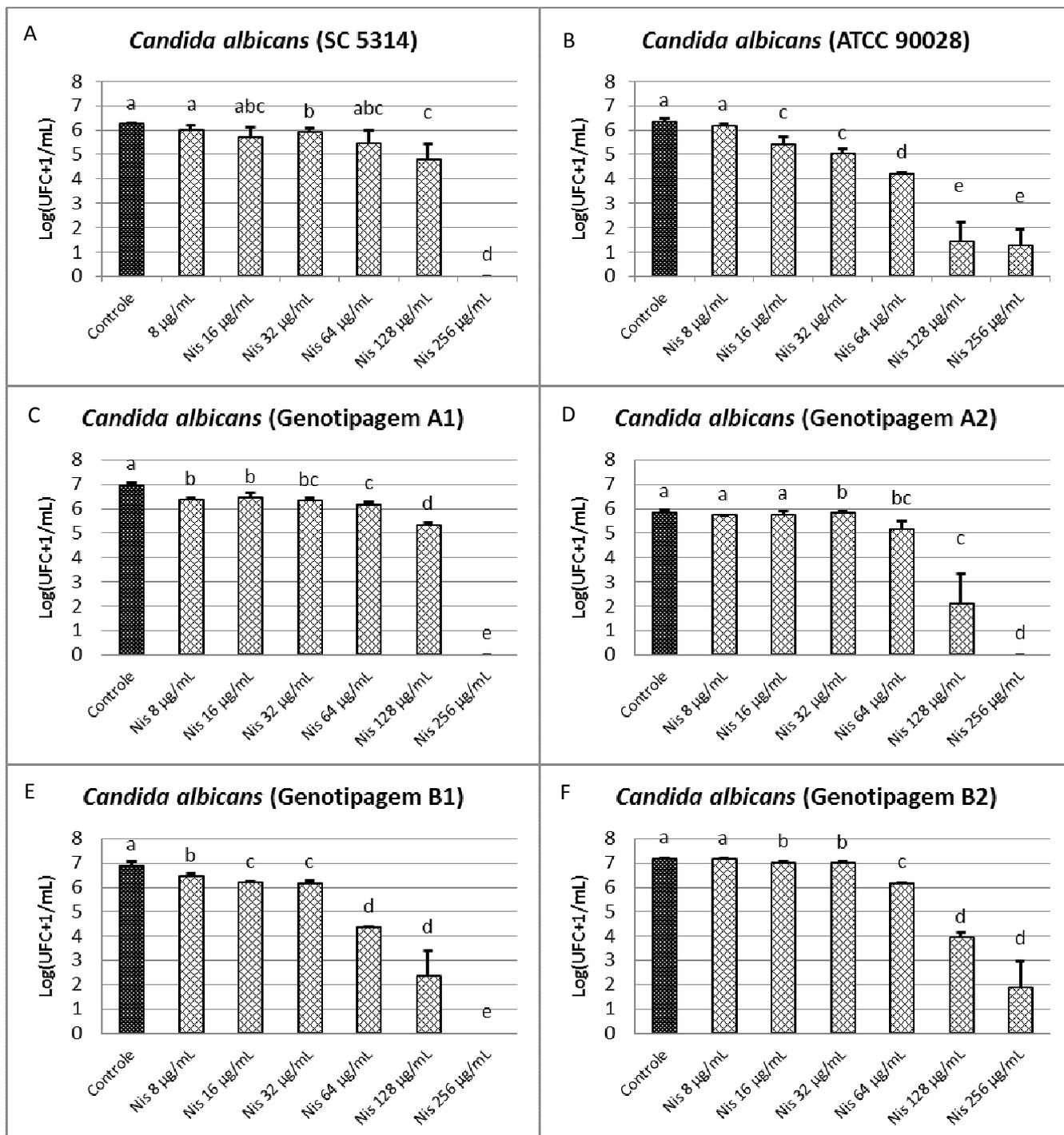
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.062	40355	14235	0.000			
2	6.224	126155	44937	0.000			
3	7.131	34649	11560	0.000			
4	7.450	38196	12248	0.000			
5	7.790	19289	5912	0.000			
6	8.145	228122	78984	0.000			
7	8.209	47240	31502	0.000			
8	8.421	286806	75107	0.000			
9	9.286	1048003	228511	0.000			
10	10.040	158230	49855	0.000			
11	12.602	2118097	247694	0.000			
12	12.777	115080	36660	0.000			
13	19.305	10640	3154	0.000			
14	19.492	13134	3615	0.000			
15	20.033	46815	10468	0.000			
16	20.552	18793	5335	0.000			
17	21.457	46516	11440	0.000			
18	22.080	39728	9351	0.000			
19	31.863	8156	1590	0.000			
<b>Total</b>		<b>4444004</b>	<b>882158</b>				

**APÊNDICE 2** Tabela com apresentação das concentrações dos componentes do óleo de *Melaleuca* padronizados pela ISO 4730 e as concentrações obtidas pela análise de cromatografia gasosa do óleo de *Melaleuca* usado nesta pesquisa.

Componentes	Composição (%)	Composição (%)
	ISO 4730, 2004	Cromatografia
Terpinen-4-ol	30-48	47
$\gamma$ -Terpinene	20-28	23
$\alpha$ -Terpinene	5-13	6
$\alpha$ -Terpineol	1,5-8	5
$\alpha$ -Pinene	1-6	2
1,8-Cineole	$\leq 15$	1

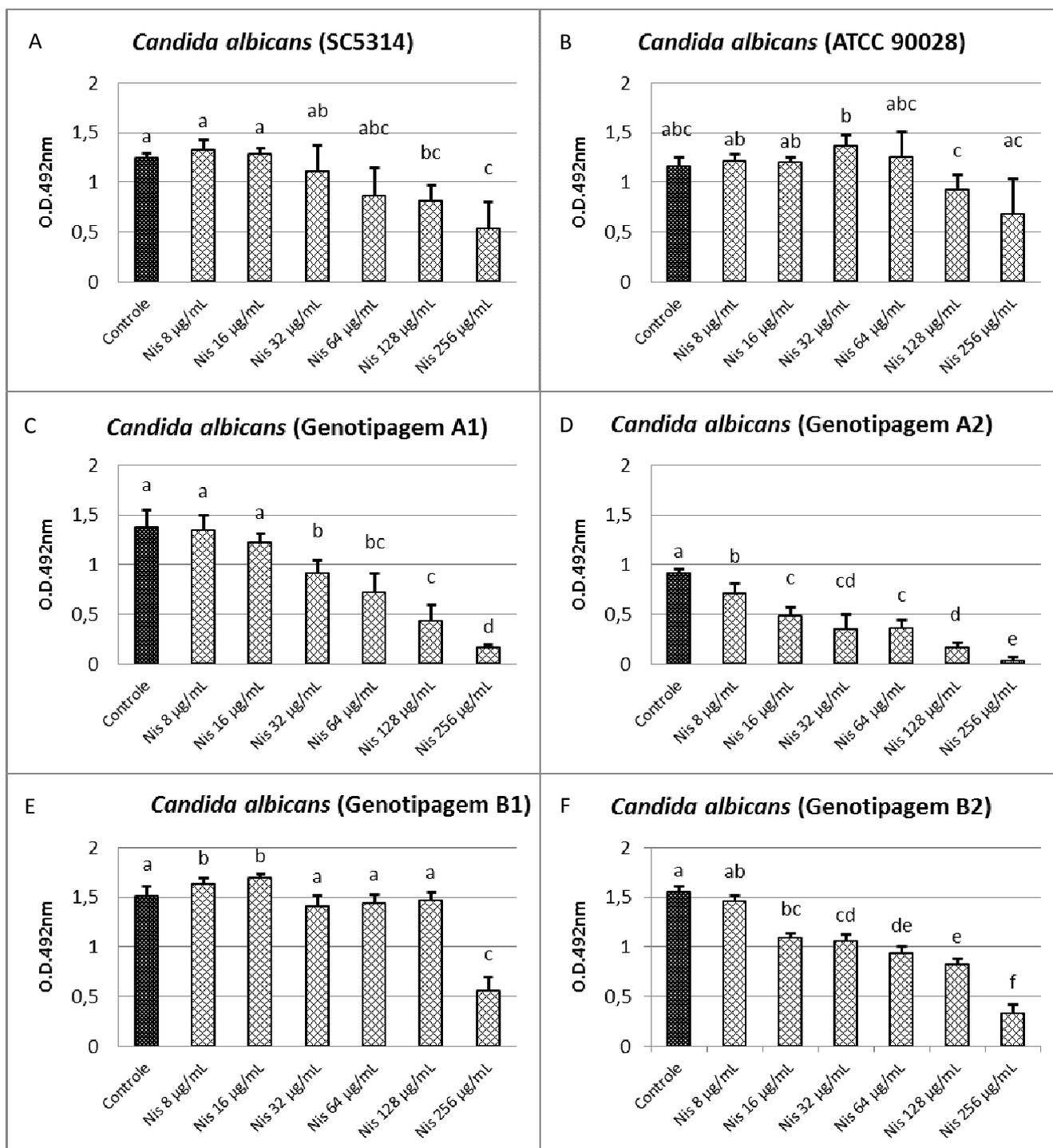
### APÊNDICE 3

**Figura A** – Quantificação do biofilme (UFC/mL) de *Candida albicans* (SC 5314) (A), *Candida albicans* (ATCC 90028) (B), *Candida albicans* (Genotipagem A1) (C), *Candida albicans* (Genotipagem A2) (D), *Candida albicans* (Genotipagem B1) (E), *Candida albicans* (Genotipagem B2) (F) após aplicação da Nistatina. Resultados estatisticamente significantes são representados por letras diferentes.



## APÊNDICE 4

**Figura A** – Análise da viabilidade celular (XTT) da Nistatina sobre biofilme de *Candida albicans* (SC 5314) (A), *Candida albicans* (ATCC 90028) (B), *Candida albicans* (Genotipagem A1) (C), *Candida albicans* (Genotipagem A2) (D), *Candida albicans* (Genotipagem B1) (E), *Candida albicans* (Genotipagem B2) (F). Resultados estatisticamente significantes são representados por letras diferentes.



Não autorizo a reprodução deste trabalho até 12/03/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 12 de março de 2014

Renata Serignoli Francisoni