



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**CAROLINE CORADI TONON**

**TERPINEN-4-OL:**

**ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E  
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA* SPP**

**Araraquara**

**2016**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**



**Faculdade de Odontologia de Araraquara**

**CAROLINE CORADI TONON**

**TERPINEN-4-OL:**

**ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E  
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA SPP***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia Área de Biologia Crânio Facial e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Odontologia.

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

**Araraquara**

**2016**

Tonon, Caroline Coradi

Terpinen-4-ol: estudo do efeito sinérgico/aditivo, adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência sobre Candida spp. /  
Caroline Coradi Tonon.-- Araraquara: [s.n.], 2016.  
49 f. : 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Candida albicans 2. Candida tropicalis 3. Biofilmes I. Título

**CAROLINE CORADI TONON**

**TERPINEN-4-OL:  
ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO/ADITIVO, ADESÃO EM CO-CULTURA E  
ALTERAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA SOBRE *CANDIDA SPP***

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

**Comissão julgadora**

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> Janaína de Cássia Orlandi Sardi

Araraquara, 22 de março de 2016.

## **DADOS CURRICULARES**

### **CAROLINE CORADI TONON**

NASCIMENTO: 07/08/1990 – Jaú – São Paulo

FILIAÇÃO: Luiz Fernando Tonon e Ana Marcia Coradi Tonon

**1998 – 2005:** Ensino Fundamental

**2006 – 2008:** Ensino Médio

**2009 – 2013:** Ensino Superior – Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

**2014 – 2016:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração Biologia Crânio Facial e Biomateriais, nível Mestrado pela faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

**2015 – Atual:** Especialização em Implantodontia pela Associação Brasileira de Odontologia de Araraquara.

# *Dedicatória*

## *A Deus*

Pela fé, esperança e força concedida e por ter guiado meus passos para que chegassem a este momento.

## *Aos meus pais*

Ao meu pai, Luiz Fernando, que não está mais aqui comigo, mas tenho certeza de que estaria muito orgulhoso de me ver alcançar esta etapa.

À minha mãe, Ana Marcia, meu exemplo e inspiração na vida.

As palavras são poucas para expressar tamanho amor e admiração que tenho por vocês, que me inspiraram a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida. Por sempre me colocarem em primeiro lugar e buscar o melhor para mim, me dando a oportunidade de realizar meus sonhos. Obrigada pelo apoio incondicional, amizade, carinho e paciência. Vocês são minha base e força.

## *Às minhas irmãs*

Karina e Taís, minhas melhores amigas, que me proporcionam momentos de grande alegria e cumplicidade. Agradeço o companheirismo, o apoio, e a paciência.

**Amo muito vocês!**

# *Agradecimentos*

## *Agradecimentos Especiais*

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio pela orientação, amizade e atenção em todos os momentos. Obrigada pela motivação, na confiança recebida e na liberdade e apoio nas decisões tomadas. Agradeço diariamente pela Mestre paciente que proporcionou anos de trabalho prazerosos e de ótima convivência.

## *Agradecimentos*

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

À Coordenação da Pós-Graduação Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

À Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi pela atenção, paciência e amizade. Agradeço os ensinamentos na área de Microbiologia, conselhos e atenção dadas a este trabalho.

Aos amigos Renata S. Francisconi e Marco Aurélio Paschoal por todos os ensinamentos no meio acadêmico, tanto laboratoriais, quanto científicos. Agradeço a paciência, a atenção e a disposição em me ensinar. Vocês foram de extrema importância para o meu desenvolvimento como pesquisadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (2015/00155-0) e auxílio pesquisa (2015/08742-1) para realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora;

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, José Alexandre e Cristiano pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos;

Aos funcionários da Biblioteca por estarem sempre dispostos a nos ajudar;

Às secretárias do Departamento de Fisiologia e Patologia, Silvana e Carla por nos atender sempre com muita eficiência.

Aos funcionários da portaria e seguranças por fazerem das minhas inúmeras entradas e saídas, inclusive aos de finais de semana e feriado, sempre “Bem-Vindas”;

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

Às queridas amigas de laboratório de microbiologia, as “Penélopes”, Renata S. Francisconi, Ester A. F. Boridini e Patrícia M.M. Huacho pelos momentos de trocas de experiências, apoio e amizade;

Aos amigos de Pós-Graduação que ajudaram diretamente para a realização deste trabalho: Marília F. Correia (estatística), Luis Carlos Leal Santana (cultura de células). Renata, Ester e Patty que colocaram a mão na massa tantas vezes junto a mim.

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

*Muito obrigada!*



Tonon C C Terpinen-4-ol: estudo do efeito sinérgico/aditivo, adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência sobre *Candida* spp [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## RESUMO

O gênero *Candida* pode ser encontrado em até 50% dos indivíduos saudáveis não causando danos aparentes, porém, sob condições predisponentes como doenças sistêmicas ou condições fisiológicas, pode tornar-se patogênico causando inflamação e destruição tecidual. *Candida* spp. na forma de biofilmes são importantes no desenvolvimento de infecções, pois estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos. Terapias alternativas com extratos naturais abrem novas perspectivas para prevenção e controle das doenças bucais na busca de efeitos terapêuticos favoráveis. O Terpinen-4-ol é um monoterpeneo que atua na indução da perda da membrana e apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana e atividade anti-inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antifúngico, sinérgico/aditivo, inibição da adesão em células orais e alteração dos fatores de virulência do Terpinen-4-ol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Assim, foi realizada a identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do Terpinen-4-ol sobre cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. tropicalis* (ATCC4563), empregando-se o método de microdiluição em caldo. Biofilmes mono e dual-espécies foram preparados usando o modelo de placa de microtitulação estática e quantificados por unidades formadoras de colônias (UFC/mL). O efeito do Terpinen-4-ol na adesão de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi realizado em co-cultura com células orais NOK Si como também os fatores de virulência (proteases, fosfolipases e hemolisina) foram avaliados in vitro. A CIM para Terpinen-4-ol foi 2,31 mg/ml para ambas espécies e a CFM 0,002 mg/ml e 0,004 mg/ml respectivamente para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Quando testados em combinação houve efeito aditivo e sinergismo (T-4-ol 1,06 mg/ml e Nis 0,00012 mg/ml) para *Candida albicans*. Em biofilme, os resultados apresentaram aditismo para ambas as espécies. O Terpinen-4-ol demonstrou uma redução na adesão de *Candida tropicalis* em células NOK Si, já a Nistatina teve maior efeito tanto para *Candida albicans* quanto para *Candida tropicalis*. Quanto à atividade enzimática, Terpinen-4-ol e Nistatina não demonstraram ação na produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina quando comparados ao grupo controle (sem tratamento). A combinação de Terpinen-4-ol e Nistatina apresentou efeito antifúngico potencializado sobre as duas espécies de *Candida* avaliadas, mostrando efeito sinérgico/modulador em culturas planctônicas e biofilmes. Terpinen-4-ol reduz a adesão de *C. tropicalis* e a Nistatina reduz a adesão de ambas as espécies em células orais imortalizadas (NOK Si). As concentrações sub-inibitorias (CIM<sub>50</sub>) de Terpinen-4-ol e Nistatina utilizadas não apresentaram atividade na produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina.

**Palavras Chave:** *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Biofilmes.

Tonon C C Terpinen-4-ol: Study of synergistic / additive effect, adhesion in co-culture and the modification of virulence factors of *Candida* spp [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

## ABSTRACT

The genus *Candida* can be found in up to 50% of healthy individuals without causing apparent damage, however, under predisposing conditions such as systemic diseases or physiological conditions, can become pathogenic causing inflammation and tissue destruction. *Candida* spp. in the form of biofilms are important in the development of infections because they are associated with high levels of resistance to antimicrobial agents. Alternative therapies with natural extracts open new perspectives for prevention and control of oral diseases in search of favorable therapeutic effects. The Terpinen-4-ol is a monoterpene engaged in membrane loss of induction and presents broad spectrum of antimicrobial and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to evaluate the antifungal effect, synergistic / additive inhibition of adhesion on oral cells and modification of virulence factors of Terpinen-4-ol of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Thus, the identification of Minimum Inhibitory Concentration was performed (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of Terpinen-4-ol on standard strains *C. albicans* (ATCC 90028) and *C. tropicalis* (ATCC4563), using the method microdilution broth. Biofilms mono and dual-species were prepared using the microtiter plate static model and quantitated by colony forming units (CFU / mL). The effect of Terpinen-4-ol in the adhesion on *C. tropicalis* and *C. albicans* was carried out in co-culture with oral cells NOK Si as well as virulence factors (proteases, phospholipases and hemolysin) were evaluated in vitro. The MIC for Terpinen-4-ol was 2.31 mg / ml for both species and CFM 0.002 mg / ml and 0.004 mg / ml respectively for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. When tested in combination there was synergism and additive effect (T-4-ol 1.06 mg / ml and 0.00012 mg Nis / ml) for *Candida albicans*. In the biofilm, the results presented aditismo for both species. The Terpinen-4-ol was a reduction in adhesion of *Candida tropicalis* on cells NOK Si, Nystatin already had most effective for *Candida albicans* and for *Candida tropicalis*. For enzymatic activity, Terpinen-4-ol and Nystatin showed no action on the production of proteinase, phospholipase and hemolysin when compared to the control group (no treatment). The combination of Terpinen-4-ol and Nystatin presented antifungal effect potentiated on the two *Candida* species evaluated, showing synergistic / modulatory effect on planktonic and biofilm cultures. Terpinen-4-ol reduces the adhesion of *C. tropicalis* and Nystatin reduces the adhesion of both species in oral immortalized cells (NOK Si). The sub-inhibitory concentrations (MIC50) of Terpinen-4-ol and Nystatin used did not show activity in the production of proteinase, phospholipase and hemolysin.

**Key words:** *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. Biofilm.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>
<b>APÊNDICE A – Material e Método.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* e espécies relacionadas são patógenos oportunistas capazes de causar infecções variando desde desordens mucocutâneas não comprometedoras ao indivíduo até doenças invasivas envolvendo múltiplos órgãos. A frequência dessas infecções vem aumentando mundialmente devido a uma multiplicidade de fatores predisponentes, os quais incluem doenças sistêmicas (diabetes e AIDS), condições fisiológicas (gravidez, infância ou idade avançada), fatores nutricionais, tratamento com antibióticos de amplo espectro, drogas imunossupressoras e corticosteróides, e alguns fatores locais como xerostomia e uso de aparelhos protéticos (Tekeli et al.<sup>54</sup>, 2004; Manfredi et al.<sup>36</sup>, 2006).

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas e 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (Eggimann et al.<sup>19</sup>, 2003) como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (Akpan, Morgan<sup>4</sup>, 2002; Farah et al.<sup>20</sup>, 2000). *Candida albicans*, a principal espécie relacionada à candidíase oral, apresenta fatores de patogenicidade que predispõe, com maior frequência, o aparecimento das infecções. (Mayer et al.<sup>37</sup>, 2013). Devido a essa grande incidência de infecções fúngicas, observa-se diversas dificuldades não apenas no diagnóstico, mas também no tratamento capaz de controlar esse tipo de infecção (Girois et al.<sup>22</sup>, 2006).

Esses microrganismos, quando incorporados a uma matriz de substâncias poliméricas compõem o biofilme que é definido como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, realizando trocas metabólicas e genéticas intra e interespecies (Donlan, Costerton<sup>17</sup>, 2002). Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, pois servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (Donlan<sup>16</sup>, 2001; Kuhn et al.<sup>31</sup>, 2002).

Uma vez na cavidade bucal, as espécies de *Candida* encontram diversos locais de mucosas onde podem aderir-se, língua ou superfícies dos dentes, próteses fixas e/ou removíveis e de outros microrganismos que já colonizam estas superfícies, promovendo ancoragem para hifas e permitindo seu crescimento pelo tecido epitelial (Vitkov et al.<sup>56</sup>

2002). Para iniciar a doença, estas devem aderir a células epiteliais da mucosa bucal e subsequentemente, invadir e destruir estas células (Farah et al.<sup>20</sup>, 2000). A adesão ao tecido hospedeiro é o primeiro passo no processo patogênico e os mecanismos de adesão por *Candida* spp. aos diferentes tipos celulares ou superfícies são complexos e se dá pela combinação de receptores e mecanismos não específicos (forças eletrostáticas, agregação e hidrofobia da superfície celular) (Manfredi et al.<sup>36</sup>, 2006). A adesão envolve interações entre as células fúngicas e as superfícies do hospedeiro (Cannon, Chaffin<sup>8</sup>, 2001), sendo promovida por alguns componentes da parede celular do fungo como manose, receptores C3d, manoproteínas, sacarinas e adesinas. O grau de hidrofobicidade e a habilidade de se ligar à fibronectina do hospedeiro também são relatados como importantes mecanismos utilizados nos estágios iniciais da infecção (Akpan, Morgan<sup>4</sup>, 2002).

*Candida* spp. podem produzir fatores de virulência que facilitam sua proliferação e consequentemente, a adesão no epitélio e invasão do tecido conjuntivo. Exoenzimas são produzidas para melhorar sua capacidade de colonizar e estabelecer infecções (Willis et al.<sup>58</sup>, 2001; Sardi et al.<sup>49</sup>, 2010), tais como aspartil protease secretada e fosfolipases, que degradam imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular, inibem a fagocitose por neutrófilos e induzem reações inflamatórias (Reynaud et al.<sup>46</sup>, 2001; Hube et al.<sup>26</sup>, 1998). Outro fator de virulência está relacionado à aquisição de ferro, elemento essencial para muitos microrganismos, e sua absorção pode desempenhar um papel especial em infecções (Ramanan, Wang<sup>45</sup>, 2000). A secreção de hemolisina, seguida de aquisição de ferro, facilita a invasão de hifas e o desenvolvimento de candidíase disseminada (Tsang et al.<sup>55</sup>, 2007).

Os agentes antifúngicos mais utilizados na prevenção e tratamento contra o gênero *Candida* são a anfotericina B, nistatina e fluconazol. A nistatina, usada no tratamento do candidíase oral, é um antifúngico poliênico, com características fungicidas e fungistática (Cione et al.<sup>13</sup>, 2010), atua desestruturando a membrana celular de fungos e leveduras e age na permeabilidade da membrana celular (Lavra et al.<sup>29</sup>, 2008). Porém, estudos têm demonstrado a existência de *C. albicans* resistentes e que alguns medicamentos ocasionam lesões nos rins e fígado (Chami et al.<sup>12</sup>, 2004; Rosato et al.<sup>47</sup>, 2009). Além disso, deve-se destacar o fato do desenvolvimento da resistência microbiana ser crescente, ocasionado por mutações, permitindo que os medicamentos existentes atuem apenas em parte da população microbiana (Mohamadi et al.<sup>38</sup>, 2014).

Assim, o uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na medicina, sendo que uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos. Estudos com produtos de origem natural apresentaram resultados entusiasmantes sobre os patógenos bucais, no controle da resposta inflamatória mostrando que estes agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas (Abe et al.<sup>1</sup>, 2003; Alessi et al.<sup>5</sup>, 1995; Catalán et al.<sup>11</sup>, 2008; Duarte et al.<sup>18</sup>, 2006; Maggi et al.<sup>36</sup>, 2009.)

O Terpinen-4-ol atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo (Oliveira et al.<sup>42</sup>, 2011). O mesmo apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana e atividade anti-inflamatória (Sun et al.<sup>52</sup>, 2012, Nogueira et al.<sup>37</sup>, 2014). O Terpinen-4-ol é um monoterpene encontrado em outras plantas além da *Melaleuca alternifolia*, tais como *Hajeb Layoun arboreta* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet* e estudos indicam que além das propriedades citadas acima, possui efeito anti-tumoral (Wu et al.<sup>59</sup>, 2012). Estudos de Ramage et al.<sup>44</sup> (2012), mostraram que o Terpinen-4-ol exibe fortes propriedades antimicrobianas contra culturas planctônicas e biofilmes fúngicos e pode ser adequado para a profilaxia e tratamento de candidose orofaríngea estabelecida.

Estudos também mostram que o Terpinen-4-ol tem boa atividade antifúngica com CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) e mostram efeitos relativamente rápidos sobre *C. albicans* em diferentes tipos de ensaios (Moleyar, Narasimham<sup>39</sup>, 1986; Carson, Riley<sup>10</sup>, 1995; Griffin et al.<sup>23</sup>, 1999; Adegoke et al.<sup>2</sup>, 2000; Coxet al.<sup>15</sup>, 2001; Inouye et al.<sup>27</sup>, 2001; Hammer et al.<sup>25</sup>, 2003).

Muitas abordagens têm sido utilizadas para melhorar o efeito de terapia antimicrobiana de microrganismos resistentes e uma delas é a combinação de drogas (Khan et al.<sup>30</sup>, 2012). O conceito de sinergia antimicrobiana é baseado no princípio de que, em combinação com outras drogas, a formulação pode aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade, diminuir os efeitos colaterais adversos, aumentar a biodisponibilidade, diminuir a dose, e reduzir o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (Li et al.<sup>33</sup>, 1993; Inui et al.<sup>28</sup>, 2007). Um método utilizado para verificar o sinergismo entre drogas é o “Checkerboard” (Tabuleiro Xadrez), no qual variadas concentrações dos produtos selecionados podem ser aplicados sobre um mesmo isolado (Jonhson et al.<sup>29</sup>, 2004). Estudos mostraram efeitos sinérgicos quando agentes antifúngicos foram combinados (Guo et al.<sup>24</sup>, 2008; Li et al.<sup>34</sup>, 2008; Sun et al.<sup>52</sup>, 2008; Fiori et al.<sup>21</sup>, 2012). Assim, pode-se avaliar combinações de pequenas concentrações

das drogas para verificar se ocorre melhor efeito sobre os isolados estudados, resultando em baixa toxicidade e melhor eficácia (Silva et al.<sup>51</sup>, 2011; Ahmad et al.<sup>3</sup>, 2013; Wei et al.<sup>57</sup>, 2011; Cordeiro et al.<sup>14</sup>, 2013; Canton et al.<sup>9</sup>, 2005).

Com base na literatura apresentada, observou-se a necessidade de intensificar estudos envolvendo a porção solúvel Terpinen-4-ol sobre biofilmes de *Candida* spp. e compreender a capacidade antimicrobiana deste componente, possibilitando sua aplicação clínica na prevenção e tratamento das patologias bucais.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Avaliar a ação antifúngica sinérgica e/ou aditiva, inibição da adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência utilizando Terpinen-4-ol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.



### 3 PUBLICAÇÃO

**“Interações in vitro entre Terpinen-4-ol e Nistatina sobre culturas planctônicas e biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*”\***

TONON CC <sup>1</sup>; FRANCISCONI RS <sup>1</sup>; CORREIA MF <sup>1</sup>; BORDINI EFA <sup>1</sup>; HUACHO PMM <sup>1</sup>; SARDI JCO <sup>2</sup>; SPOLIDORIO DMP <sup>1</sup>

- 1- *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araraquara. Rua Humaitá, 1680, Centro, Araraquara, SP, CEP. 14801-903*
- 2- *Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Av. Limeira, 901, Piracicaba, CEP. 13414-903*

#### **\* Autor para Correspondência**

Caroline Coradi Tonon

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Rua Humaitá, 1680, Centro, Araraquara, SP, CEP. 14801-903

Tel. (14) 982127332

e-mail. caroline\_tonon@hotmail.com

#### **Agradecimentos:**

Este trabalho foi apoiado por subsídios do Governo Estadual por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número: 2015/00155-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**RESUMO:**

**Objetivo:** Avaliar o efeito antifúngico, sinérgico/aditivo, adesão em células orais e alteração dos fatores de virulência do Terpinen-4-ol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. **Materiais e métodos:** Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e as Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) do Terpinen-4-ol e Nistatina em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e atividade sinérgica/aditiva (método de “Checkerboard”) em biofilmes mono e multiespécie, além de avaliadas a adesão sobre células orais NOK Si e atividade de proteinases, fosfolipases e hemolisina. **Resultados:** A CIM para Terpinen-4-ol foi 2,31 mg/ml para ambas espécies e a CFM 0,002 mg/ml e 0,004 mg/ml respectivamente para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Quando testados em combinação houve efeito de aditivo e sinérgico (T-4-ol 1,06 mg/ml e Nis 0,00012 mg/ml) para *Candida albicans*. Em biofilme, houve aditismo para ambas as espécies. Assim, o Terpinen-4-ol apresentou efeito para as duas espécies de *Candida* quando usado isolado, porém em combinação, observou-se melhor efeito antifúngico. O Terpinen-4-ol demonstrou uma pequena redução na adesão de *Candida tropicalis* em células NOK Si, já a Nistatina teve maior efeito para as duas espécies. Quanto à atividade enzimática, Terpinen-4-ol e Nistatina não demonstraram ação, quando comparados ao grupo sem tratamento. **Conclusão:** O Terpinen-4-ol possui efeito antifúngico contra ambas as leveduras estudadas e em combinação com Nistatina o efeito do Terpinen-4-ol é potencializado, além de reduzir, in vitro, a adesão de *Candida tropicalis*. **Relevância clínica:** O efeito potencializado na combinação de Terpinen-4-ol e Nistatina e a redução da adesão vão confirmá-lo como agente anti-fúngico, visando, além de inibir o crescimento, diminuir a virulência.

**PALAVRAS CHAVE:** Terpinen-4-ol, Nistatina, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, sinergismo, adesão.

## INTRODUÇÃO

Na cavidade bucal, as espécies de *Candida* encontram diversos locais de adesão como as células da mucosa, língua ou superfícies dos dentes, próteses e de outros microrganismos presentes [1]. Para iniciar a doença, estas devem aderir a células epiteliais da mucosa bucal e subsequentemente, invadir e destruir estas células [2]. Exoenzimas são produzidas para melhorar sua capacidade de colonizar e estabelecer infecções [3], tais como aspartil protease e fosfolipases, que degradam a matriz extracelular, inibem a fagocitose por neutrófilos, induzem reações inflamatórias [4] e a hemolisina, seguida de aquisição de ferro, que facilita a invasão de hifas e o desenvolvimento de candidíase disseminada [5].

Dentre diversos agentes antifúngicos utilizados na prevenção e tratamento contra o gênero *Candida*, a Nistatina é o mais usado no tratamento do candidíase oral por possuir características fungicidas e fungistática [6]. Porém, estudos têm demonstrado a existência de *Candida albicans* resistentes e que alguns medicamentos podem ocasionar lesões nos rins e fígado [7, 8], o que evidencia a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas incluindo, por exemplo, uma busca de agentes com novos mecanismos de ação que podem ser utilizados de forma independente ou em combinação com medicamentos convencionais.

Extratos vegetais e compostos fitoquímicos provêm de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos e apresentam resultados entusiasmantes sobre os patógenos bucais e no controle da resposta inflamatória, servindo de veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas [9,10, 11].

O Terpinen-4-ol é um monoterpene encontrado em plantas como a *Melaleuca alternifolia*, *Hajeb Layoun arboreta* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet* e apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana e propriedades anti-inflamatórias [12, 13]. In vitro a atividade antifúngica foi demonstrada em culturas planctônicas sobre *C. albicans* em diferentes tipos de ensaios, como Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima [14, 15, 16].

A combinação de drogas é uma das abordagens que têm sido utilizadas para melhorar o efeito de terapia antimicrobiana de microrganismos resistentes [18]. Estudos mostraram efeitos sinérgicos quando agentes antifúngicos foram combinados [ 17, 18, 19]. Dessa forma, a avaliação da natureza e intensidade das interações medicamentosas devem ser estudadas, a fim de verificar se combinações de pequenas concentrações das drogas possuem melhores efeitos sobre os isolados estudados, resultando em baixa toxicidade e melhor eficácia [20, 21].

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antifúngico, sinérgico/aditivo, in vitro, entre Terpinen-4-ol e Nistatina sobre culturas planctônicas e biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, além da inibição da adesão das leveduras em células epiteliais bucais (NOK), e inibição das enzimas hidrolíticas proteinase, fosfolipase e hemolisina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados fúngicos e condições de crescimento

Foram utilizadas neste estudo *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida tropicalis* (ATCC 4563). As espécies de *Candida* cresceram a 37° C por 18 h em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) pH 7.0 tamponado com 0.165 M MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico), acrescido com glicose 2 %. As culturas obtidas tiveram a densidade optica ajustada a 600 nm (OD<sub>600</sub>), até atingir a absorbância de 1,0 para *Candida albicans* e 0,75 para *Candida tropicalis*, correspondendo a 1.0 x 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC ml<sup>-1</sup>).

### Preparo da Soluções

As diluições de Terpinen-4-ol (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) foram preparadas nas concentrações que variaram de 9,16 a 1,06 mg/ml em RPMI-1640, pH 7,0 (0,165 M MOPS), com 2 % de glicose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com Francisconi et al.[22], acrescido de dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, MO, USA) na concentração final de 0,4 % a fim de aumentar a solubilidade do óleo [17].

A solução de Nistatina (Sigma, MO, USA) foi preparada (em DMSO) como solução estoque na concentração de 64 µg/mL e posteriormente diluída entre 0,125 – 64 µg/mL, segundo norma M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

### Mínima concentração inibitória (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM):

A mínima concentração inibitória (CIM) foi determinada usando a técnica de microdiluição em caldo (CLSI - M27-A6). Utilizando placas de microtitulação de 96 poços, ambos compostos, tiveram suas concentrações multiplicadas por 4 vezes o valor inicial da concentração. Em fileiras e colunas, foram acrescentados Terpinen-4-ol e Nistatina, em diluições seriadas. Em cada poço (exceto no controle negativo) foram adicionadas as suspensões fúngicas, preparadas em RPMI, tendo como concentração final 1,0 x 10<sup>3</sup> UFC/mL. A ausência do Terpinen-4-ol e Nistatina, acrescido do microrganismo foram utilizados como controle positivo (C+) e ausência dos microrganismos foram utilizados como controle negativo (C-). Após 24 h a 37° C em agitador a 75 rpm (Incubadora, 430, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), os poços foram avaliados visualmente e por absorbância a OD<sub>492</sub> nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França), sendo o resultado avaliado por meio da menor concentração de cada droga capaz de inibir o crescimento completamente, representado zero na análise por espectrofotometria (590 nm) [Apêndice A].

Os orifícios que não mostraram crescimento visível, ou seja, DO 600nm ≤ 0,05, 10 µl das amostras foram retirados, e posteriormente plaqueados em meio de cultura SDA (Saboraude Dextrose Agar, Acumedia, Lansing, MI, EUA) e mantidas a 37°C por 48 h. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a ≥ 99,9%.

### Biofilme monoespécie e dual-espécie:

Para a formação do biofilme tanto mono espécie, quanto dual-espécie, as suspensões de *Candida albicans* e/ou *Candida tropicalis* foram transferidas para placas de microtitulação (96 poços) e mantidos a 37° C por 1 h e 30 min, sob agitação a 75 rpm. Os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril, RPMI 1640 foi adicionado e após 48 h, o meio de cultura foi removido e as soluções testadas (Terpinen-4-ol e Nistatina) foram adicionadas assim como realizado para o teste com microrganismos planctônicos. Após 24 h a 37° C, o biofilme

resultante foi lavado com PBS. A massa do biofilme aderido foi raspada cuidadosamente, aspirada e transferida para tubos falcon. A suspensão foi diluída e plaqueada em meio de cultura, sendo que para o biofilme única espécie, utilizou-se SDA (Saboraud Dextrose Agar, Acumedia, Lansing, MI, EUA) e biofilme multiespécies, Chromagar *Candida*. As placas foram mantidas a 37° C por 48 h e os resultados quantificados em UFC ml<sup>-1</sup>.

#### **Índice de Concentração Fracionada Inibitória:**

Os resultados tanto em testes com microrganismos planctônicos, quanto com biofilmes, foram avaliados por meio da menor concentração de cada droga capaz de inibir o crescimento completamente. Para isso, foi utilizado o Índice de Concentração Inibitória Fracionado (ICIF), método de “*Checkerboard*”, o qual corresponde à soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF). Estas equivalem à razão entre a CIM das substâncias A e B combinadas pela CIM de cada substância, conforme descrito abaixo [23,24].

CIFA= CIM da droga A com B/CIM de A sozinha

CIFB= CIM da droga B com A/CIM de B sozinha

ICIF= CIFA + CIFB

Nesta avaliação, o ICIF foi interpretado como indicativo de sinergismo se  $\leq 0,5$ , aditivo ou indiferente se  $> 0,5$  e  $\leq 1$ , e antagonismo se  $> 1$ [25, 23, 26]. Desta forma, definidas as CIMs do Terpinen-4-ol e da Nistatina frente às cepas de *Candida*, estas foram convertidas em concentração inibitória fracionada (CIF). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **Ensaio de adesão em co-cultura:**

Foi utilizada a linhagem celular normal NOK Si (células orais normais imortalizadas). As células foram mantidas e cultivadas em monocamadas em frascos de cultura de células em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*- Gibco Laboratories) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) e 2 % de antibiótico ATB (complexo estreptomicina, penicilina, gentamicina) e 2,20 g/l de bicarbonato de sódio, e mantidas em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub> à 37° C. Após confluência, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS (Salina tampão fosfato) e tripsinizadas. Com essa suspensão celular foram preparadas placas (24 poços), contendo 1 x 10<sup>5</sup> células por poço [27]. Após a formação da monocamada celular nas placas, o inóculo de *Candida albicans* ou *Candida tropicalis* (1x10<sup>3</sup> UFC/mL) juntamente com Terpinen-4-ol ou Nistatina na concentração estabelecida nos testes anteriores (1,06mg/ml de Terpinen-4-ol para ambas as espécies e 0,002 e 0,001mg/ml de Nistatina para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* respectivamente), concentração esta com atividade fungistática, foram adicionados aos poços e as placas incubadas a 36,5° C e 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 2 h (melhor tempo de adesão de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* em células NOK Si, determinado em curva de adesão realizada previamente ao ensaio). Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril, tripsinizadas e plaqueadas em Ágar Sabouraud. Após 48 h, foram contadas as colônias que cresceram nas placas, correspondentes ao número de leveduras aderidas às células, e os dados transformados em unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Como controle do ensaio, foi realizado ensaio de adesão sem o tratamento, sendo este considerado como 100% de adesão. Os resultados foram analisados em porcentagem em gráficos.

#### **Ensaio de proteinase, fosfolipase e hemolisina**

As espécies de *Candida* foram testadas para as atividades de fosfolipase, protease e hemolisina de acordo com Sardi et al. [28], sendo que o meio teste para proteinase foi ágar a base de albumina de soro bovino e o meio fosfolipase continha Emulsão de Ovo. A atividade da hemolisina foi avaliada utilizando placas de ágar sangue. As espécies de *Candida* foram cultivadas em SDA por 24 h, submetidas ao contato com as soluções testadas (Terpinen-4-ol e Nistatina na concentração estabelecida nos testes anteriores, concentração esta com atividade fungistática) pelo tempo previamente determinado no teste de adesão (2 h), e, após este tempo, uma única gota (10 µl) de cada espécie, contendo  $10^8$  UFC/ml (0,5 absorbância a 600 nm) foi inoculada no meio do ensaio. As placas foram incubadas a 37° C durante 48 h. O ensaio foi realizado em três ocasiões separadas para cada isolado. Como controle negativo, foi utilizado apenas o inóculo de cada espécie juntamente com o meio de cultura (RPMI 1640).

A atividade enzimática foi determinada pela medição do halo formado em torno da colônia de levedura, e a relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação (Pz), de acordo com o método descrito por Price et al [29], De acordo com esse sistema, Pz=1,0 indicam que a cepa teste foi negativa para proteinase / fosfolipase / hemolisina, enquanto que um valor de Pz 0,63 significa que a espécie estudada libera grandes quantidades enzimáticas (fortemente positivo). Valores de Pz de entre 0,64 e 0,99 significam pequenas quantidades de enzimas (positivas).

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos sobre a atividade do Terpinen-4-ol na adesão das espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* em células NOK Si, 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). Posteriormente utilizou-se ANOVA a um critério seguido pelo teste de Tukey HSD para identificar a existência de diferenças significantes entre os tratamentos utilizados (controle, Terpinen-4-ol e Nistatina) para cada cepa estudada e a variável dependente analisada foi Unidades formadoras de colônia (UFC/ml) após serem transformadas em Log (UFC/ml). As análises inferenciais foram executadas com software SPSS (v.17, SPSS Inc, Chicago, IL), considerando-se estatisticamente significativos os efeitos cujo p-value foi inferior ou igual a 0,05.

### **RESULTADOS:**

#### **Mínima concentração inibitória (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM):**

O Terpinen-4-ol para ambas as espécies, *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida tropicalis* (ATCC 4563), obteve a CIM de 2,31 mg/ml e a CFM de 4,53 mg/ml. A CIM da Nistatina para *Candida albicans* foi 0,004 mg/ml e para *Candida tropicalis* foi 0,002mg/ml, enquanto que a CFM encontrada foi de 0,008 e 0,004 mg/ml para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* respectivamente.

Na Tabela 1, os valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e a atividade apresentada na associação do Terpinen-4-ol e Nistatina testados pelo método de “Checkerboard” sobre culturas planctônicas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos. Para *Candida albicans* foi encontrado aditismo em algumas concentrações e sinergismo na concentração Terpinen-4-ol 1,06 mg/ml e Nis 0,00012 mg/ml. Para *Candida tropicalis* pode-se observar aditismo nas concentrações de Terpinen-4-ol 1,06 mg/ml e Nistatina 0,001 mg/ml - 0,0003 mg/ml, sendo que, o Terpinen-4-ol foi capaz de reduzir em até 64 vezes a CIM da Nistatina, em ambas espécies. Isso demonstra que o Terpinen-4-ol e a Nistatina

possuem efeito antifúngico para as duas espécies avaliadas quando utilizados separadamente e, quando utilizados em combinação o efeito é potencializado.

**Biofilme simples e multiespécie:**

A CIM em biofilme apresentou respectivamente as concentrações Terpinen-4-ol 4,53 mg/ml e 2,31 mg/ml para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A partir da concentração Nistatina 0,008 mg/ml houve inibição do crescimento de ambas as espécies de *Candida*.

Em biofilme simples, *Candida albicans* obteve relação de aditismo com a combinação dos medicamentos Terpinen-4-ol 2,31 mg/ml e Nistatina 0,002 – 0,001 mg/ml, onde o Terpinen-4-ol foi capaz de reduzir em até 8 vezes a CIM da Nistatina. Porém *Candida tropicalis* não apresentou nenhuma relação de sinergismo/aditismo (Tabela 2).

Em biofilme duplo de *C. albicans* e *C. tropicalis*, a CIM para ambas as espécies foi Terpinen-4-ol 9,16 mg/ml e Nistatina 0,008 mg/ml e a combinação de ambos os medicamentos resultou num efeito indiferente, exceto para *Candida tropicalis* nas concentrações 2,42 mg/ml e 0,004 mg/ml respectivamente e Terpinen-4-ol reduziu 2 vezes a CIM da Nistatina (Tabela 2).

**Tabela 1.** Atividade sinérgica/moduladora do Terpinen-4-ol e da Nistatina sobre cultura planctônica de *C. albicans* e *C. tropicalis*

Suspensão planctônica	T-4-ol + Nis			
	T-4-ol (CIM)	Nis (CIM)	ICIF	Efeito/Potencial Nis
<i>Candida albicans</i>	1,06 mg/ml	0,002mg/ml	0,96	Aditismo
	1,06 mg/ml	0,001mg/ml	0,71	Aditismo 2x
	1,06 mg/ml	0,0005mg/ml	0,58	Aditismo 4x
	1,06 mg/ml	0,00025mg/ml	0,52	Aditismo 8x
	1,06 mg/ml	0,00012mg/ml	0,49	Sinergismo 16x
	1,06 mg/ml	0,0006mg/ml	0,61	Aditismo 32x
	1,06 mg/ml	0,0003mg/ml	0,53	Aditismo 64x
<i>Candida tropicalis</i>	1,06 mg/ml	0,001mg/ml	0,96	Aditismo 2x
	1,06 mg/ml	0,0005mg/ml	0,71	Aditismo 4x
	1,06 mg/ml	0,00025mg/ml	0,58	Aditismo 8x
	1,06 mg/ml	0,00012mg/ml	0,52	Aditismo 16x
	1,06 mg/ml	0,0006mg/ml	0,49	Aditismo 32x
	1,06 mg/ml	0,0003mg/m	0,61	Aditismo 64x

**Tabela 2.** Atividade sinérgica/moduladora do Terpinen-4-ol e da Nistatina sobre biofilme simples e multiespécie de *C. albicans* e *C. tropicalis*

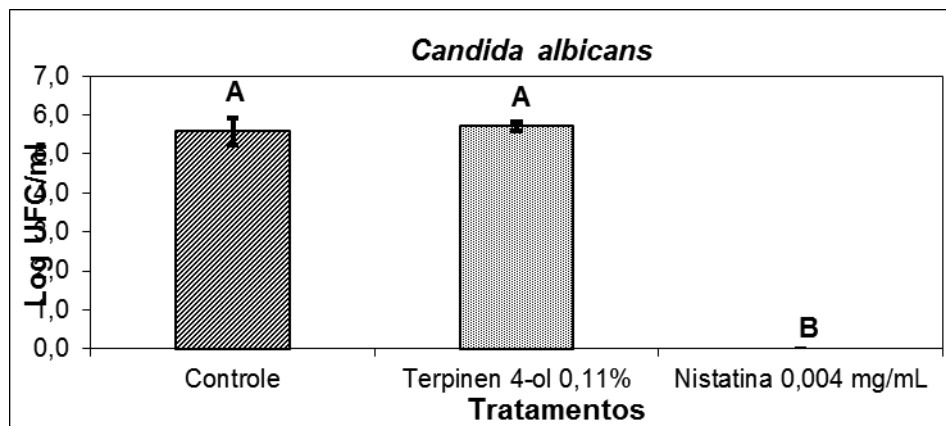
Biofilme	Espécie	T-4-ol + Nis			Efeito /Potencial Nis
		T-4-ol (CIM)	Nis (CIM)	ICIF	
Biofilme simples	<i>C. albicans</i>	2,31 mg/ml	0,002mg/ml	0,76	Aditismo 4x
		2,31 mg/ml	0,001mg/ml	0,63	Aditismo 8x
Biofilme duplo	<i>C. tropicalis</i>	2,42 mg/ml	0,004 mg/ml	0,76	Aditismo 2x

Na Tabela 2 estão demonstradas as concentrações que tiveram resultado de sinergismo/aditismo. Assim, não foram mostrados resultados para *C. tropicalis* em biofilme simples e *C. albicans* em biofilme duplo, já que estas não tiveram nenhum tipo de atividade.

#### Ensaio de adesão em co-cultura:

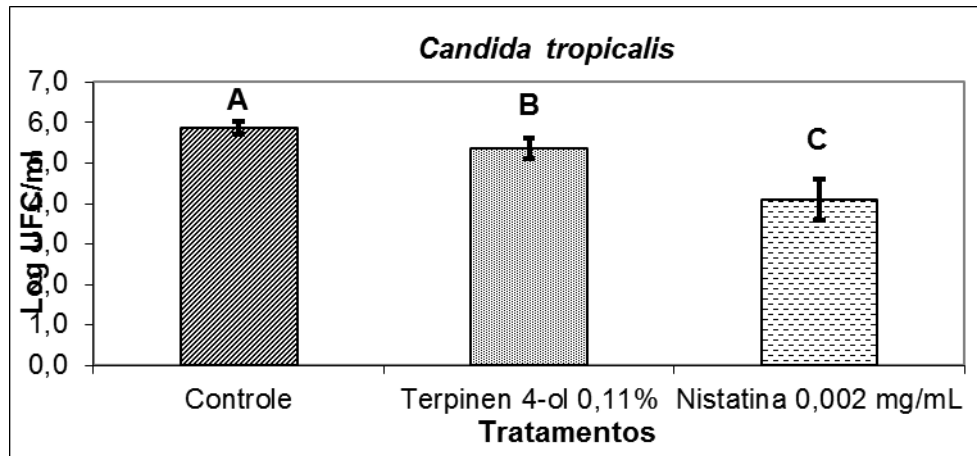
Foi determinada a curva de padronização da adesão de *C. albicans* e de *C. tropicalis*, em células NOK Si (tempo inicial da adesão da levedura na cultura celular e o tempo em que ocorre a maior taxa de adesão) e em duas horas, houve maior taxa de adesão.

Quando a adesão de *C. albicans* em células NOK Si foi avaliada após o contato com Terpinen-4-ol (0,11%) e Nistatina (0,004 mg/ml), não foi observada diferença estatisticamente significante entre o grupo testado com Terpinen-4-ol e o grupo controle (sem tratamento). Em relação ao grupo testado com Nistatina, houve redução significativa na adesão de *C. albicans*, como pode-se observar na Figura 1. A Figura 2 mostra que, na avaliação realizada com *C. tropicalis*, houve uma pequena redução da adesão quando utilizado o Terpinen-4-ol (0,11%), porém esta redução foi maior para a Nistatina (0,002mg/ml), comparado ao grupo controle ( $p < 0.05$ ).





**Figura 1.** Efeito do Terpinen-4-ol e da Nistina na adesão de *C. albicans* em co-cultura com células orais normais imortalizadas (NOK Si). Diferenças estatísticas estão representadas por diferentes letras para comparação entre tratamentos (ANOVA One-way seguida pelo teste de tukey,  $p < 0.05$ )



**Figura 2.** Efeito do Terpinen-4-ol e da Nistina na adesão de *C. tropicalis* em co-cultura com células orais normais imortalizadas (NOK Si). Diferenças estatísticas estão representadas por diferentes letras para comparação entre tratamentos (ANOVA One-way seguida pelo teste de tukey,  $p < 0.05$ )

#### Ensaio de proteinase, fosfolipase e hemolisina

As espécies de *Candida* foram testadas para as atividades de fosfolipase e proteinase de acordo com Sardi et al. (2012). A atividade das enzimas hidrolíticas foi detectada medindo o tamanho da zona de precipitação após o crescimento em ágar para fosfolipase, protease e hemolisina.

**Tabela 3.** Valores da média das razões entre as medidas das colônias e seus respectivos halos (Pz) e atividade enzimática (proteinase, fosfolipase e hemolisina) de *Candida albicans* (*C.a*) e *Candida tropicalis* (*C.t*) após contato de 2 h com terpinen-4-ol e Nistatina

		Controle		Terpinen-4-ol		Nistatina	
		Pz	Atividade enzimática	Pz	Atividade enzimática	Pz	Atividade enzimática
<b>Proteinase</b>	<i>C.a.</i>	6,915511	Moderada	0,626366	Moderada	0,583228	Moderada
	<i>C.t.</i>	0,366024	Elevada	0,378112	Elevada	0,464813	Moderada
<b>Fosfolipase</b>	<i>C.a.</i>	0,676846	Moderada	0,647597	Moderada	0,508426	Moderada
	<i>C.t.</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Hemolisina</b>	<i>C.a.</i>	0,491761	Moderada	0,495198	Moderada	0,398225	Elevada
	<i>C.t.</i>	0,417553	Moderada	0,41421	Moderada	0,349847	Elevada

Pode-se observar na Tabela 3 que Terpinen-4-ol e Nistatina não possuem ação sobre esses fatores de virulência (produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina). Os valores da razão entre as medidas das colônias e seus respectivos halos não diminuíram quando comparados ao grupo controle onde não foi realizado nenhum tratamento. Para *C.tropicalis* não houve produção de fosfolipase em nenhum dos grupos estudados.

#### **Discussão:**

Baixas concentrações encontradas para Terpinen-4-ol foram capazes de inibir in vitro o crescimento das espécies de *Candida* na forma planctônica (0,24% ou 2,31 mg/ml para *C. albicans* e *C.tropicalis* ) apresentando assim, efeito fungicida, o qual foi mostrado também por [ 14, 30, 31, 32]. Em biofilme simples, Terpinen-4-ol 4,53 mg/ml e 2,31 mg/ml apresentou atividade antifúngica respectivamente para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em biofilme multiespécie, *C. albicans/C. tropicalis*, o MIC para ambas as espécies foi Terpinen-4-ol 9,16 mg/ml. Esse resultado em biofilme multiespécie corrobora com os achados de [33] que mostraram resultados semelhantes aos do presente estudo, sugerindo que biofilmes compostos por mais de uma espécie, o torna mais resistente.

Evidências científicas mostram que o uso de Nistatina no tratamento de infecções fúngicas orais [34] é indicado pois apresentam vantagens como a utilização tópica e menor efeito colateral [35]. No entanto, a resistência fúngica tem sido relatada [35] e a associação entre antifúngico sintético e natural apresenta-se como alternativa na redução da dose e dos efeitos secundários indesejáveis, bem como na prevenção do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos [36].

Um dos protocolos mais simples e mais conhecidos para investigar a atividade antimicrobiana de produtos sintéticos ou agentes naturais, é o teste do tabuleiro de xadrez (checkerboard), o qual fornece um arranjo bidimensional de diferentes concentrações de substâncias e permite o cálculo do IFIC, necessário para avaliar a combinação de sinergismo, aditismo, indiferença ou antagonismo [23]. A adoção de esquemas com uso simultâneo de agentes antimicrobianos, buscando-se maximizar as chances de êxito no processo terapêutico, é usual. Obtém-se melhoria do espectro de ação, otimização de tempo de tratamento, de intervalos e de doses e, até mesmo, redução de resistência [37]. Assim, os resultados aqui mostrados usando a técnica “checkerboard” foram eficazes, sendo que o Terpinen-4-ol e a Nistatina quando utilizados em conjunto, tiveram efeito de aditismo em algumas concentrações combinadas e de sinergismo nas concentrações Terpinen-4-ol 1,06 mg/ml e Nis 0,00012 mg/ml no teste para células planctônicas de *C. albicans* .

Em biofilme simples, a associação Terpinen-4ol/Nistatina, mostraram resultados indiferentes, exceto para *C. albicans*, onde a combinação Terpinen-4-ol 2,31 mg/ml e Nistatina 0,002 – 0,001 mg/ml apresentaram efeito aditivo. Em biofilme duplo, a combinação de ambos resultou num efeito indiferente, exceto para *C. tropicalis* nas concentrações Terpinen-4-ol e Nistatina 2,42 mg/ml e 0,004 mg/ml respectivamente. Isso demonstra que o Terpinen-4-ol possui efeito antifúngico para as duas espécies avaliadas quando utilizado separadamente. Entretanto, quando utilizado em combinação o efeito foi potencializado.

Além disso, como já descrito anteriormente, a Nistatina pode causar alguns efeitos colaterais em rins e fígado e causar resistência microbiana. Assim, nos resultados aqui apresentados pode-se observar que o Terpinen-4-ol foi capaz de diminuir as CIMs da Nistatina, quando usados em conjunto, reduzindo, em culturas planctônicas, em até 64 vezes e em até 8 vezes em biofilmes simples de *Candida albicans* e 2 vezes em

biofilmes duplos, inibindo o crescimento de *Candida tropicalis*. Com isso, esta associação (Terpinen-4-ol e Nistatina) nos parece interessante, uma vez que consegue reduzir a quantidade de Nistatina utilizada nas terapias antifúngicas, diminuindo, assim, seus efeitos indesejáveis.

Efeitos sinérgicos também foram observados entre outros óleos essenciais e medicamentos. A combinação de *Coriandrum sativum* e anfotericina B obteve efeitos sinérgicos para *C. albicans* e aditivos para *C. tropicalis* [38]. Monoterpenos (timol e carvacrol) e fluconazol também foram sinérgicos contra 38 isolados de *Candida* [20]. Além desses estudos, outras pesquisas já foram realizadas envolvendo antimicrobianos já utilizados no mercado como fluconazol, anfotericina, caspofugina, doxiciclina [21, 39, 40, 41, 42].

A elucidação dos mecanismos de ação de agentes com potencial farmacológico, de origem natural ou sintética, contribui para o desenvolvimento racional de abordagens terapêuticas, especialmente em termos de infecções causadas por microrganismos resistentes, as quais frequentemente necessitam de combinações de drogas ou o uso de novas drogas quando o agente de primeira escolha não é eficaz.

Os monoterpenos, como o Terpinen-4-ol, são moléculas hidrofóbicas permitindo-lhes se depositar sobre estruturas lipofílicas de microrganismos, tais como a membrana plasmática, levando ao aumento da permeabilidade e consequente perda dos eletrólitos essenciais para a sobrevivência das células [16, 32, 43]. O TTO (tea tree oil) e seus componentes (incluindo o Terpinen-4-ol) inibem a respiração de *C. albicans* de maneira dose-dependente [14]. Segundo Carson et al [43], o tratamento com 1,0% do óleo de *Melaleuca alternifolia* altera em 95% as membranas mitocondriais de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *Saccharomyces cerevisiae* por meio de acidificação induzida pela glicose. A acidificação ocorre em grande parte pela expulsão de prótons ATPase de membrana do plasma, a qual é alimentada por ATP derivado da mitocôndria. A inibição desta função sugere que o plasma e/ou membranas mitocondriais foram afetados negativamente. Estes resultados são consistentes com um mecanismo proposto de ação antifúngica o qual provoca alterações ou danos no funcionamento das membranas de fungos além da inibição na formação de tubos germinativos ou da conversão micelial de *C. albicans* [44, 45].

No estudo de Ramage e colaboradores [33] o Terpinen-4ol ( $CIM_{50} = 0,25\%$ ) foi citotóxico tanto para fibroblastos quanto para células epiteliais, porém, ao utilizar  $0,5 \times CIM_{50}$ , Terpinen-4-ol não demonstrou toxicidade. No estudo de Nogueira e colaboradores, em 2014 [12], o Terpinen-4-ol foi citotóxico para macrófagos entre 0.238 e 0.119 %. Evidências ao longo do tempo sugerem que o uso tópico é seguro e que os eventos adversos são menores, auto-limitados, e pouco frequentes. Evidências mais concretas, como trabalhos científicos publicados são escassas, e muita informação permanece fora do domínio público sob a forma de relatórios patrocinados pelas empresas fabricantes [43]. Assim, a avaliação da citotoxicidade do Terpinen-4-ol em células NOK Si será realizada nos próximos passos, para que seu uso seja feito em concentrações seguras.

A adesão microbiana em materiais biológicos é um elemento essencial para o passo inicial no processo infeccioso. Além da presença de adesinas microbianas e receptores em células hospedeiras, hidrofobicidade da superfície microbiana tem sido descrita como um fator importante que influencia a adesão de microrganismos. Para entender a patogênese da candidíase, in vivo, estudos in vitro têm sido desenvolvidos para caracterizar e quantificar a adesão de *Candida* a superfícies celulares [28]. Os dados do presente estudo indicam que o Terpinen-4-ol pode afetar a adesão em *C. tropicalis* na concentração  $CIM_{50}$ , mas apenas a Nistatina foi eficaz na inibição da adesão de ambas espécies, principalmente em *C. albicans*.

Sudjana et al [46] estudaram o efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* na adesão de isolados de *C. albicans* em células de mamíferos (células epiteliais bucais- BEC, HeLa e A549), não tendo resultados significantes em células BEC e A549, sugerindo que mudanças da hidrofobicidade da superfície desempenham apenas um pequeno papel na redução de adesão e que os fatores adicionais, tais como a interação com receptores de ligação, como anteriormente mencionado e inibição da formação de tubos germinativos podem estar envolvidos. Morey et al em 2016 [47] avaliaram a adesão de *C. tropicalis* em células hepáticas (HEp-2) após exposição a fração condensada rica em taninos (F2) de *Stryphnodendron adstringens*, obtendo redução na adesão ( $43.13 \pm 14.29\%$ ). Outro estudo em 2016 mostrou o efeito do Caspofungin em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* e células epiteliais bucais, os quais obtiveram aproximadamente 70% de redução na adesão de ambas espécies [48]. A diminuição estatisticamente significativa na adesão de *C. albicans* (ATCC 10231) à fibroblastos comparado ao controle foi demonstrada em estudo onde o microrganismo foi exposto a CIM de óleos essenciais (Erva-cidreira, Citronela, Geranium Clove). Entretanto, quando o mesmo ensaio foi realizado na presença de metade da CIM, assim como no presente estudo, sua capacidade de adesão não foi afetada significativamente, o que corrobora com nossos resultados [49]. Segundo Sun et al [19], em biofilmes de *C. albicans* a penetração de líquidos antimicrobianos é limitada, inclusive pelo Terpinen-4-ol, devido a sua baixa molhabilidade. Isso poderia explicar o fato do Terpinen-4-ol não ter interferido na adesão de *C. albicans* em células orais, uma vez que não foi possível sua penetração nas células fúngicas com a CIM<sub>50</sub>.

A produção de fatores de virulência pelos fungos, como as exoenzimas, melhoram a capacidade de adesão, penetração e proliferação nos tecidos e assim, facilita o estabelecimento das infecções por *Candida* [3]. Sendo assim, o estudo de mecanismos que reduzam a virulência torna-se de extrema importância para o combate à candidíase oral. Em nosso estudo, a inibição da atividade proteolítica pelo Terpinen-4-ol e Nistatina não mostrou resultados satisfatórios sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*. A produção desses fatores de virulência estão de acordo com relatos de outros pesquisadores [5, 50, 51]. Segundo Hube et al [4], aspartil proteases secretadas (SAPs) degradam muitas proteínas em locais de lesão, tais como a albumina, hemoglobina, queratina, e imunoglobulinas secretoras. Estas atividades proteolíticas de SAPs são importantes para a virulência de *Candida* spp. Portanto, a inibição da produção de proteinase extracelular enfraquece a colonização das células de *Candida* e pode ser facilmente contornada por células do sistema imunológico. No estudo de Patel e colaboradores, em 2009 [52], o extrato vegetal utilizado (*Dodonaea viscosa* var. *angustifolia*) também não teve efeito sobre a produção de proteinase e fosfolipase. Assim, sugere-se que baixas concentrações utilizadas neste estudo alteraram as características de superfície, mas não penetraram na célula leveduriforme, causando alterações na produção de enzimas hidrolíticas. Além disso, as drogas testadas também não foram eficazes em inibir a produção de hemolisina na concentração usada (CIM<sub>50</sub>). Um estudo realizado com Nistatina, fluconazol e anfotericina B revelou que isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* tiveram a atividade de hemolisina reduzida [53]. No estudo de Khan et al [54], os óleos testados (*Carum copticum* e *Thymus vulgaris*) foram eficazes ao inibir a produção de hemolisina utilizando (CIM<sub>25</sub>), porém, os autores afirmam não ter conhecimento de casos de inibição da produção de hemolisina em *C. albicans* por óleos essenciais. Estudos de Costa et al [55] mostraram que altas concentrações de azóis causam aumento da atividade SAPs em isolados resistentes. Ensaio realizado com fluconazol e voriconazol (0; 1; 1/2 e 1/4 MIC) mostrou que isolados resistentes de *C. albicans* exibiram altos níveis de SAP.

**Conclusão:**

A combinação de Terpinen-4-ol e Nistatina apresentou efeito antifúngico potencializado sobre as duas espécies de *Candida* avaliadas, mostrando efeito sinérgico/modulador em culturas planctônicas e biofilmes. Terpinen-4-ol reduz a adesão de *C. tropicalis* e a Nistatina reduz a adesão de ambas as espécies em células orais imortalizadas (NOK Si). As concentrações sub-inibitorias (CIM<sub>50</sub>) de Terpinen-4-ol e Nistatina utilizadas não apresentaram atividade na produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina.

**Financiamento:**

Este estudo foi financiado pelo Governo Estadual por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número: 2015/00155-0) por meio de bolsa de estudo (2015/00155-0) e auxílio pesquisa (2015/08742-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências

1. Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W (2002) *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol* 17(1):60-4.
2. Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ (2000) Oral candidosis. *Clin Dermatol* 18(5):553-62.
3. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF, Gonçalves RB (2010) *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci* 52:177–185.
4. Hube B, Ruchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC (1998) Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv Exp Med Biol* 436:339–344.
5. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranyake LP, Siu SC (2007) Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol* 56:1393–1398.
6. Cione APP, Liberale MJ, Silva PM (2010) Development and validation of an HPLC method for stability evaluation of nystatin. *Braz J Pharm Sci* 46:305-10.
7. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A (2004) Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* 8:217-26.
8. Rosato A, Cesare V, Monica P, Manuela M, Argentieri MP, Mallamaci R (2009) In vitro synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* specie. *Phytomedicine* 16(10):972-975
9. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA (2008) 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* 105(3):327-32.
10. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE (2006) The influence of a novel propolis on *Streptococci mutans* biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 51(1):15-22.
11. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al (2009) Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia* 80(6):313-9.
12. Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DMP (2014) Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res* 63:769–78.
13. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH (2012) Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:1-3.
14. Cox SD, Mann CM, Markham JL (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J appl microbiol* 91:492–7.
15. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, and Yamaguchi H (2001) Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol*. 45:201–208.

16. Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Antimicrob Chemother 53(6):1081-5.
17. Guo Q, Sun S, Yu J, Li Y, Cao L (2008) Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. J Med Microbiol 57:457–462.
18. Li Y, Sun S, Guo Q, Ma L, Shi C, Su L et al (2008) In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *C. albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. J Antimicrob Chemother 61:577–585.
19. Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L (2008) In vitro interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods. Antimicrob Agents Chemother 52:409–417.
20. Ahmad A, Khan A, Manzoor N (2013) Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. Eur J Pharm Sci 48:80-6.
21. Cordeiro RA, Teixeira CEC, Brilhante RSN, Castelo-branco DSCM, Paiva MAN, Leite JJG et al (2013) Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. Medical Mycology 51:53–59.
22. Francisconi RS, Bordini EAF, Nogueira MNM, Fontana A, Bedran TBL, Correia MF, Spolidorio DMP (2015) Effect of *Melaleuca Alternifolia* and Its Components on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J US China Med Sci 12: 91-98.
23. Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother 52:1.
24. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner I, Perfect JR, Rex JH (2004) Combination antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 48:693-715.
25. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA (2000) Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii* a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 38(1):43-50.
26. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL (2002) Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. Diagn Microbiol Infect Dis 44(4):363-366.
27. Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hofling JF, Gonçalves RB (2011) Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis. A pilot study. Arch Oral Biol 56:1098–1105.
28. Sardi JCO, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB (2012) Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. Med Mycol 50:467–475.
29. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20:7–14.

30. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Salvatore AC, Giuseppe (2006) 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* 6:158-65.
31. Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J appl Microbiol* 95:853-60.
32. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W (2015) The influence of Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/590470.
33. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, 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.
34. Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA (2001) A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 92:170-9.
35. Mohamadi J, Motaghi M, Panahi J, Havasian MR, Delpisheh A, Azizian M (2014) Anti-fungal resistance in *Candida* isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation* 10:667-70.
36. Bicmen C, Doluca M, Gulat S, Gunduz AT, Tuksavul F (2012) Species level identification and antifungal susceptibility of yeast isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. *New Microbiol* 35:327-34.
37. Berenbaum MC (1989) What is synergy? *Pharmacol Rev* 41(2):93-141.
38. Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonc DI, Domingues FC (2011) Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19:42- 47.
39. Gao T, Zhang C, Lu C, Liu P, Li Y, Li H, Sun S (2013) Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. *FEMS Yeast Res* 13(5):453-462.
40. Wei GX, Xu X, Wu CD (2011) In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch Oral Biol* 56(6):565-72.
41. Zhou Y, Wang G, L Yi, Liu Y, Song Y, Zheng W et al (2012) In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(6):3250-60.
42. Kumar SN, Nambisan B, Mohandas C, Sundaresan A (2013) In vitro synergistic activity of diketopiperazines alone and in combination with amphotericin B or clotrimazole against *Candida albicans*. *Folia Microbiol* 58:475-482.



43. Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *ClinMicrobiol Rev* 19:50-62.
44. D'Auria FD, Laino L, Strippoli V, Tecca M, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G (2001) In vitro activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. *J Chemother* 13:377-383.
45. Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2000) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol* 38:355-362.
46. Sudjana AN, Carson CF, Carson KC, Riley TV, Hammer KA (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. *Mel Mycol* 50:863-870.
47. Morey AT, Souza FC, Santos JP, Pereira CA, Cardoso JD, Almeida RS et al (2016) Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Curr Pharm Biotechnol* 17(4):365-75.
48. Ellepola ANB, Chandy R, Khan ZU, Samaranayake LP (2016) Caspofungin-induced in-vitro post-antifungal effect and its impact on adhesion related traits of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Microbiol Immunol*. doi: 10.1111/1348-421.12362.
49. Budzyńska A, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Różalska B (2014) Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. *Acta Biochim Pol* 61(1):115-21.
50. Akcaglar S, Ener B, Tore O (2011) Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Turk J Biol* 35:559-567.
51. Sachin CD, Ruchi K, Santosh S (2012) In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *Int J Med Biomed Res* 1:153-157.
52. Patel M, Gulubea Z, Duttonb M (2009) The effect of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* proteinase and phospholipase production and adherence to oral epithelial cells. *J Ethnopharmacol* 124(3):562-5.
53. Anil S, Hashem M, Vellappally S, Patil S, Bandara HM, Samaranayake LP (2014) Sub-inhibitory concentrations of antifungals suppress hemolysin activity of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates from HIV-infected individuals. *Mycopathologia* 178(3-4):207-15.
54. Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F (2014) Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complement Altern Med* 14:337.
55. Costa CR, Jesuino RSA, Lemos JA, Fernandes OFL, Souza LKH, Passos XS, Silva MRR (2010) Effects of antifungal agents in Sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia* 169:91-98.

#### 4 CONCLUSÃO

O efeito potencializado na combinação de Terpinen-4-ol e Nistatina, juntamente com a redução da adesão vão confirmar sua eficácia como agentes anti-patogênicos. Uma vantagem potencial desta abordagem é que o Terpinen-4-ol pode ser um novo agente antimicrobiano que visa, além de inibir o crescimento, diminuir a resistência e a virulência, e sua associação com a Nistatina ser mais vantajosa em relação aos antifúngicos existentes. Terapias novas que almejam outros mecanismos como a adesão e a virulência, ao invés de simplesmente o crescimento celular *in vitro* é suplemento adicional ao armamento antimicrobiano atual. Assim, pesquisas *in vitro* e *in vivo* devem ser realizadas para investigar outros possíveis mecanismos de ação do Terpinen-4-ol, a fim de desenvolver novas formulações que sejam capazes de inibir a adesão de *Candida* spp.

## REFERÊNCIAS\*

1. Abe S, Maruyama N, Hayama K, Ishibashi H, Inoue S, Oshima H. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediators Inflamm.* 2003; 12(6): 323-8.
2. Adegoke GO, Iwahashi H, Komatsu Y, Obuchi K, Iwahashi Y. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielli*. *Flavour Fragr J.* 2000; 15(3): 147-50.
3. Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1-2): 80-6.
4. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
5. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. Is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1995; 270(46): 27489-94.
6. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(4): 363-6.
7. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii* a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 38(1):43-50.
8. Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ.* 2001; 65(8): 785-7.
9. Canton E, Peman J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1593-6.
10. Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *M. alternifolia*. *J Appl Bacteriol.* 1995; 78(3): 264-9.
11. 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.
12. 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.
13. Cione APP, Liberale MJ, Silva PM. Development and validation of an HPLC method for stability evaluation of nystatin. *Braz J Pharm Sci.* 2010; 46(2): 305-10.

\*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

14. Cordeiro RA, Teixeira CEC, Brilhante RSN, Castelo-branco DSCM, Paiva MAN Giffoni Leite JJ, et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Med Mycol.* 2013; 51(1): 53–9.
15. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 492–7.
16. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2011; 33(8): 1387-92.
17. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
18. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1): 15-22.
19. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11):685-702.
20. Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol.* 2000; 18(5): 553-62
21. Fiori A, Van Dijck P. Potent synergistic effect of doxycycline with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by interference with iron homeostasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(7): 3785–96.
22. Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BG. Adverse effects of antifungal therapies in nvasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25(2): 138-49.
23. Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL, Leach DN. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J.* 1999; 14(5): 322–32.
24. Guo Q, Sun S, Yu J, Li Y, Cao L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. *J Med Microbiol.* 2008; 57(Pt 4): 457–62.
25. 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.
26. Hube B, Ruchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 436: 339–44.
27. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol.* 2001; 45(3): 201–8.
28. Inui T, Wang Y, Deng S, Smith DC, Franzblau SG, Pauli GF. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A.* 2007; 1151(1-2): 211-5.

29. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner I, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 693-715.
30. Khan MS, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2012; 50(1): 33–42.
31. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 2002; 70(2): 878-88.
32. Lavra ZMM, Sonego F, Silva RMF, Medeiros FPM. Development and validation of an analytical method for Nystatin vaginal cream by high performance liquid chromatography. *Braz J Pharm Sci.* 2008; 44(4): 637-43.
33. Li R C, Schentag JJ, Nix DE. The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(3): 523–31.
34. Li Y, Sun S, Guo Q, Ma L, Shi C, Su L, et al. In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *C. albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(3): 577–85.
35. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia.* 2009; 80(6): 313-9.
36. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(3):183-9.
37. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2): 119–28.
38. Mohamadi J, Motaghi M, Panahi J, Havasian MR, Delpisheh A, Azizian M. Anti-fungal resistance in candida isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation.* 2014; 10(11): 667–70.
39. Moleyar V, Narasimham P. Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiol.* 1986; 3: 331–6.
40. Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res.* 2014; 63(9): 769–78.
41. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(1):1.
42. 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.

43. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20(1): 7 – 14.
44. 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.
45. Ramanan N, Wang Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*. 2000; 288(5468): 1062–4.
46. Reynaud AH, Nygaard- Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(9): 860–4.
47. Rosato A, Cesare V, Monica P, Manuela M, Argentieri MP, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* specie. *Phytomedicine*. 2009; 16(10): 972-5.
48. Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hofling JF, Gonçalves RB. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis. A pilot study. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(10): 1098–105.
49. Sardi JC, Duque C, Mariano FS et al. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci*. 2010; 52(2): 177–85.
50. Sardi JCO, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol*. 2012; 50(5): 467–75.
51. Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonc DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 2011; 19(1): 42–7.
52. Sun L, Zhang C, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loades with terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem*. 2012; 60 (24): 6150–6.
53. Thein ZM, Smaranayake YH, Smaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS*. 2007; 115(11): 1241-51.
54. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *C. dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses*. 2004; 47(7): 315-8.
55. Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 10): 1393–8.
56. Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17(1): 60-4.

57. Wei G, Xu X, Wu CD. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. Arch Oral Biol. 2011; 56(6): 565-72.
58. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91(3): 317–21.
59. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012: 1-3.

## **APÊNDICE A – Material e Método**

### **Isolados fúngicos e condições da cultura**

Foram utilizadas neste estudo cepas de referência *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida tropicalis* (ATCC 4563).

As espécies de *Candida* foram reativadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) pH 7,0 tamponado com 0,165 M MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico), acrescido com glicose 2 % e mantidos a 37° C por 18 h. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min e as células lavadas 2 vezes com tampão fosfato (PBS) estéril. Em seguida, o material resultante teve sua turbidez ajustada com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Alemanha), a 600 nm até atingir absorvância que foi determinada previamente ao experimento, o que correspondeu a uma suspensão para solução estoque de  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

### **Preparo das soluções de Terpinen-4-ol**

Previamente a utilização do óleo nos experimentos, foi realizada a diluição do Terpinen-4-ol (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) nas concentrações 0,11% - 0,24% - 0,47% - 0,95% em RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A fim de aumentar a solubilidade do óleo, foi adicionado dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, MO, USA) na concentração final de 0,4% (Hammer 2004).

### **Preparo das soluções de Nistatina**

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 (0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 – 16 – 32 – 64) segundo norma M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

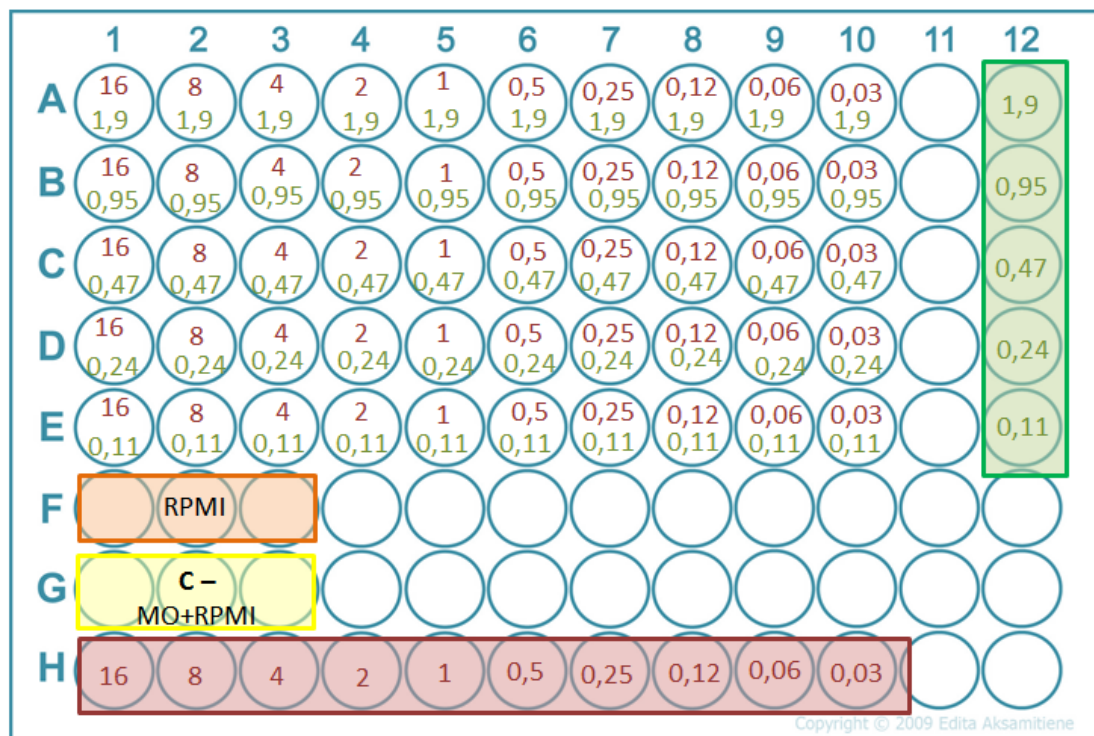
### **Avaliação da atividade sinérgica/moduladora pelo Método de *Checkerboard* ("Tabuleiro de Xadrez") do Terpinen-4-ol e da Nistatina**

O teste de susceptibilidade foi desenvolvido utilizando-se o método de microdiluição em caldo segundo as normas estabelecidas pela CLSI (M27-A6) (2002), no qual consiste na aplicação de duas substâncias sobre um determinado microrganismo e, conseqüentemente, na determinação da CIM da associação das drogas (Bonapace et al.<sup>7</sup>, 2000). O meio de cultura que utilizado foi o RPMI-1640, pH 7,0 (0,165 M MOPS), com 2 % de glicose. Na fileira G,



de 1 a 3, foi adicionado 200 µl de RPMI, como controle negativo, enquanto que, na fileira H, de 1 a 3, foi adicionado 100 µl de RPMI juntamente com 100 µl de inóculo na concentração de  $10^6$  células/ml, como controle negativo. Na coluna 12, foi acrescentado o Terpinen-4-ol em diluição seriada, de A a E, o mesmo ocorrendo na fileira H, de 1 a 10, com a Nistatina. Ambos compostos, tiveram suas concentrações multiplicadas por 4 vezes o valor inicial da concentração. Nas filas de A a E, colunas 1 a 10, foram acrescentados 50 µl do Terpinen-4-ol e 50 µl da Nistatina, em diluições seriadas. Em cada poço (exceto no controle negativo) foram adicionados 100 µl de suspensão fúngica, preparada em RPMI, tendo como concentração final  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL. As placas foram incubadas a 37° C e avaliadas a turbidez por espectrofotômetro (590 nm) e visualmente. O esquema da distribuição dos grupos está representado no Quadro 1. O resultado foi avaliado por meio da menor concentração de cada droga capaz de inibir o crescimento completamente, sendo representado por zero na análise por espectrofotometria.

**Figura 1** – Esquema do esquema de combinação na placa de microdiluição com concentrações do Terpinen-4-ol (horizontal e verde) e da Nistatina (vertical e vermelho) para o teste de “tabuleiro de xadrez”



Fonte: Elaboração própria.

Para isso, foi utilizado o Índice de Concentração Inibitória Fracionado (ICIF), o qual corresponde à soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF). Estas equivalem à razão entre a CIM das substâncias A e B combinadas pela CIM de cada substância, conforme descrito abaixo (Odds<sup>41</sup>, 2003; Johnson et al.<sup>29</sup>, 2004).

CIFA= CIM da droga A com B/CIM de A sozinha

CIFB= CIM da droga B com A/CIM de B sozinha

ICIF= CIFA + CIFB

Nesta avaliação, o ICIF foi interpretado como indicativo de sinergismo se  $\leq 0,5$ , aditivo ou indiferente se  $> 0,5$  e  $\leq 1$ , e antagonismo se  $> 1$  (Bonapace et al.<sup>7</sup>, 2000; Bonapace et al.<sup>6</sup>, 2002; Odds<sup>41</sup>, 2003).

Desta forma, definidas as CIMs do Terpinen-4-ol e da Nistatina frente às cepas de *Candida*, estas foram convertidas em concentração inibitória fracionada (CIF). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### Teste sobre micro-organismos planctônicos

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço recebeu o volume total de 200  $\mu$ l, sendo 50  $\mu$ l de solução de Terpinen-4-ol, 50  $\mu$ l da solução de Nistatina e 100  $\mu$ l da solução de micro-organismo em meio RPMI, que resultou numa concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC/ml em cada poço. As suspensões de *Candida spp.* foram utilizadas no prazo máximo de 60 min após o ajuste da concentração.

Poços sem as soluções do Terpinen-4-ol e Nistatina foram utilizados como controle positivo (C+) de crescimento, porém com o micro-organismo a ser avaliado. Orifícios sem microrganismos foram utilizados como controle negativo de crescimento (C-).

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em agitador a 75 rpm (Incubadora, 430, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Decorrido esse período, os orifícios foram examinados visualmente para comprovar a presença de turvação e a absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

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

Os orifícios que não mostraram crescimento visível, ou seja,  $DO_{600nm} \leq 0,05$ , 10  $\mu$ l das amostras foram retirados, e posteriormente plaqueados em meio de cultura SDA

(Sabouraud Dextrose Agar, Acumedia, Lansing, MI, EUA) e mantidas a 37°C por 48 h. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a  $\geq 99.9\%$ .

#### Teste sobre biofilme:

##### *Formação do biofilme*

O método de formação de biofilme foi o descrito por Thein et al.<sup>53</sup> (2007). O biofilme foi realizado com micro-organismo de única espécie, *C. albicans* ou *C. tropicalis* e biofilme de duas espécies, *C. albicans* e *C. tropicalis* em associação.

Culturas de *Candida* foram reativadas conforme citado anteriormente. Para cada grupo experimental e controle, três (n = 3) poços da placa de cultura celular (96 poços) foram usados para formação do biofilme. Utilizando-se técnicas assépticas para formação do biofilme de única espécie, foram transferidos 100 µl das suspensões isoladas de cada cepa padrão de *C. albicans* ou *C. tropicalis*. Para a formação do biofilme de duas espécies foram transferidos 50 µl de cada cepa padrão de *C. albicans* e *C. tropicalis* para os mesmos orifícios da placa de cultura.

A placa foi incubada a 37°C por 1 h e 30 min, sob agitação a 75 rpm, tempo este correspondente à fase de adesão dos micro-organismos à superfície dos orifícios. Após o período de adesão, a suspensão celular foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril para a remoção de micro-organismos não-aderidos. Em seguida, 100 µl de RPMI 1640 foi adicionado em cada poço para promover o crescimento do biofilme e então as placas foram incubadas a 37°C sob agitação a 75 rpm. A análise do biofilme foi realizada após 48 h de incubação.

##### *Efeito do Terpinen-4-ol e da Nistatina em biofilme*

Após 48 h, o meio de cultura foi trocado por 50 µl de Terpinen-4-ol e 50 µL de Nistatina. Os poços sem as soluções foram utilizados como controle positivo de crescimento (C+) e os orifícios sem microrganismo foram utilizados como controle negativo de crescimento (C-). As placas foram incubadas a 37° C por 24 h, sendo posteriormente o efeito sinérgico do Terpinen-4-ol e da Nistatina sobre o biofilme analisado pelo método de quantificação das células viáveis (UFC/mL).

#### **Quantificação do Biofilme**

O método de quantificação das células viáveis foi utilizado para avaliar a ação dos componentes sobre o biofilme. O biofilme foi lavado e adicionado 100 µl de PBS em cada

poço. A massa do biofilme aderido foi raspada cuidadosamente, aspirada e transferida para um tubo falcon. Essa suspensão foi diluída e inoculada em placas de meio de cultura SDA (Sabouraud Dextrose Agar, Acumedia, Lansing, MI, EUA) para biofilmes única espécie e, em placas de meio de cultura Chromagar *Candida*, para biofilme multiespécie. As placas foram mantidas a 37°C por 48 h. Os resultados foram quantificados em UFC/ml. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

### **Avaliação do Terpinen-4-ol sobre a adesão de *C. albicans* e *C. tropicalis***

#### Cultura de células

Nos ensaios de cultura celular foi utilizada a linhagem celular normal NOK (células orais normais imortalizadas doadas pelo prof. Dr. Carlos Rossa Jr. Do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP).

As células foram mantidas e cultivadas em monocamadas em frascos de cultura de células em meio Keratinocyte-SFM (Gibco), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SBF) e 2% de antibiótico ATB (complexo estreptomicina, penicilina, gentamicina), quando permitido. As células foram mantidas à temperatura de 37° C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após confluência, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS e tripsinizadas. Em seguida foi adicionado o meio de cultivo com 10% SFB para neutralização da tripsina evitando danos nas células. Com essa suspensão celular foram preparadas placas para os ensaios.

#### Ensaio de adesão - co-cultura

O estudo da adesão de espécies de *Candida* em células NOK foi avaliado pela curva de adesão (tempo inicial da adesão da levedura na cultura celular e o tempo em que ocorre a maior taxa de adesão), a fim de se padronizar o melhor tempo para o estudo da mesma.

O ensaio de adesão foi realizado em placas (24 poços), contendo  $1 \times 10^5$  células por poço (Sardi et al.<sup>48</sup>, 2011). Após a formação da monocamada celular nas placas, foram adicionados 500µl do inóculo e as placas incubadas a 36,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em tempos determinados (30 min, 1h e 2h). Após cada tempo de incubação, as células foram lavadas, três vezes, com PBS estéril e em seguida, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio Agar Sabouraud. Após 48 h do plaqueamento, foram contadas as colônias que cresceram nas placas, que correspondem ao número de leveduras aderidas às células. foi traçada a curva de padronização que determinou o melhor tempo para o estudo da adesão. Para o cálculo da

porcentagem de adesão, considerou-se que  $1 \times 10^3$  UFC/ml de leveduras corresponde a 100% de adesão, pois este é o número total de leveduras adicionadas às células.

A avaliação da inibição da adesão foi feita com Terpinen-4-ol na concentração estabelecida nos testes anteriores, concentração esta com atividade fungistática. O estudo foi realizado em duplicata. Após a formação da monocamada celular nas placas, o Terpinen-4-ol e o inóculo foram adicionados concomitantemente e as placas incubadas a 36,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> pelo tempo determinado previamente. Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril, tripsinizadas e plaqueadas em Ágar Sabouraud. Os resultados foram analisados em porcentagem em gráficos. Como controle do ensaio, foi analisado um ensaio de adesão sem o tratamento, sendo este considerado como 100% de adesão.

### **Avaliação do Terpinen-4-ol sobre fatores de virulência**

As espécies de *Candida* foram testadas para as atividades de fosfolipase e protease de acordo com Sardi et al.<sup>50</sup> (2012). A atividade das enzimas hidrolíticas foi detectada medindo o tamanho da zona de precipitação após o crescimento em ágar para fosfolipase ou ágar protease.

Os grupos experimentais serão:

- *Candida albicans* + meio de cultura RPMI - Controle crescimento
- *Candida albicans* + MIC<sub>50</sub> de Terpinen-4-ol
- *Candida albicans* + MIC<sub>50</sub> de Nistatina – Controle positivo
- *Candida tropicalis* + meio de cultura RPMI – Controle crescimento
- *Candida tropicalis* + MIC<sub>50</sub> de Terpinen-4-ol
- *Candida tropicalis* + MIC<sub>50</sub> de Nistatina – Controle positivo

A concentração do Terpinen-4-ol e da Nistatina testada foi seu MIC<sub>50</sub>, pois as células de *Candida* devem estar viáveis para que ocorra a produção enzimática.

### Atividade de fosfolipases

Para verificar a atividade enzimática da fosfolipase, os inóculos de espécies de *Candida* ficaram em contato com as soluções testadas pelo tempo determinado previamente no teste de adesão em células.

O meio para o teste de fosfolipases consiste de Peptona (10 g), Glicose (30 g), NaCl (57,3 g), CaCl<sub>2</sub> (0,55 g) e Ágar (20 g). Os componentes foram dissolvidos em 100 ml de água

destilada e a mistura autoclavada. Quando a temperatura alcançou a 55° C, foi adicionada a Emulsão de Ovo (2 ml para cada 20 ml do meio).

As espécies de *Candida* foram cultivadas em SDA por 24 h, submetidas ao contato com as soluções testadas pelo tempo previamente determinado no teste de adesão, e, após este tempo, uma única gota (10 µl) de cada espécie, contendo 10<sup>8</sup> UFC/ml (0,5 absorbância a 600 nm) foi inoculada no meio do ensaio. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 h, para se examinar a atividade das fosfolipases. O ensaio foi realizado em três ocasiões separadas para cada isolado.

A presença da zona de precipitação visível em torno da colônia indica a produção de fosfolipase. O valor de atividade de fosfolipase (Pz) foi medido, com auxílio de um paquímetro digital, pela relação entre o diâmetro da colônia com o total do diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.

#### Atividade de proteinase

Para verificar a atividade enzimática da proteinase, os inóculos de *Candida* ficaram em contato com as soluções testadas pelo tempo determinado previamente no teste de adesão em células.

Para este teste foi utilizado o ágar proteinase a base de Y de Carbono (23,4 g), BSA (4 g), extrato de levedura (2 g), dextrose (glicose) (10 g), Protovit (3 g).

O componentes (Y de Carbono, extrato de levedura, glicose e Protovit) foram dissolvidos em 200 ml de água destilada. O BSA foi dissolvido em água morna (38°C) e depois adicionado à mistura e em seguida, esta foi filtrada e reservada. O Ágar - ágar (36 g – 1800 de água) foi autoclavado, levado ao banho-maria até atingir a temperatura de 55°C (pois as proteínas deste meio podem se desnaturar em altas temperaturas) e adicionado a mistura filtrada (2,2 ml para cada 20 ml do meio), agitando delicadamente depois, o meio foi vertido em placas de petri (20ml em cada placa de petri).

As espécies de *Candida* foram cultivadas em SDA por 24 h, submetidas ao contato com as soluções testadas pelo tempo previamente determinado no teste de adesão, e, após este tempo, uma única gota (10 µl) de cada espécie, contendo 10<sup>8</sup> UFC/ml foi inoculada no meio para proteinase. As placas foram incubadas a 37°C durante 48h, para se examinar a atividade da proteinase. O ensaio foi realizado em três ocasiões separadas para cada isolado.

A presença da zona de precipitação visível em torno da colônia indica a produção de proteinase. O valor de atividade de proteinase (Pz) foi medido, com auxílio de um paquímetro

digital, pela relação entre o diâmetro da colônia com o total do diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.

#### Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi expressa como o valor de Pz (a/b) como descrito por Price et al.<sup>43</sup> (1982). De acordo com esta definição, baixos valores de Pz significa alta produção de protease ou fosfolipase e, inversamente, os valores de Pz elevados indicam baixa produção enzimática. A atividade enzimática foi classificada em quatro categorias:

- Pz de 1,0 indica nenhuma actividade enzimática;
- Pz entre 0,999 e 0,700 indica baixa actividade enzimática;
- Pz entre 0,699 e 0,400 corresponde a actividade moderada;
- Valores baixos de Pz (entre 0,399 e 0,100) significa elevada actividade enzimática.

#### **Avaliação do Terpinen-4-ol sobre a atividade da hemolisina**

As espécies de *Candida* foram testadas para a atividade de hemolisina de acordo com Sardi et al.<sup>51</sup> (2012). A atividade das enzimas foi detectada medindo o tamanho da zona de translúcida após o crescimento em ágar para hemolisina. Os grupos experimentais foram os mesmos dos testes anteriores (proteínase e fosfolipase).

#### Atividade da hemolisina

O efeito do Terpinen-4-ol sobre a atividade da hemolisina foi avaliado para as espécies de *Candida* utilizando o ensaio em placas de ágar sangue. O meio foi preparado por adição de 7 ml de sangue de carneiro fresco para 100 ml SDA suplementado com glucose numa concentração final de 3%. O pH final do meio foi de aproximadamente 5,6.

As espécies de *Candida* foram cultivadas em SDA por 24 h, submetidas ao contato com as soluções testadas pelo tempo previamente determinado no teste de adesão, e, após este tempo, uma única gota (10 µl) de cada espécie, contendo 10<sup>8</sup> UFC/ml foi depositada nas placas de ágar sangue, que foram então incubadas a 37°C numa atmosfera reduzida de oxigênio por 48 h. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

Após a incubação, a presença da zona translúcida visível em torno da colônia indicara a hemólise. O valor foi medido com auxílio de um paquímetro digital, e foi feita a relação

entre o diâmetro da colônia com o total do diâmetro da colônia mais a zona translúcida, obtendo-se o índice hemolítico (Hz).



**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 22 de março de 2018.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 22 de março de 2016.**

**CAROLINE CORADI TONON**