

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/03/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Renata Serignoli Francisconi

**Sistema precursor de cristal líquido associado ao terpinen-4-ol e
nistatina: caracterização, ação antifúngica, sinérgica, citotoxicidade e
adesão em células orais**

Araraquara
2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Renata Serignoli Francisconi

**Sistema precursor de cristal líquido associado ao Terpinen-4-ol e
Nistatina: caracterização, ação antifúngica, sinérgica, citotoxicidade e
adesão em células orais**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio
Co-Orientadora: Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi

Araraquara
2018

Francisconi, Renata Serignoli

Sistema precursor de cristal líquido associado ao terpinen-4-ol e nistatina: caracterização, ação antifúngica, sinérgica, citotoxicidade e adesão em células orais / Renata Serignoli Francisconi. -- Araraquara: [s.n.], 2018

61 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Coorientadora: Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi

1. Candida albicans 2. Nistatina 3. Cristais líquidos 4. Biofilmes

I. Título

Renata Serignoli Francisconi

Sistema precursor de cristal líquido associado ao Terpinen-4-ol e Nistatina: caracterização, ação antifúngica, sinérgica, citotoxicidade e adesão em células orais

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutora em odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º examinador: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

3º examinador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

4º examinador: Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani

5º examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

Araraquara, 19 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

RENATA SERIGNOLI FRANCISCONI

Nascimento: 29/12/1987, Jaú, SP

Filiação: Luiz Armando Francisconi

Isabel Cristina Serignoli Francisconi

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

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

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

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

2013-2017: Estágio Docência em Patologia Geral pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2013-2017: Estágio Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2012-2014: Mestre em Ciências Odontológicas, Área de concentração Dentística Restauradora pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2012- 2015: Especialista em Ortodontia pela Faculdade Mozarteum de São Paulo (Gestos – Araraquara)

DEDICATÓRIA

Ao Senhor meu Deus

Agradeço a Deus, pelo dom da vida. Que me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades. Agradeço por mais esta benção concedida.

Aos meus pais, Luiz Armando e Cristina

Que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência. Com todo amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

À minha irmã Patrícia, seu marido Gustavo e sobrinho Luiz Gustavo que está a caminho

Meus companheiros de todos os momentos. Agradeço pela amizade e apoio em todas etapas de minha vida.

Ao meu noivo, amigo e companheiro Antonio João

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

À família Capuzzi

Pelo carinho, apoio e amizade. Obrigada por permitirem que eu faça parte dessa linda família.

Amo muito vocês!

Agradecimentos Especiais

À minha amiga e orientadora Denise, pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente pela amizade durante toda essa etapa. Responsável direta pela escolha de seguir o caminho da pós-graduação e por todas as oportunidades concedidas por ela. Agradeço diariamente pela Mestre com a qual tive a oportunidade de trabalhar por vários anos.

À toda família Spolidorio, pelo carinho demonstrado por vocês. Sou inteiramente grata. Muito Obrigada.

Agradecimentos

A realização de projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, representados pela digníssima Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato; e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representada pelo Chefe de Departamento Prof. Eduardo Colombari e pelo Vice-Chefe Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa.

Aos amigos e funcionários José Antônio, Aline pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho sempre com muita alegria, paciência e disposição.

À amiga Juliana Pirola pelo apoio em todas as etapas do trabalho, sempre contribuindo com seu conhecimento e colaboração em todos os experimentos realizados.

Às minhas amigas Camila, Arlete, Ester, Leila, Priscila, Joyce, Sâmara, tia Telma, Erika, Rafaela, Lislaine, Gabriela, Thaís, Cecília, Sâmara, Gabriela pela amizade e companheirismo.

À Família Laboratório de Microbiologia, Caroline, Patrícia e Wagner pelo ótimo convívio diário e colaboração nas etapas do meu doutorado.

A aluna de Iniciação Científica, Juliane Zatiti por ser ótima aluna, no qual tive a oportunidade de conviver, ensinar e aprender durante esses anos.

Ao professor Marlus Chorilli e minha co-orientadora Janaína Sardi que colaboraram intensamente com seus conhecimentos.

Às minhas amigas e companheiras Caroline Tonon e Giovana Calixto, que estiveram presente em todas as etapas desse trabalho, colaborando e, além disso, pelo vínculo de amizade que construímos através dessa etapa da minha vida.

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

Aos amigos da seção técnica de pós-graduação Alexandre e Cristiano, que me auxiliaram durante todo esse processo.

À CAPES pela concessão da minha bolsa.

Processo nº 2014/22220-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo nº 2015/08742-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

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

Francisconi RS. Sistema precursor de cristal líquido associado ao Terpinen-4-ol e nistatina: caracterização, ação antifúngica, sinérgica, citotoxicidade e adesão em células orais [Tese de doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Os sistemas precursores de cristal líquido associados aos extratos vegetais e compostos fitoquímicos abrem novas perspectivas para prevenção e controle eficiente de doenças infecciosas fúngicas. Os objetivos deste estudo foram: I) avaliar o efeito sinérgico da associação do terpinen-4-ol (t-4-ol) com a nistatina (nis); II) avaliar na forma de cristal líquido, a propriedade antifúngica do t-4-ol e possível sinergismo com a nis; III) avaliar a citotoxicidade do t-4-ol em células orais normais imortalizadas (NOK) e verificar se o t-4-ol interfere na adesão de *Candida albicans* sobre células orais. Assim, foi definida a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do t-4-ol sobre isolados clínicos de *C. albicans* (Genotipagem A e B) e cepa SC 5314, empregando-se o método de microdiluição em caldo. Biofilmes foram preparados usando o modelo de placa de microtitulação estática e quantificados por metodologia colorimétrica do ensaio de redução de sal de tetrazólio (XTT). Os mesmos testes foram aplicados para avaliar o t-4-ol e nis na forma de cristal líquido. Adicionalmente, as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina e mantidas em incubadora a 37° C em 5% de CO₂. A citotoxicidade sobre linhagem de células NOK foi avaliada por citometria de fluxo e foi realizado o teste de co-cultura, para verificar a interferência do t-4-ol na adesão de *Candida albicans* sobre células orais (NOK). A adesão de *Candida albicans* sobre as células epiteliais foram avaliadas em unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) e mostraram que o t-4-ol associado ou não ao SPCL, reduzem a adesão de *C. albicans* sobre células epiteliais. Os componentes apresentaram ação antifúngica tanto em cultura planctônicas quanto em biofilme, além disso observou-se efeito sinérgico dos componentes testados. Os componentes não foram citotóxicos nos tempos de aplicação de 4 e 8 horas. Esse estudo demonstrou que o t-4-ol isolado ou em combinação com a nis pode proporcionar uma aplicação clínica eficaz e quando associados ao sistema precursor de cristal líquido, induz melhor eficácia em menores concentrações, com controle dos microrganismos resistentes.

Palavras-chave: Biofilmes. Nistatina. *Candida albicans*. Cristais líquido.

Francisconi RS. Liquid crystal precursor system associated with Terpinen-4-ol and Nystatin: characterization, antifungal, synergistic action, cytotoxicity and adhesion in oral cells [Tese de doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The liquid crystal precursor systems associated with plant extracts and phytochemical compounds open new perspectives for efficient prevention and control of infectious fungal diseases. The objectives of this study were: I) to evaluate the synergistic effect of the combination of terpinen-4-ol (t-4-ol) with nystatin (nys); II) to evaluate in liquid crystal form the antifungal property of t-4-ol and possible synergism with nys; III) to evaluate the cytotoxic potential of t-4-ol in normal immortalized oral cells (NOK) and to verify whether t-4-ol interferes with the adhesion of *Candida albicans* to oral cells. Thus, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM) of t-4-ol on clinical isolates of *C. albicans* (Genotype A and B) and strain SC 5314 were determined using the microdilution method in broth. Biofilms were prepared using the static microtiter plate model and quantified by colorimetric methodology of the tetrazolium salt reduction assay (XTT). The same tests were applied to evaluate t-4-ol and nys in liquid crystal form. In addition, the cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin, streptomycin and glutamine and maintained in an incubator at 37 ° C in 5% CO₂. Linear cytotoxicity of NOK cells was assessed by flow cytometry and the co-culture test was performed to verify the interference of t-4-ol on *Candida albicans* adhesion on oral cells (NOK). *Candida albicans* adhesion on epithelial cells was evaluated in colony forming units (UFC mL⁻¹) and showed that t-4-ol associated or not with SPCL reduced *C. albicans* adhesion on epithelial cells. The components presented antifungal action in both planktonic and biofilm culture, in addition, a synergistic effect of the tested components was observed. The components were not cytotoxic at application times of 4 and 8 hours. This study demonstrated that t-4-ol alone or in combination with nys may provide an effective clinical application and when associated with the liquid crystal precursor system induces better efficacy at lower concentrations with control of resistant microorganisms

Key words: Biofilm. Nystatin. *Candida albicans*. Liquid Crystal.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 PUBLICAÇÕES | 15 |
| 2.1 Publicação 1 | 15 |
| 2.2 Publicação 2 | 41 |
| 3 DISCUSSÃO | 55 |
| 4 CONCLUSÃO | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |

1 INTRODUÇÃO

Abordagens nanotecnológicas, em especial o desenvolvimento dos sistemas precursores de cristal líquido (SPCL), vem sendo explorados e desenvolvidos a fim de potencializar a distribuição de medicamentos levando ao aumento da sua eficácia e redução da toxicidade. Tal sistema se destaca devido a facilidade de incorporar água do meio no qual foi aplicado e promover mudanças estruturais no sistema, resultando em fase cristalina líquida, otimizando a eficiência do medicamento associado. Além disso, apresenta propriedade mucoadesiva, o qual permite melhor estabilidade física para incorporação de extratos vegetais^{1,2} e melhor biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, sendo mais eficazes no tratamento das infecções.³

Os esforços atuais para controlar o aumento de microrganismos resistentes abrem novas perspectivas no uso de terapias alternativas para melhor controle fúngico. O uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na medicina e uma grande porcentagem de novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos. Esses agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais, particularmente sobre patógenos bucais e no controle da resposta inflamatória¹⁻⁴.

O Terpinen-4-ol (porção solúvel da *Melaleuca alternifolia*) atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo. O mesmo apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (antibacteriana, antiviral e antifúngica) e atividade anti-inflamatória^{3,5}. 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 antitumoral⁶⁻⁸.

A eficácia de um tratamento depende, em grande parte, da técnica pela qual os produtos são entregues a um sistema vivo e a concentração dos mesmos, podendo ser tóxico ou ainda não produzir nenhum benefício terapêutico. Os sistemas de entrega de medicamentos se dedicam, geralmente, a aumentar a biodisponibilidade do mesmo em locais específicos do corpo e ao longo de um período de tempo⁹. 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 antimicrobiana³. 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 isolado¹⁰.

As infecções fúngicas têm sido cada vez mais descritas, principalmente em pacientes imunossuprimidos e as leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 8-10% das infecções oportunistas¹¹. A epidemiologia dessas infecções tem se modificado e se verifica o aumento da incidência e a expansão da população de risco a estas doenças³. *Candida albicans*, a principal espécie relacionada à candidíase oral, apresenta fatores de patogenicidade que predispõe, com maior frequência, o aparecimento das infecções quando comparada às outras espécies de *Candida*¹². Devido a grande incidência de infecções fúngicas, observa-se dificuldades não apenas no diagnóstico, mas também no tratamento capaz de controlar esse tipo de infecção, principalmente em pacientes imunocomprometidos³. Além disso, deve-se destacar o fato do desenvolvimento da resistência microbiana ser um fato crescente, ocasionado por mutações, permitindo que os medicamentos existentes atuem apenas em parte da população microbiana¹².

Candidíase oral está presente em 60% a 72% dos pacientes usuários de próteses, e a associação entre *Candida* spp e próteses estão diretamente relacionadas à eficiência deste microrganismo de aderir e colonizar a superfície das próteses, uma vez que a presença de poros na superfície de próteses (resina acrílica) favorece a colonização e formação de biofilme por fungos e bactérias¹³.

Os agentes poliênicos e os azóis, relacionados ao tratamento específico das candidíases orais, têm sido utilizados¹⁴, porém há necessidade de estudos para desenvolvimento de outros agentes com potencial para o tratamento desta patologia. Definitivamente, o conhecimento sobre novas formas de evitar ou diminuir as infecções por *Candida* spp. na cavidade oral tornam-se imprescindíveis, já que, mesmo com o aumento do número de antifúngicos no mercado, a terapêutica de doenças fúngicas ainda apresenta-se em grande descompasso em relação à terapêutica antibacteriana, podendo essa assertiva ser facilmente comprovada pela disparidade numérica entre antifúngicos e antibacterianos disponíveis no mercado^{3,13}.

A interação entre drogas antifúngicas e fungos, fungos e hospedeiro e entre a droga antifúngica e o hospedeiro é muito complexo. Estabelecer a atividade antifúngica de uma nova droga in vitro, oferece apenas uma parte da informação necessária para prever o resultado do tratamento da infecção com um novo fármaco. Por outro lado, o aprimoramento dos ensaios in vitro e dos testes de susceptibilidade frente ao surgimento

constante de novas drogas, torna os ensaios in vitro ferramentas indispensáveis e significativas para contribuir, na maioria das vezes, da seleção do agente antifúngico mais indicado¹⁵.

Pela grande hidrofobicidade e volatilidade do componente, sua aplicação em sistemas líquidos cristalinos é uma alternativa eficaz e segura. Além disso, permite uma melhor biodegradabilidade, tolerabilidade e biodisponibilidade do medicamento a fim de orientar sua ação para o local específico de interesse.

4 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que o terpinen-4-ol isolado ou em combinação com a nistatina pode proporcionar uma aplicação clínica eficaz e quando associados ao sistema precursor de cristal líquido, induz melhor eficácia em menores concentrações, com controle dos microrganismos resistentes.

REFERÊNCIAS*

1. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 4815-24.
2. Dos Santos Ramos, Calixto G, de Toledo LG, Bonifácio BV, dos Santos LC, de Almeida MT, et al. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. *Int J Nanomedicine*. 2015; 16(10): 7455-66.
3. Sun L, Zhang C, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(24): 6150–6.
4. Carradori S, Chimenti P, Fazzari M, Granese A, Angiolella L. Antimicrobial activity, synergism and inhibition of germ tube formation by *Crocus sativus*-derived compounds against *Candida* spp. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016; 31(2): 189-93.
5. Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil componentes) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014; 63(9): 769-78.
6. 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.
7. Wu C, Chen Y, Chen JJW, Shieh J, Huang C, Lin P, 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: 818261.
8. Grando TH, de Sá MF, Baldissera MD, Oliveira CB, de Souza ME, Raffin RP, et al. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *J Helminthol*. 2016; 90(3): 377-82.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

9. Wen H, Jung H, Li X. Drug delivery approaches in addressing clinical pharmacology-related issues: opportunities and challenges. *AAPS*. 2015; 17(6): 1327-40.
10. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2004; 48(3): 693-715.
11. Macedo DPC, Farias AMA, Lima Neto RG, Silva VKA, Leal AFG, Neves RP. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(2): 188-91.
12. Diniz DN, Nóbrega MC, Pereira MR, Vieira MS, Pereira JV, Higino JS. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. *Rev Odontol UNESP*. 2010; 39(3): 151-6.
13. Freire JCP, Nóbrega MTC, Freire SCP, Dias-Ribeiro E. Candidíase oral em usuários de próteses dentárias removíveis: fatores associados. *Arch Health Invest*. 2017; 6 (4): 159-61.
14. Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med*. 2016; 3: 11.
15. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(1): 13-8.
16. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001; 70: 1-20.
17. Calixto MFC, Victorelli FC, Dovigo LN, Chorilli. Polyethyleneimine and chitosan polymer-Based mucoadhesive liquid crystalline systems intended for buccal drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2018; 19(2): 820-36.
18. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA, Gremiao MPD, Oliveira AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41(3): 301-13.
19. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Scarpa MV. Development of liquid-crystalline systems using silicon glycol copolymer and polyether functional siloxane. *Quim Nova*. 2009; 32(4): 1036–40.
20. Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov Today*. 2010; 15(23-24): 1032–40.
21. Lawrence MJ, Rees DG. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000; 45: 89-121.

22. Feigenson GW, Buboltz J. Ternary phase diagram of dipalmitoyl- PC/dilauroyl- PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J*. 2001; 80(6): 2775–88.
23. Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Bomferoni MC. Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule. *Int J Pharm*. 2005; 297(1-2): 146–55.
24. 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.
25. Castro RD, Souza TPASA, Bezerra LMD, Ferreira GLS, Costa EMMB, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 417.
26. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(6): 1081-5.
27. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 50-62.
28. Ramage G, Milliga S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol*. 2012; 3: 220-40.
29. Sardi JC, Gullo FP, Freires IA, Pitanguí NS, Segalla MP, Fusco-Almeida AM, et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 86(4): 387-91.
30. Ruhil S, Kumar V, Balhara M, Malik M, Dhankhar S, Kumar M et al. In vitro evaluation of combination of polyenes with EDTA against *Aspergillus* spp. by different methods (FICI and CI Model). *J Appl Microbiol*. 2014; 117(3): 643-53.