



**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 CO<sub>2</sub>. 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<sup>-1</sup>) 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% CO<sub>2</sub>. 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<sup>-1</sup>) 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

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 PUBLICAÇÕES</b> .....	15
<b>2.1 Publicação 1</b> .....	15
<b>2.2 Publicação 2</b> .....	41
<b>3 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	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<sup>1,2</sup> e melhor biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, sendo mais eficazes no tratamento das infecções.<sup>3</sup>

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 inflamatória<sup>1-4</sup>.

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<sup>3,5</sup>. 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 antitumoral<sup>6-8</sup>.

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 tempo<sup>9</sup>. 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<sup>3</sup>. 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<sup>10</sup>.

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 oportunistas<sup>11</sup>. A epidemiologia dessas infecções tem se modificado e se verifica o aumento da incidência e a expansão da população de risco a estas doenças<sup>3</sup>. *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*<sup>12</sup>. 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 imunocomprometidos<sup>3</sup>. 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 microbiana<sup>12</sup>.

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 bactérias<sup>13</sup>.

Os agentes poliênicos e os azóis, relacionados ao tratamento específico das candidíases orais, têm sido utilizados<sup>14</sup>, 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<sup>3,13</sup>.

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 indicado<sup>15</sup>.

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.

## **2 PUBLICAÇÕES**

### **2.1 Publicação 1**

#### **Caracterização do sistema precursor de cristal líquido incorporado com Terpinen-4-ol e Nistatina. Ação antifúngica, antibiofilme e sinérgica\***

Renata Serignoli Francisconi<sup>a\*</sup>, Caroline Coradi Tonon<sup>a</sup>, Patrícia Milagros Maquera Huacho<sup>a</sup>, Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian<sup>b</sup>, Janaína de Cássia Orlandi Sardi<sup>c</sup>, Marlus Chorilli<sup>b</sup>, Denise Madalena Palomari Spolidorio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, School of Dentistry of Araraquara, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical of Araraquara, Department of Drugs and Medicines, Araraquara, SP, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Estadual Campinas – UNICAMP, School of dentistry of Piracicaba, Department of Physiological Sciences, Piracicaba, SP, Brazil.

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

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP  
Department of Physiology and Pathology / Laboratory of Microbiology e Biology Molecular  
Street Humaitá, 1680 – Zip Code: 14.801-903, Araraquara, SP - Brazil  
Phone: + 55 (16) 3301-6402 / FAX: + 55 (16) 3301-6488  
e-mail: re\_francis2@hotmail.com

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

### **Resumo**

Os sistemas precursores de cristal líquido (SPCL) promovem uma liberação sustentada das substâncias ativas, permitindo melhor estabilidade das formulações. O terpinen-4-ol se destaca pela sua ação antimicrobiana, porém apresenta grande volatilidade. Desse modo a associação do terpinen-4-ol ao SPCL, é uma alternativa eficaz para maior estabilidade e conseqüentemente maior eficácia desse sistema. Nesse estudo foi desenvolvido o sistema precursor de cristal líquido com terpinen-4-ol e nistatina, avaliando o potencial antifúngico, antibiofilme e efeito sinérgico dos mesmos sobre cepas de *Candida albicans*. As amostras cresceram em RPMI 1640 acrescido com 2 % de glicose nas formas planctônica e biofilme. Os componentes apresentaram ação antifúngica nas concentrações de terpinen-4-ol (MIC e MFC 2.31 mg/mL) e nistatina (MIC 0.008 mg/mL e MFC 0.016 mg/mL), e quando em sistema precursor de cristal líquido terpinen-4-ol (MIC e MFC 1.06 mg/mL mg/mL) e nistatina (MIC 0.00025 mg/mL e 0.0005 mg/mL). Em biofilme o terpinen-4-ol 4.53 mg/mL e nistatina 0.128 mg/mL foram as concentrações eficazes e quando em cristal líquido as concentrações foram 2.31 mg/mL e 0.032 mg/mL, respectivamente. Além disso, observou-se efeito sinérgico utilizando terpinen-4-ol e nistatina em associação, tanto em culturas planctônicas de *C. albicans* quanto em biofilme. Esses resultados mostram que o terpinen-4-ol e nistatina podem ser utilizados em associação (sinergismo) e quando associados ao sistema precursor de cristal líquido apresentam redução nas suas concentrações.

### **Introdução**

O sistema bio(muco)adesivo é também conhecido como sistema precursor de cristal líquido (SPCL). Neste, a droga é incorporada ao sistema com o objetivo de obter

melhor ação antimicrobiana, com o objetivo de prolongar o tempo de residência da preparação no local de ação ou absorção, intensificando o contato do fármaco com a mucosa. Além disso, promovem a liberação sustentada das substâncias ativas, permitindo melhor estabilidade das formulações.<sup>1,2</sup>

A combinação de drogas, ou seja, o possível efeito sinérgico, o qual permite uma melhoria na eficácia, redução da toxicidade e efeitos colaterais adversos, aumento da biodisponibilidade, diminuição da dose e redução do desenvolvimento da resistência antimicrobiana, vem sendo bastante utilizado<sup>3,4</sup> e o método utilizado para verificar o sinergismo entre drogas é conhecido como “Checkerboard”, onde variadas concentrações dos produtos selecionados são aplicados sobre um mesmo isolado.<sup>5</sup>

Infecções fúngicas invasivas, causadas por espécies de *Candida*, são ocorrências importantes de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados, sendo de difícil controle. *Candida albicans* é a principal causa das doenças invasivas por fungos e está presente na microbiota oral, podendo se tornar patogênico na presença de outros fatores associados, ocasionando uma infecção local ou sistêmica.<sup>6</sup> O uso contínuo de próteses orais, redução da dimensão vertical, oclusão instável, próteses antigas e rugosidade são fatores que predispõe o aparecimento das infecções fúngicas orais.<sup>7,8</sup>

Embora a nistatina seja amplamente utilizada para controlar e reduzir as infecções fúngicas orais<sup>9</sup>, esta apresenta a desvantagem da resistência microbiana. Este aumento da resistência entre agentes patogênicos tornaram as plantas medicinais tradicionais e as terapias alternativas como fontes atraentes para detectar novos agentes antimicrobianos.<sup>10</sup>

O óleo essencial derivado da destilação a vapor das folhas de *Melaleuca alternifolia* é conhecido como TTO (tea tree oil), uma mistura complexa de cerca de 100 compostos diferentes, principalmente monoterpenos e seus correspondentes álcoois. O terpinen-4-ol é o principal componente ativo do TTO e ganhou atenção por causa de suas

propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anti-inflamatórias.<sup>11</sup> O Terpinen-4-ol atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia da célula microbiana. Evidências científicas mostram que esse óleo é útil na manutenção da higiene bucal e na prevenção de doenças bucais.<sup>11,12</sup>

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um sistema precursor de cristal líquido (SPCL) associado ao terpinen-4-ol e nistatina a fim de avaliar a ação antifúngica, antibiofilme e sua ação sinérgica.

### ***Material e Métodos***

#### **Desenvolvimento dos sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos (SPCL)**

O sistema composto por álcool cetílico propoxilado e etoxilado (PPG-5-CETETH-20) (Procetyl<sup>®</sup> AWS), ácido oleico (AO) e dispersão de quitosana (QS) 0.5% foi preparado pelo método do diagrama de fases.<sup>13</sup> Foi preparada a fase aquosa do sistema numa porcentagem polimérica final de 0.5% de QS. Em seguida, foram preparadas 54 diferentes proporções, de 0 a 100% (m/m), de cada fase dos sistemas resultando, desse modo, na construção do diagrama de fase ternário com 54 pontos. As formulações obtidas foram caracterizadas visualmente em sistema translúcido líquido (STRL), sistema translúcido viscoso (STRV), sistema transparente líquido (STL), sistema transparente viscoso (STV), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco e separação de fases (SF). O terpinen-4-ol (Sigma, MO, USA) foi incorporado na concentração 0.57 – 9.16 mg/mL na fase oleosa do sistema, com base em dados disponibilizados pela literatura.<sup>11,14</sup> A nistatina (Sigma, MO, USA) foi incorporada nas concentrações 0.00003125 – 0.064 mg/mL segundo as normas do documento M27-A2 do CLSI e para o controle foi utilizado saliva artificial (cloreto de potássio 0,96 g; cloreto de sódio 0,67 g; cloreto de magnésio

0,04 g; fosfato de potássio 0,27 g; cloreto de cálcio 0,12 g; nipagin 0,01 g; nipasol 0,1 g; carboxil metil celulose 8 g; sorbitol 24 g; água purificada q.s.p.. 1000 mL).

### **Efeito da saliva na formulação selecionada**

A formulação (FQ) composta por 40 % de fase oleosa, 40 % de tensoativo e 20% de água foi selecionada para a incorporação de terpinen-4-ol (FT), nistatina (FN) e de ambos (FNT). Após a incorporação dos fármacos, foram acrescentados 30% (FN 30, FT30, FNT30) e 100% (FN100, FT100, FNT100) de saliva para visualizar os efeitos da saliva bem como os efeitos dos fármacos nas estruturas da formulação caracterizando-as por microscopia de luz polarizada (MLP), reologia e mucoadesão conforme itens abaixo.

### **Caracterização física químicas das formulações**

#### Microscopia de luz polarizada (MLP)

As formulações foram colocadas separadamente em lâmina e observadas utilizando microscópio de luz polarizada (Olympus BX41) com câmara acoplada (QColor3 Olympus America INC), a fim de analisar a homogeneidade das dispersões e, com auxílio de polarização, observar a presença de área de anisotropia.<sup>15</sup> Após a visualização por MLP, o diagrama de fases foi reclassificado.

#### Análises reológicas

Foram realizadas a  $37 \pm 0.1$  °C em triplicata usando um reômetro AR2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) com geometria de placa (40 mm de diâmetro) e gap de 200  $\mu$ m. As amostras das formulações foram cuidadosamente aplicadas na placa

inferior para minimizar o cisalhamento da amostra e foram mantidas em repouso por 3 min antes da análise. <sup>16</sup>

### Determinação das propriedades de fluxo

Utilizando uma taxa de cisalhamento de 0,01 a 100 s<sup>-1</sup> para a curva ascendente e de 100 a 0 s<sup>-1</sup> para a curva descendente, durante 120 segundos cada uma e com um intervalo de 10 s entre elas, as propriedades de fluxo foram determinadas. O índice de consistência e o índice de fluxo foram determinados a partir da equação descrita em (1) para uma análise quantitativa do comportamento do fluxo:

$$\tau = k \cdot \gamma \eta, (1)$$

onde " $\tau$ " é o estresse de cisalhamento, " $\gamma$ " é a taxa de cisalhamento, " $k$ " é o índice de consistência, e " $\eta$ " é o índice de fluxo.

### Análises oscilatórias

Foram iniciadas pelo teste de varredura de tensão e para determinar a região viscoelástica das formulações. A varredura de tensão foi realizada numa frequência constante de 1 Hz sobre uma faixa de tensão de 0,1 a 10 Pa. Assim, foi selecionado a tensão de 1 Pa para realizar o teste de varredura de frequência de 0,1 a 10 Hz que estava dentro da região viscoelástica linear previamente determinada para todas as formulações. Assim, os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) foram determinados.

A fim de se estabelecer uma análise quantitativa da dependência de  $G'$  da frequência, a força da formulação e o expoente viscoelástico foram calculados a partir da equação 2 abaixo. <sup>17</sup>

$$G = S \cdot \omega n, (2)$$

Onde  $G$  é o módulo de armazenamento,  $S$  é a força da formulação,  $\omega$  é a frequência de oscilação e  $n$  é o expoente viscoelástico.

### **Mucoadesão**

Para a avaliação da força mucoadesiva in vitro das formulações, primeiramente foram obtidas mucosas esofágicas de porco (Matadouro Olhos d'Água, Ipuã, SP). A mucosa esofágica foi separada dos tecidos subjacentes com auxílio de tesoura anatômica e bisturi, mantendo a uniformidade da espessura dos cortes de aproximadamente 1 mm. A mucosa foi lavada em água corrente e armazenada em meio com saliva e mantida resfriada, até seu processamento em no máximo 6 h. <sup>16</sup>

A força necessária para remover os sistemas selecionados da mucosa esofágica foi avaliada in vitro, utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo Adhesion Test. Primeiramente, a mucosa foi imersa em saliva humana para simular o ambiente bucal por 30 segundos. A mucosa foi fixada à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) do equipamento. As formulações foram acondicionadas em pequenos recipientes de vidro à 37° C. O teste foi iniciado abaixando a sonda numa velocidade constante (1 mm/s) até que a mucosa entrasse em contato com a amostra. A mucosa e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0.5 mm/s) até ocorrer o destacamento entre a mucosa e a amostra. A força necessária para ocorrer esse destacamento foi calculada pela curva força versus tempo. O teste foi realizado em triplicata. <sup>18</sup>

### **Isolados Fúngicos**

Foram utilizados dois isolados clínicos de *C. albicans* (Genotipagem A e B) coletados de pacientes diabéticos com periodontite crônica (Comitê de Ética 062/2008)<sup>20</sup> e a cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 90028). As amostras cresceram em RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) pH 7.0 (0.165 M MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico), acrescido com 2 % de glicose a 37° C. As suspensões foram ajustadas com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331, Hamburg, Germany), até atingir absorvância correspondente a  $1.0 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.<sup>21</sup>

### **Preparo das soluções**

Terpinen-4-ol (9.16 – 0.57 mg/mL) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) foi diluído em meio de cultura RPMI 1640 e DMSO 0.4% (Sigma, MO, USA). O intervalo das concentrações foi estabelecido segundo a literatura.<sup>22,23</sup> Nistatina (Sigma, MO, USA) foi preparada segundo as normas CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute.

### **Atividade moduladora pelo método do Checkerboard (Tabuleiro Xadrez)**

O teste de susceptibilidade foi desenvolvido segundo as normas estabelecidas pela CLSI (M27-A6). O método do checkerboard de microdiluição em caldo foi realizado utilizando-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), o qual corresponde à soma do MIC de cada fármaco quando usado em combinação dividido pela MIC do medicamento quando usado sozinho.<sup>5</sup> Nesta avaliação, os índices se classificam como sinérgicos  $\leq 0.5$ ; indiferente se  $> 0.5$  e  $\leq 1$ ; e antagonicos se  $> 1$  (Bonapace et al., 2002). Os grupos foram avaliados em aparelho leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França) a 492 nm e posteriormente estabelecidas as concentrações fungicidas mínimas utilizando placas contendo Saboraud Dextrose Agar

(Acumedia, Lansing, MI, EUA), mantidas a 37° C por 48 horas.

### **Formação do biofilme e tratamento**

A formação de biofilme (48 horas) em placas de microtitulação de 96 poços foi descrito previamente por Thein et al. <sup>24</sup> (2009). Na concentração de  $1.0 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, *C. albicans* foram ressuspensas em meio RPMI. Os compostos testados foram preparados, conforme citados anteriormente, e adicionados aos poços, permanecendo por 24 horas para posterior avaliação. O biofilme foi analisado pelo método colorimétrico de viabilidade celular de XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium-carboxanilida <sup>25</sup> e a absorbância determinada em 492 nm por espectrofotômetro (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França).

### **Análise estatística**

Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram avaliados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,01 %.

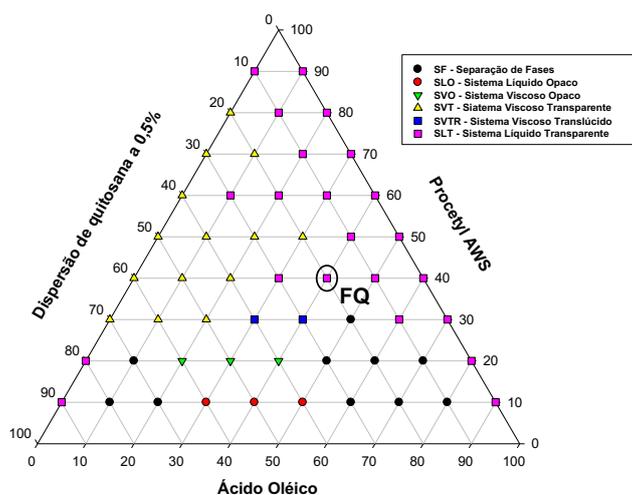
## **Resultados**

### **Desenvolvimento dos sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos**

A Figura 1 ilustra o diagrama composto por álcool cetílico propoxilado e etoxilado (Procetyl® AWS), ácido oleico (AO) e dispersão de quitosana (QS) 0.5% obtido, para selecionar a melhor formulação para a incorporação do Terpinen-4-ol e Nistatina. Observa-se a separação de fases (SF) em duas regiões distintas do diagrama. A primeira se formou abaixo de 40% de tensoativo e de fase oleosa, e acima de 60% de fase aquosa. A segunda também se formou abaixo de 40% de tensoativo, mas abaixo de 30% de fase aquosa e acima de 70% de fase oleosa. Ocorreu uma extensa região viscosa entre 80% e 15% de fase aquosa, 80 a 20% de tensoativo e abaixo de 50% de óleo. Uma longa região

de sistemas líquidos transparentes (SLT) ocorreu a partir de 10% de tensoativo e 30% de fase aquosa e em toda extensão de fase oleosa.

Os resultados mostram que a maioria das formulações foi estabilizada a partir de 40% de tensoativo, sendo que a formulação FC (formulação de precursor de sistema líquido cristalino) circulada no diagrama constituída por 40% de tensoativo, 40% de fase oleosa e 20% de fase aquosa, se destaca entre as outras, porque se mostra vantajosa para atuar como sistema precursor de cristal líquido (SPCL) para a aplicação bucal, uma vez que se encontra numa região de transição para sistemas viscosos característico de cristal líquido ao aumentar a fase aquosa.<sup>16, 27</sup> A fim de verificar se FC consegue atuar como SPCL, foi acrescentado 30% e 100% de saliva para visualizar os seus efeitos, bem como os efeitos dos fármacos nas estruturas da formulação.



**Figura 1.** Diagramas compostos por Procetyl (PRO), ácido oleico (AO) e dispersão de quitosana 0.5%. FQ é o sistema precursor de cristal líquido selecionado constituído por 40% de tensoativo, 40% de fase oleosa e 20% de fase aquosa.

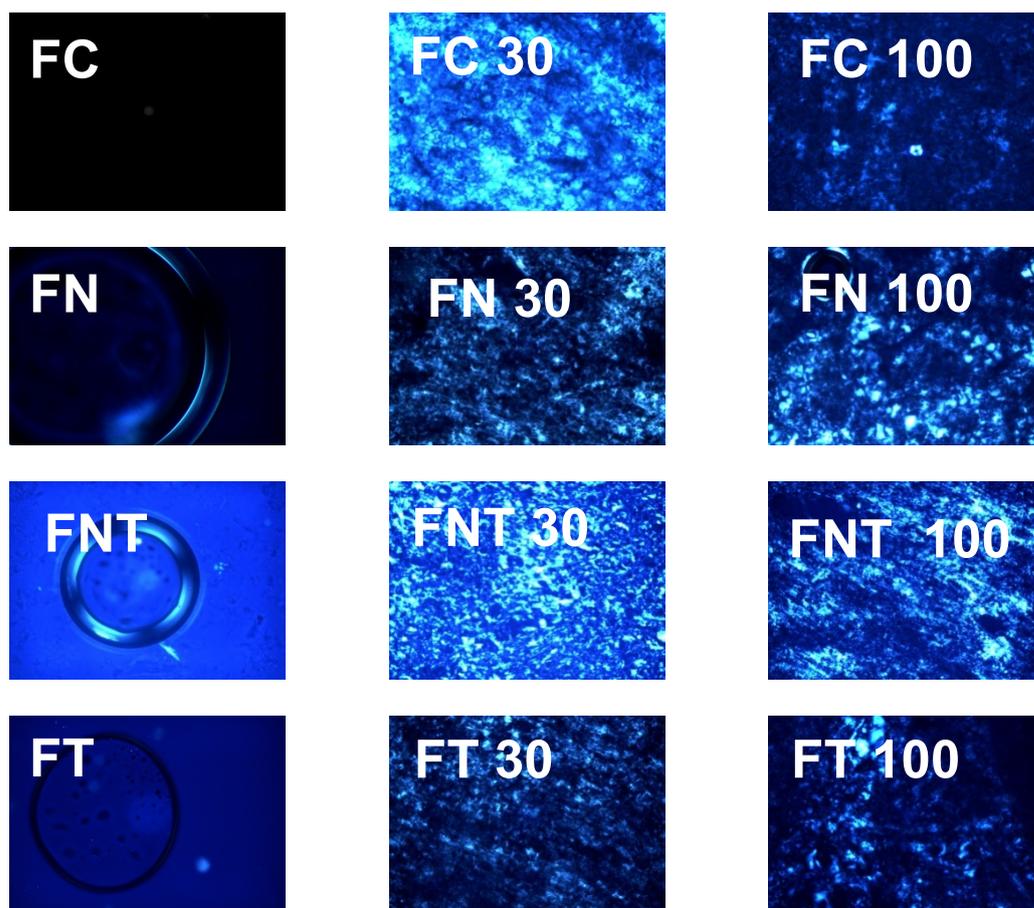
### Microscopia de luz polarizada

As fotomicrografias com aumento de 20 vezes das formulações selecionadas estão representadas na Figura 2. Mesofases líquido-cristalinas lamelares e hexagonais

são anisotrópicas (altera o plano da luz polarizada) e identificadas respectivamente, por cruzes de malta e estrias, enquanto que as mesofases cúbicas e microemulsões são isotrópicas (não desvia o plano de luz polarizada), visualizadas como campo escuro. Ressalta-se que as microemulsões são sistemas líquidos transparentes e as mesofases líquido-cristalinas cúbicas são sistemas viscosos transparentes, portanto a classificação dessas formulações se dá em conjunto com a sua viscosidade.<sup>28,29</sup>

Dessa forma, observou-se que FC, FT, FN e FNT apresentaram campo escuro e como todas apresentaram baixa viscosidade se comportam como sistemas microemulsionados. Entretanto, ao se acrescentar saliva nessas formulações (FC, FN, FT e FNT) observou-se a formação de estruturas líquidas cristalinas (FC30, FC100, FN 30, FT30, FNT30, FN100, FT100, FNT100), portanto as formulações FC, FN, FT e FNT se comportaram como sistemas precursores de cristais líquidos.

As fotomicrografias revelaram também que as formulações sem (FC, FC30 e FC100) e com fármacos (FT, FNT, FN, FN 30, FT30, FNT30, FN100, FT100, FNT100) não tiveram suas estruturas modificadas com a adição de ambos os fármacos.



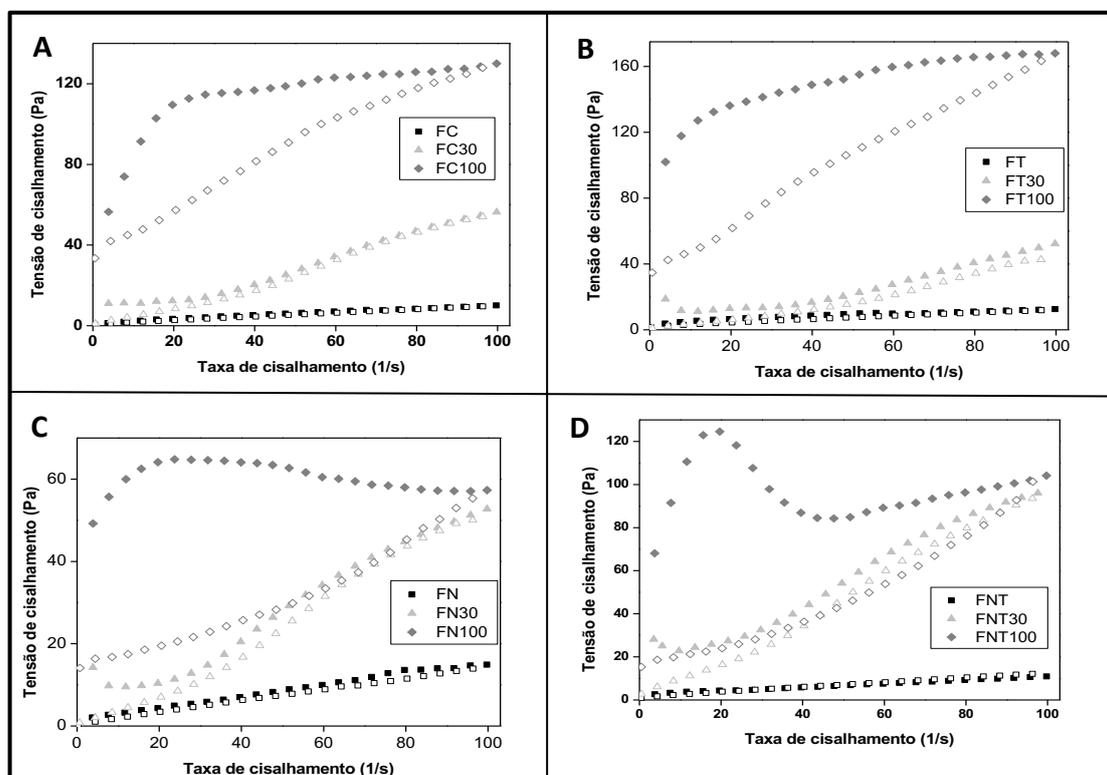
**Figura 2.** Fotomicrografias das formulações. Aumento 20x. (FC: Formulação de precursor de sistema líquido cristalino, FN: precursor de sistema líquido cristalino com nistatina; FNT: precursor de sistema líquido cristalino com nistatina e terpinen-4-ol; FT: precursor de sistema líquido cristalino com terpinen-4-ol; 30 e 100: porcentagens de saliva no sistema líquido cristalino)

## Reologia

### Estudo reológico contínuo

A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento de todas as formulações está ilustrada na Figura 3. Pode-se observar que as formulações obtidas comportam-se como fluidos pseudoplásticos ( $n < 1$ ), ou seja, os fluidos diminuem sua viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta, pois ocorre a orientação das partículas rígidas da formulação na direção do fluxo, gerando shear thinning, ou seja,

afinamento por cisalhamento; no entanto, quando esse cisalhamento cessa, a formulação recupera sua viscosidade inicial.



**Figura 3.** Reograma de fluxo das formulações. Os símbolos fechados representam a curva de ida e os símbolos abertos representam a curva de volta. A letra A representa os diferentes grupos da formulação de cristal líquido, letra B formulação de cristal líquido mais terpinen-4-ol, C formulação de cristal líquido e nistatina e D formulação de cristal líquido com terpinen-4-ol e nistatina

Os dados de valores do índice de consistência (K) e comportamento de fluxo (n) obtidos pela Equação 1 estão mostrados na Tabela 1. Os resultados mostram que a incorporação de 100% de saliva diminui o índice de fluxo (n) de todas as formulações, ou seja, aumenta a pseudoplasticidade das formulações e o índice de consistência, ou seja, há aumento da viscosidade da formulação com a adição de saliva. Além disso, verificou-

se que todas as formulações com 100% de saliva apresentaram tixotropia, revelando que tais formulações formaram estruturas bem rígidas, que demoram mais tempo para recuperarem sua conformação inicial quando o cisalhamento é cessado.

**Tabela 1** – Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) das formulações

<b>Formulações</b>	<b>Índice de fluxo (n)</b>	<b>Índice de consistência (k)</b>
<b>FC</b>	<b>0.66 ± 0.01</b>	<b>0.48 ± 0.02</b>
<b>FC30</b>	<b>0.99 ± 0.05</b>	<b>0.58 ± 0.13</b>
<b>FC100</b>	<b>0.18 ± 0.02</b>	<b>59.0 ± 3.69</b>
<b>FT</b>	<b>0.37 ± 0.01</b>	<b>2.17 ± 0.09</b>
<b>FT30</b>	<b>1.02 ± 0.09</b>	<b>0.46 ± 0.18</b>
<b>FT100</b>	<b>0.14 ± 0.00</b>	<b>87.4 ± 0.98</b>
<b>FN</b>	<b>0.78 ± 0.02</b>	<b>0.41 ± 0.04</b>
<b>FN30</b>	<b>0.96 ± 0.05</b>	<b>0.66 ± 0.16</b>
<b>FN100</b>	<b>0.01 ± 0.01</b>	<b>58.5 ± 3.45</b>
<b>FNT</b>	<b>0.56 ± 0.03</b>	<b>0.78 ± 0.08</b>
<b>FNT30</b>	<b>0.78 ± 0.05</b>	<b>2.68 ± 0.59</b>
<b>FNT100</b>	<b>0.01 ± 0.03</b>	<b>97.6 ± 12.0</b>

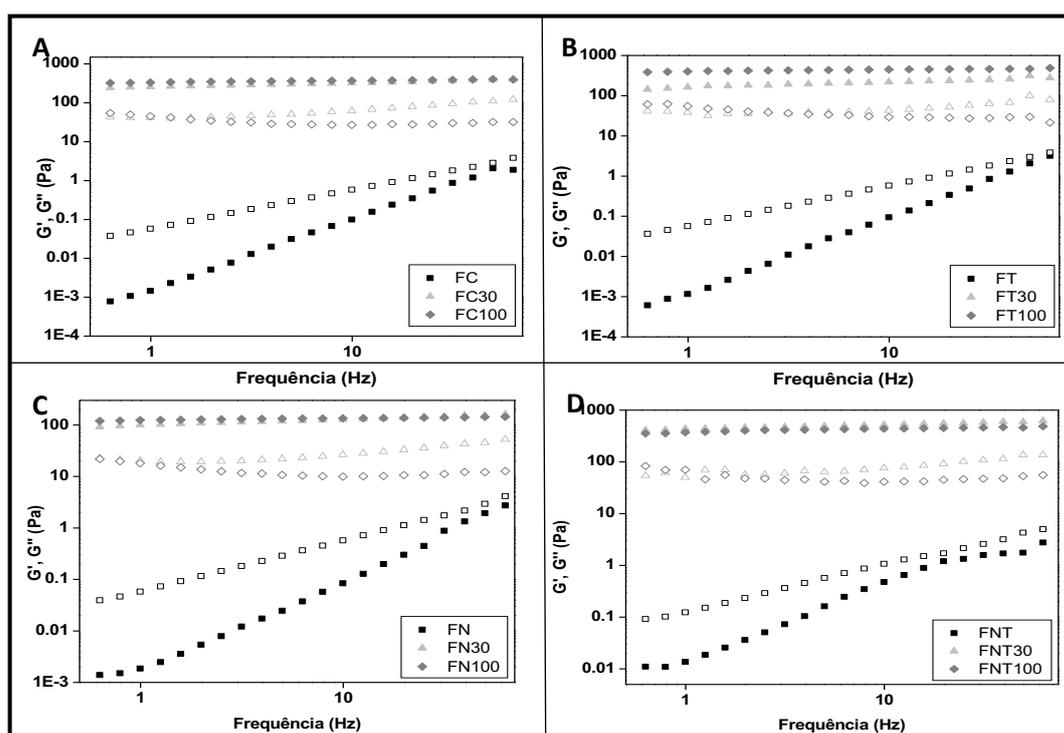
FC: Formulação de precursor de sistema líquido cristalino, FN: precursor de sistema líquido cristalino com nistatina; FNT: precursor de sistema líquido cristalino com nistatina e terpinen-4-ol; FT: precursor de sistema líquido cristalino com terpinen-4-ol; 30 e 100: porcentagens de saliva no sistema líquido cristalino.

### **Estudo reológico oscilatório**

A Figura 4 ilustra a evolução temporal dos módulos de armazenamento ( $G'$  - módulo elástico) e perda ( $G''$  - módulo viscoso) em função da frequência aplicada. Dessa

forma, foi realizada a análise oscilatória das formulações. A magnitude destes módulos é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema, por exemplo, se  $G' \gg G''$ , pode-se sugerir que o sistema está interligado quimicamente, ou se  $G' > G''$  o sistema está estruturado por ligações secundárias, e se  $G' \leq G''$ , diz-se que as moléculas do sistema estão ligadas apenas por interações físicas.<sup>30</sup>

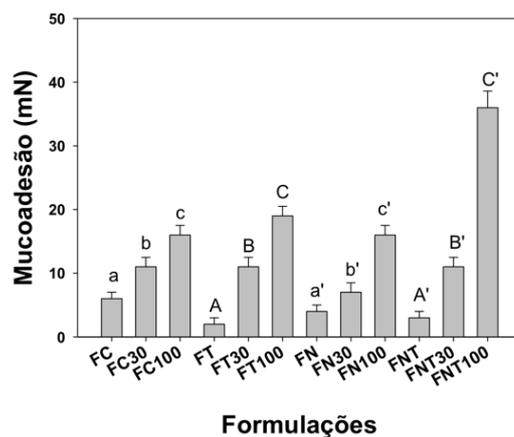
Os resultados mostram que todas as formulações sem saliva e todas as formulações com 30% de saliva são mais viscosas do que elásticas ( $G'' > G'$ ). No entanto, a adição de 100% de saliva tornou todas as formulações mais elásticas do que viscosas ( $G' > G''$ ), com estruturas tipo gel altamente organizadas.



**Figura 4.** Variação do módulo de armazenamento  $G'$  (símbolos cheios) e de perda  $G''$  (símbolos vazios) em função da frequência das formulações. A letra A representa os diferentes grupos da formulação de cristal líquido, letra B formulação de cristal líquido mais terpinen-4-ol, C formulação de cristal líquido e nistatina e D formulação de cristal líquido com terpinen-4-ol e nistatina.

## Mucoadesão

As forças necessárias para remover as formulações analisadas a partir da superfície da mucosa de esofágica estão ilustradas na Figura 5. Os resultados mostram que a adição de saliva no sistema aumenta significativamente a mucoadesão das formulações, devido à formação de sistemas líquidos cristalinos.



**Figura 5-** Mucoadesão (mN) das formulações. FC (formulação cristal líquido), FT (formulação cristal líquido com terpinen-4-ol), FN (formulação cristal líquido com nistatina) e FNT (formulação cristal líquido com nistatina e terpinen-4-ol). Sendo que 30 e 100 representam, respectivamente, 30% e 100%.

## Ação antifúngica e antibiofilme

A Tabela 2 mostra as diferentes concentrações terpinen-4-ol e nistatina aplicados sobre *C. albicans* isoladamente e em associação ao sistema precursor de cristal líquido. Os resultados mostram que t-4-ol 2.31 mg/mL foi a concentração capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*. Quando associado ao SPCL a concentração diminuiu para 1.06 mg/mL com ação semelhante. O mesmo ocorreu com a nistatina, sendo que a concentração 0.008 mg/mL foi eficaz e quando nos sistemas precursores, a concentração diminuiu para 0.00025 mg/mL.

A concentração fungicida mínima capaz de inibir o crescimento das amostras foi de 2.31 mg/mL para o T-4-ol e quando em cristal líquido observou-se redução para 1.06 mg/mL. As concentrações da nistatina foram 0.016 mg/mL e quando em cristal líquido 0.0005 mg/mL.

Em biofilme as concentrações eficazes foram t-4-ol 4.53 mg/mL e nis 0.128 mg/mL e quando em cristal líquido as concentrações diminuíram para 2.31 mg/mL e 0.032 mg/mL, respectivamente.

**Tabela 2** – Ação antifúngica e antibiofilme do terpinen-4-ol e nistatina aplicados sobre *Candida albicans* isoladamente e em associação ao sistema precursor de cristal líquido

	T-4-ol	T-4-ol + SPCL	Nis	Nis +SPCL
<b>CIM</b>	2.31 mg/mL	1.06 mg/mL	0.008 mg/mL	0.00025 mg/mL
<b>CFM</b>	2.31 mg/mL	1.06 mg/mL	0.16 mg/mL	0.0005 mg/mL
<b>Biofilme</b>	4.53 mg/mL	2.31 mg/mL	0.128 mg	0.032 mg/mL

O efeito sinérgico dos componentes foi observado tanto em culturas planctônicas quanto em biofilme, inclusive quando aplicados associados ao SPCL. Em culturas planctônicas, houve efeito sinérgico nas concentrações terpinen-4-ol 1.06 mg/mL e 0.57 mg/mL associados a nistatina 0.002 mg/mL e 0.001 mg/mL. Em biofilme, o intervalo de terpinen-4-ol 4.53 mg/mL a 1.06 mg/mL e de nistatina 0.064 mg/mL a 0.001 mg/mL. Quando aplicados com o sistema precursor de cristal líquido em biofilme ocorreu efeito sinérgico com as concentrações terpinen-4-ol 1.06 mg/mL e 0.57 mg/mL associados ao intervalo de nistatina 0.064 mg/mL a 0,008 mg/mL.

## **Discussão**

Neste estudo, nós desenvolvemos um sistema precursor de cristal líquido (SPCL) associado ao terpinen-4-ol e nistatina a fim de potencializar a ação antifúngica, antibiofilme sobre cepas de *C. albicans* e avaliar sua ação sinérgica/moduladora. Por esta razão, o diagrama de fases foi construído para determinar as porcentagens de surfactantes, fase oleosa e aquosa requerida para obtenção do SPCL e que com a adição de saliva ocorreu uma potencialização da mucoadesão, permitindo que o medicamento permaneça em contato por um tempo maior, possibilitando melhor eficácia do mesmo. Pela grande volatilidade do terpinen-4-ol, sua aplicação em SPCL é uma alternativa eficaz e segura. Além disso, permite uma melhor biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, sendo mais eficazes no tratamento das infecções.<sup>31</sup>

Foram utilizadas genotipagem A e B de *Candida albicans* coletadas de pacientes<sup>20</sup> sendo a primeira relacionada, em alguns estudos, ao aumento da resistência aos antifúngicos<sup>32</sup> e, a segunda é comumente encontrada em pacientes imunocomprometidos, particularmente com HIV.<sup>20</sup> Além disso, foi selecionada a cepa de referência SC 5314, conhecida por apresentar um fenótipo virulento em vários modelos de mucosa oral,<sup>33</sup> no qual foi isolada de um paciente com candidíase invasiva.<sup>34</sup>

A principal vantagem dos sistemas precursores de entrega é a manutenção do medicamento no sítio de aplicação por períodos mais longos, o que permite um maior contato da formulação com a barreira biológica, permitindo uma redução na frequência da aplicação do produto e aumento do conforto do paciente.<sup>35</sup>

A análise do diagrama de fase mostrou a formação de um sistema fluido e viscoso, como também da separação de fases. Esses resultados obtidos, corroboram com Calixto et al.<sup>36</sup> (2018) que também obtiveram na região de 40% uma fase de transição com a adição da fase aquosa. Nesta região, as formulações possuem baixas concentrações de

surfactante, a fim de diminuir a toxicidade resultando em grande benefício para os pacientes.<sup>16</sup>

Assim, as formulações obtidas foram analisadas por microscopia de luz polarizada (MLP), reologia e mucoadesão. Analisando a MLP, observou-se que todas as formulações apresentaram baixa viscosidade se comportando como sistemas microemulsionados e ao se acrescentar saliva nessas formulações, estas se comportaram como sistemas precursores de cristais líquidos. O estudo reológico mostrou que as formulações obtidas se comportaram como fluidos pseudoplásticos, ou seja, não apresentaram nenhum tipo de organização estrutural que poderia ser desmontada pelo esforço de cisalhamento, e quando esse cisalhamento foi interrompido, a formulação recuperou sua viscosidade inicial, estando de acordo com os resultados de Penzes et al.<sup>37</sup> (2004).

Os resultados também mostraram que a incorporação de saliva na formulação diminuiu o índice de fluxo, apresentando a característica de tixotropia. As propriedades tixotrópicas estão diretamente relacionadas à interação entre os componentes da formulação. Devido à existência de forças de interação entre as regiões mais estruturadas, esta pode ser destruída aumentando a taxa de cisalhamento e facilmente recuperada quando essa velocidade diminui Chorilli et al.<sup>15</sup> (2011).

Os tensoativos presentes na formulação tem propriedade de aumentar a permeabilidade do fármaco através das membranas biológicas (Du et al., 2014). A quitosana, por ter uma natureza catiônica permite uma forte interação com a superfície da mucosa que são carregadas negativamente.<sup>35</sup> Além disso, esses sistemas, por apresentarem transições de mesofases, ou seja, quando a formulação em sistema líquido entra em contato com a saliva presente na cavidade oral, passa para uma mesofase de maior viscosidade, podendo se localizar na interface óleo e água, resultando em estruturas

crystalinas, melhorando seu sistema de liberação, evitando desse modo, a dificuldade de aplicação inicial de um composto viscoso.<sup>27</sup> A propriedade de bioadesão também foi avaliada nesse estudo ocorrendo um aumento na adesão, possibilitando, desse modo, aumento do tempo de contato do medicamento com os microrganismos, possibilitando uma melhor eficácia do fármaco. Nossos resultados corroboram com Salmazi et al.<sup>16</sup> (2015) que mostraram que a adição de saliva na formulação (SPCL), aumenta a mucoadesão. Essa propriedade de aumentar a viscosidade com o aumento de saliva nas formulações, também é descrita na literatura como propriedade que facilita a mucoadesão em diferentes mucosas.<sup>39,40</sup>

No presente estudo, quando aplicada as diferentes concentrações de terpinen-4-ol e nistatina incorporado ao SPCL ou não sobre *C. albicans*, mostraram um efeito antifúngico e antibiofilme. É mostrado na literatura que o mecanismo de ação da nistatina se dá pela ligação aos esteróides existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante alteração na permeabilidade da membrana celular e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático. Entretanto, há relatos que comprovam seus efeitos colaterais, principalmente problemas gastrointestinais e sabor do medicamento.<sup>41</sup> O uso tópico da nistatina limita a permanência do medicamento no local, principalmente devido aos agentes flavorizantes adicionados, aumentando o volume de saliva no local, diminuindo o tempo de permanência e consequentemente eficácia no tratamento.<sup>9,42</sup> O Terpinen-4-ol atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo e nossos resultados estão de acordo com os estudos de Ramage et al.<sup>43</sup> (2012), que 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. Entretanto nossos resultados mostraram que quando incorporados ao SPCL, sua ação foi potencializada como também apresentou

efeito sinérgico/modulador. Assim, houve um aumento da atividade antifúngica e antibiofilme quando comparado as diferentes concentrações aplicadas isoladamente sem SPCL. Nossos resultados concordam com Salmazi et al.<sup>16</sup> (2015) que apesar de utilizarem o SPCL associado a curcumina, também observaram um melhor efeito sobre *C. albicans*, do que quando aplicada sem o sistema. Isso pode ser justificado pelo fato de que os sistemas líquidos cristalinos têm uma afinidade para os lipídeos presentes da parede celular fúngica, podendo aumentar a interação entre os mesmos. Donnelly et al.<sup>44</sup> (2007) avaliaram um sistema mucoadesivo em biofilmes orofaríngeos causados por *Candida* spp e verificaram que o perfil adesivo exercido sobre o biofilme era o principal fator subjacente a ação inibitória observada. A ação antifúngica dos componentes estudada nesse trabalho foi eficaz em menores concentrações quando associados ao sistema precursor de cristal líquido do que quando aplicadas isoladamente.

O uso da interação de compostos é uma das novas abordagens para melhoria da eficácia antimicrobiana e possível redução da concentração necessária para controlar infecções. A ação sinérgica dos componentes foi avaliada pelo teste do checkerboard. Esse teste permitiu a combinação de diferentes concentrações para verificar a interação positiva dos componentes avaliados, no qual seja significativamente maior do que quando utilizados individualmente.<sup>3</sup> Pode-se observar efeito sinérgico dos componentes inclusive quando incorporados no SPCL. Nikolić et al.<sup>45</sup> (2017) também utilizaram esse teste para verificar o efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Citrus limon* (limão), *Piper nigrum* (pimenta verde) e *Melaleuca alternifolia* e verificaram que a utilização combinada resultou em aumento da eficácia. Rosato et al.<sup>46</sup> (2009) estudaram o efeito sinérgico sobre *Candida* spp. dos óleos essenciais *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* e *Melaleuca alternifolia* e o composto antifúngico nistatina e concluíram

que houve um efeito aditivo da *M. alternifolia* com nistatina e interação sinérgicas das outras plantas com o medicamento.

Considerando a alta capacidade dos fungos em desenvolver resistência a antimicrobianos, o sistema precursor de cristal líquido (SPCL) incorporado ao terpinen-4-ol e nistatina favorece seu desenvolvimento para prevenção e tratamento de infecções fúngicas orais causadas por *C. albicans*.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Pesquisa de São Paulo) Processo 2014/22220-5 e 2015/08742-1.

Nossos sinceros agradecimentos à Juliana Pirola pelo apoio em toda a pesquisa.

### **Referências**

1. Santos ODH, Rocha Filho PA. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33(5): 543-549.
2. Bernegossi J, Barbosa RM, Rustice PM, Chorilli M. Green tea glycolic extract-loaded liquid crystal systems: development, characterization and microbiological control. *Braz J Pharm Sci.* 2016; 52(3): 383-39.
3. Inui T, Wang Y, Deng S, Smith DC, Franzblau SG, Paulo GF. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A.* 2007; 1151:211-215.
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): 189-193.
5. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004; 48(3):693-715.
6. Sardi JCO, Gullo FP, Pitangui NS, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. In vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from patients with chronic periodontitis and Diabetes. *Clin Microbial.* 2013; 2: 1.

7. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34: 448–455.
8. 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): 159-161.
9. Maghu S, Desai VD, Sharma R. Comparison of efficacy of alternative medicine with allopathy in treatment of oral fungal infection. *J Tradit Complement Med.* 2016; 6(1): 62–65.
10. Grando TH, de Sá MF, Baldissera MD, 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): 377-382.
11. Francisconi RS, Bordini EAF, Nogueira MNM, et al. Effect of *Melaleuca alternifolia* and its components on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J US-China Med Sci.* 2015; 12: 91-98.
12. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, 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): 492-499.
13. Calixto GMF, Garcia MH, Cilli EM, Chiavacci LA, Chorilli M. Design and characterization of a novel p1025 peptide-loaded liquid crystalline system for the treatment of dental caries. *Molecules.* 2016; 21(2), 158.
14. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Salvatore AC, Giuseppe. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and –resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 158-165.
15. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;85(2):182–188.
16. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. Curcumin-loaded liquid crystalline precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine.* 2015;10: 4815–4824.
17. Saxena A, Kaloti M, Bohidar HB. Rheological properties of binary and ternary protein–polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. *Int J Biol Macromol.* 2011; 48: 263–270.

18. Silva SAM, Lacerda R, Bernegossi J, Chorilli M, Leonardi GR. Development of nanotechnology-based drug delivery systems with olive vegetable oil for cutaneous application. *Braz J Pharm Sci.* 2016; 52:1.
19. Bento da Silva P, Calixto GMF, Oshiro Júnior JA, et al. Structural Features and the anti-Inflammatory effect of green tea extract-loaded liquid crystalline systems intended for skin delivery. *Polymers.* 2017; 9(1):30.
20. 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: 467–475.
21. Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Cury AADB. Effects of Nystatin, Fluconazole and Propolis on Poly (Methyl Methacrylate) Resin Surface. *Braz Dent J.* 2008; 19: 190-196.
22. 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: 1081-1085.
23. Bagg J, Jackson MS, Sweeney MP, Ramage G, Davies NA. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the muths of patients with advanced cancer. *Oral Ocol.* 2006; 42: 487-92.
24. Bonapace, CR, Bosso, JA, Friedrich, LV, White, RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(4): 363-366.
25. 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: 1241-1251.
26. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 492–497.
27. dos Santos Ramos MA, Calixto G, de Toledo LG, 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): 7455-7566.
28. Gabboun NH, Najib NM, Ibrahim HG, Assaf S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. *Int J Pharm.* 2001; 212(1): 73-80.

29. Hyde ST. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16. p. 299-332.
30. Ceulemans J, Vinckier I, Ludwig A. The use of xantan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. *J Pharm Sci.* 2002; 91: 1117-1127.
31. 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): 6150–6156.
32. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 417–421.
33. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun.* 2007; 75: 2126–2135.
34. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One.* 2009; 4(11): e7967.
35. Smart JD, Riley RG, Tsibouklis J, et al. The retention of <sup>14</sup>C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: an in vitro study. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 20(1): 83–90.
36. Calixto GMF, Duque C, Ainda KL, Rodrigues dos Santos V, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025- loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomed;* 2017; 13: 31–41.
37. Pènzés T, Csóka I, Erős I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. *Rheol Acta.* 2004; 43(5): 457–463.
38. Du JD, Liu Q, Salentinig S, Nguyen TH, Boyd BJ. A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug nanocarriers for improved drug delivery to the buccal mucosa. *Int J Pharm.* 2014; 471 (1–2): 358- 365
39. Rai VK, Yadav NP, Sinha P, et al. Development of cellulosic polymer based gel of novel ternary mixture of miconazole nitrate for buccal delivery. *Carbohydr Polym.* 2014; 103 (1): 126-133.

40. Jones DS, Bruschi ML, de Freitas O, Gremião MPD, Guimaraes Lara EH, Andrews GP. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and Carbopol<sup>®</sup> 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int J Pharm.* 2009; 373: 49-58.
41. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 10:1161-1171.
42. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:195-199.
43. Ramage G, Milliga S, Lappin DF, 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: 220-240.
44. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol.* 2007; 86(1): 59-69.
45. Nikolic MM, Jovanovi KK, Markovi TL, et al. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of Citrus limon L., Piper nigrum L. and Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *J Pharm Pharmacol.* 2017; 69: 1606–1614.
46. 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): 972-975.

## 2.2 Publicação 2

### **Avaliação da citotoxicidade e adesão em co-cultura de *Candida albicans* usando o sistema precursor de cristal líquido associado ao Terpinen-4-ol \***

Renata Serignoli Francisconi<sup>a\*</sup>, Caroline Coradi Tonon<sup>a</sup>, Juliane de Camargo Zatiti<sup>a</sup>, Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian<sup>b</sup>, Janaína de Cássia Orlandi Sardi<sup>c</sup>, Marlus Chorilli<sup>b</sup>, Marcel Costa Medeiros<sup>d</sup>, Denise Madalena Palomari Spolidorio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, School of Dentistry of Araraquara, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, SP, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical of Araraquara, Department of Drugs and Medicines, Araraquara, SP, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Estadual Campinas – UNICAMP, School of dentistry of Piracicaba, Department of Physiological Sciences, Piracicaba, SP, Brazil.

<sup>d</sup>Univ. Estadual Paulista – UNESP, School of Dentistry of Araraquara, Department of diagnosis and surgery, Araraquara, SP, Brazil

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

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP  
Department of Physiology and Pathology / Laboratory of Microbiology e Biology  
Molecular  
Street Humaitá, 1680 – Zip Code: 14.801-903, Araraquara, SP - Brazil  
Phone: + 55 (16) 3301-6402 / FAX: + 55 (16) 3301-6488  
e-mail: re\_francis2@hotmail. com

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

## **Resumo**

O sistema de entrega do medicamento influencia diretamente na eficiência do tratamento e deve visar aumento na biodisponibilidade local por determinado período de tempo. O sistema precursor de cristal líquido (SPCL) pode proporcionar liberação lenta e duradoura do medicamento sobre os microrganismos, indicando uma alternativa eficaz no tratamento da infecção. *Candida* spp. são fungos patogênicos que possuem capacidade de formar biofilmes orais e devido a sua resistência, novas alternativas de tratamento antifúngico têm sido estudadas. A fitoterapia se apresenta potencialmente valiosa e, entre os fitoterápicos, o Terpinen-4-ol tem-se destacado. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e verificar se o terpinen-4-ol e o SPCL interferem na adesão de *Candida albicans* em células epiteliais orais. Foi utilizado cultura celular de linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (NOK). 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 CO<sub>2</sub>. Observações utilizando a citometria de fluxo mostraram que os componentes não foram citotóxicos nos tempos de aplicação de 4 e 8 horas. A adesão de *Candida albicans* sobre as células epiteliais foram avaliadas em unidades formadoras de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>) e mostraram que o terpinen-4-ol associado ou não ao SPCL, reduzem a adesão de *C. albicans* sobre células epiteliais.

**Palavras-Chave:** citotoxicidade, Terpinen-4-ol, cristal líquido, adesão

## **Introdução**

Dentre os sistemas nanoestruturados, o sistema precursor de cristal líquido tem se destacado, uma vez que sua formulação apresenta boa adesividade na mucosa, permite melhor estabilidade física e grande solubilização de fármacos, facilitando a incorporação dos mesmos (Ramos et al., 2015). Além disso, podem controlar a administração de drogas através da formação de uma matriz rígida de liberação do fármaco (Carvalho et al., 2013).

O terpinen-4-ol é um fitoterápico que está sendo explorado para controle de infecções microbianas e este é o principal e mais potente componente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também conhecido como óleo da árvore do chá (Tea Tree Oil – TTO) (Tighe et al., 2013). Possui amplo espectro de atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Nogueira et al.; 2014). Há relatos de sua eficácia no tratamento de infecções

fúngicas, ocasionadas, principalmente por *Candida albicans* (Francisconi et al., 2016). Pela grande hidrofobicidade e volatilidade do óleo, sua aplicação em sistema bio(muco)adesivo é uma alternativa eficaz e segura. Ademais, permite melhor biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, sendo mais eficaz no tratamento das infecções. (Sun et al., 2012). Entretanto estudos mostram diversidade no grau de citotoxicidade desse componente, como também na sua ação mutagênica e alérgica. Relatos mostram que baixas concentrações do terpinen-4-ol não apresentam potencial tóxico sobre fibroblastos e células epiteliais, tornando o uso tópico compatível e com menores efeitos adversos. (Ramage et al., 2012; Carson et al., 2006).

*Candida albicans* são patógenos oportunistas que vêm aumentando devido aos fatores predisponentes, tais como, uso de antibióticos de amplo espectro, alterações imunológicas, doenças sistêmicas e resistência aos antifúngicos (Manfredi et al., 2006). Um importante fator de virulência da *Candida* spp. é a adesão, e atuam nos estágios iniciais na formação do biofilme, ligando microrganismos a substratos biológicos ou não biológicos (Sudjana, 2012). Algumas espécies apresentam proteínas responsáveis pela adesão às células hospedeiras e se tornam mais resistentes às células de defesa, permitindo o desenvolvimento de lesões crônicas (Sardi et al., 2012).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade e verificar se o terpinen-4-ol incorporado ao sistema precursor de cristal líquido (SPCL) interfere na adesão de *Candida albicans* em células epiteliais orais.

## ***Material e Métodos***

### **Cultura Celular**

Foi utilizada linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (NOK). 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 CO<sub>2</sub>. Em seguida, 30.000 células/cm<sup>2</sup> foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços (Costar Corp, MA, EUA) e mantidas em incubadora umidificada por 48 h. Para os grupos controle negativo e positivo foram utilizados meio de cultura puro (DMEM) e peróxido de hidrogênio 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), respectivamente. Foram utilizadas as concentrações de Nistatina (0.128 mg/mL a 0.008 mg/mL), Nistatina + SPCL (0.032 mg/mL a 0.008 mg/mL), Terpinen-4-ol (4.53

mg/mL a 0.57 mg/mL) e Terpinen-4-ol + SPCL (2.31 mg/mL a 0.57 mg/mL). Posteriormente as células foram expostas às soluções testes por 4, 8 e 12 h e avaliadas pela citometria de fluxo.

### **Isolados Fúngicos**

Foram utilizados dois isolados clínicos de *C. albicans* (Genotipagem A e B) coletados de pacientes diabéticos com periodontite crônica (Comitê de Ética 062/2008) (Sardi et al., 2012) e a cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 90028). As amostras cresceram em RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) pH 7.0 (0.165 M MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico), acrescido com 2 % de glicose a 37° C por 24 h. As suspensões foram ajustadas com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331, Hamburg, Germany), até atingir absorbância correspondente a  $1.0 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> (Silva et al., 2008)

### **Citometria de fluxo**

Para análise em citômetro, o meio de cultura foi aspirado após o período de incubação das células NOK Si e, os grupos de tratamento foram adicionados a cada poço contendo as células, ficando em contato por 4 h, 8 h e 12 h em incubadora a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao final do período experimental, o sobrenadante de cada poço foi retirado e as células aderidas no fundo dos poços foram coletadas por dissociação enzimática (tripsina 0.25%) e adicionadas aos tubos eppendorfs. As amostras coletadas foram centrifugadas (300 g, 5 min) e as células resuspendidas em 500 µl de PBS para lavagem, seguindo-se de nova centrifugação. Posteriormente as células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão FACS (PBS + 5% FBS), 5 µL de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) misturadas delicadamente e incubadas por 15 minutos na ausência de luz. À suspensão final foram acrescentados 100 µL de tampão de FACS e as células levadas ao citômetro de fluxo (R&D System, 2017). O experimento foi realizado em triplicata em três momentos diferentes.

Para análise, inicialmente foi construído um *gate* excluindo debris celulares no dot-plot FSC x SSC que gera a população 1 (P1). Considerando apenas os eventos em P1, um novo *gate* foi construído, excluindo *doublets* e aglomerados celulares em um dot-plot

FSC-W x FSC-A, gerando a população 2 (P2). Considerando apenas os eventos em P2, a proporção de células viáveis e não-viáveis foi determinada em dot-plot de FL-2 (PE) ou FL-3 (PerCPCy5.5) x FSC. Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente e um mínimo de 10.000 eventos em P2 foram adquiridos em cada experimento.

### **Ensaio de adesão às células humanas**

As células NOK foram preparadas e após a formação da monocamada, os inóculos *C. albicans* (SC 5314, Genotipagem A e B) ( $1.0 \times 10^3$  CFM  $\text{ml}^{-1}$ ) foram adicionados com as concentrações de terpinen-4-ol (2.31 mg/mL), nistatina (0.004 mg/mL), terpinen-4-ol + SPCL (0.57 mg/mL), nistatina + SPCL (0.00012 mg/mL), sendo as mesmas estabelecidas como sendo concentrações abaixo da concentração inibitória mínima para que não ocorresse interferência no crescimento do microrganismo.

As placas foram incubadas a  $36.5^\circ \text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  por 2 h (Collette et al., 2017), tempo esse conhecido na literatura e confirmado previamente. As células foram lavadas com PBS, liberadas com tripsina e plaqueadas em SDA (Sabouraud Dextrose Agar Acumedia, Lansing, MI, USA). Após 48 horas, as colônias foram contadas e transformadas em UFC  $\text{ml}^{-1}$ .

### **Análise Estatística**

Os dados sobre a atividade do t-4-ol na adesão e citotoxicidade foram analisados quanto à presença de outliers e aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Teste de Levene). Em seguida, foi realizada a ANOVA seguida do teste HSD de Tukey para identificar a existência de diferenças significativas entre os grupos para cada cepa estudada e a variável dependente analisada foram as unidades formadoras de colônias (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) após ser log transformado (CFU  $\text{ml}^{-1}$ ).

## **Resultados**

### **Citometria de fluxo**

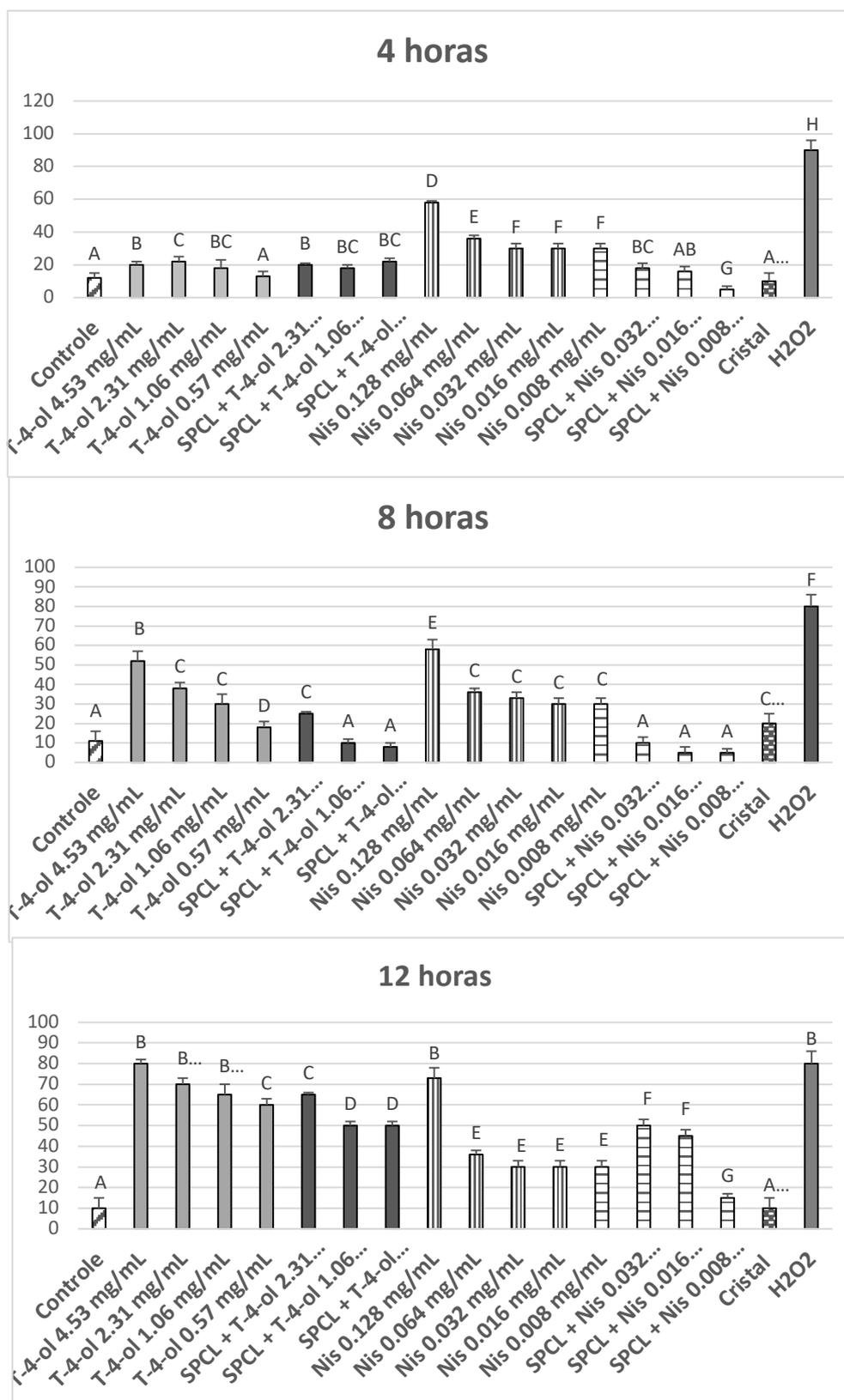
Os resultados da citometria de fluxo para avaliação da citotoxicidade do terpinen-4-ol, nistatina, SPCL e associação dos mesmos, estão ilustrados na Figura 2. Os resultados

mostram diferentes porcentagens de morte celular dos diferentes grupos avaliados. O ensaio não revelou expressiva morte celular quando as células foram expostas ao SPCL (sozinho ou associado ao terpinen-4-ol e nistatina).

Após 4 h de exposição, valores baixos de morte celular foram detectados nos grupos tratados com terpinen-4-ol e nistatina associados ou não ao cristal líquido. Apenas na concentração nistatina 0.128 mg/mL se observou maior porcentagem de morte celular (aproximadamente 60%). Ainda neste período de 4 h de exposição, pode-se verificar que a nistatina apresentou-se mais tóxica quando comparada ao terpinen-4-ol, mas com resultados semelhantes quando em associação ao SPCL.

No ensaio de 8 h, os resultados obtidos foram semelhantes aos citados no tempo de exposição de 4 h. Apenas terpinen-4-ol 4.53 mg/mL e nistatina 0.128 mg/ml tiveram maiores valores de morte celular. Entretanto, resultados interessantes e estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ) foram observados quando estes estavam na forma de SPCL, pois quando em associação demonstrou-se menos tóxicos mesmo com as concentrações utilizadas no grupo sem SPCL.

No maior tempo de exposição 12 h, os grupos com SPCL continuaram revelando menor taxa de morte celular que os tratamentos sem cristal. As concentrações estudadas de terpinen-4-ol e de nistatina apresentaram taxa de morte celular mais elevadas, sendo semelhantes ao grupo controle nas concentrações acima de terpinen-4-ol 1.06 mg/mL e nistatina 128 µg/ml.



**Figura 2**– Porcentagem de morte celular para queratinócitos orais (NOK Si) após 4 h, 8 h e 12 h de exposição ao terpinen-4-ol e nistatina associados ou não ao SPCL, avaliados em citometria de fluxo. Diferenças estatísticas estão representadas por diferentes letras para comparação entre tratamentos (ANOVA One-way seguida pelo teste de Tukey,  $p < 0.05$ )

### Ensaio de adesão às células humanas

A curva de padronização para a adesão de células de *C. albicans* em NOK Si (tempo da primeira ocorrência de adesão de levedura em cultura celular e tempo com maior taxa de conformidade) foi determinada e, após duas horas, houve uma maior associação.

A Tabela 1 representa as porcentagens da redução da adesão de *C. albicans* sobre células epiteliais orais após aplicação dos componentes. Os resultados mostram redução da adesão de *C. albicans* nas células epiteliais, sendo que houve redução em média de 13,33% quando aplicado o terpinen-4-ol; 15,33% para terpinen-4-ol + SPCL; 17,66% para nistatina e 19% para nistatina + SPCL.

**Tabela 1** – Porcentagem da redução da adesão de *C. albicans* sobre células epiteliais orais com aplicação de 2 horas de terpinen-4-ol, nistatina, SPCL + terpinen-4-ol e SPCL + Nistatina

	T-4-ol +			
	T-4-ol	SPCL	Nis	Nis +SPCL
<b>SC 5314</b>	14%	18%	18%	20%
<b>A</b>	14%	13%	17%	19%
<b>B</b>	12%	15%	18%	18%
<b>Média</b>	13,33%	15,33%	17,66%	19%

### Discussão

Dentre os sistemas de administração de fármacos, os cristais líquidos licotrópicos (LCS) têm atraído interesse significativo por exibirem propriedades físicas tanto de líquidos como de cristais: atributos de líquidos, porque são fluidos; e sólidos, pois apresentam uma estrutura organizada (Formariz, 2005). Estes têm sido extensivamente investigados por pesquisadores (Chorilli, 2009; Salmazi et al., 2015; dos Santos Ramos et al., 2015), porque são biodegradáveis e possuem propriedades bioadesivas que também contribuem para suas aplicações na liberação de fármacos (Guo, 2010). Esse sistema possui potencial de melhora da distribuição de medicamentos levando ao aumento da eficácia, o que pode resultar em grande benefício para os pacientes (Soppimath, 2001).

A indústria farmacêutica perde importantes novos candidatos a medicamentos pelo fracasso da identificação precoce dos efeitos tóxicos dos compostos. Portanto, o teste

de citotoxicidade tornou-se um dos passos mais importantes nas fases iniciais do processo de descoberta de medicamentos (Rençbe et al., 2016). Apesar dos avanços na caracterização das propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória, poucos trabalhos têm sido feitos sobre a segurança e a toxicidade do terpinen-4-ol e do sistema precursor de cristal líquido (SPCL). A razão para o uso continuado do óleo é em grande parte devido ao uso aparentemente seguro do óleo por quase 80 anos. Evidências ao longo deste tempo sugerem que o uso tópico é seguro e que os eventos adversos são menores, auto-limitados, e pouco frequentes. Evidências mais concretas são escassas, e muita informação permanece fora do domínio público sob a forma de relatórios de trabalho patrocinado pelas empresas fabricantes (Carson et al., 2006).

A citotoxicidade do terpinen-4-ol, nistatina, SPCL e associação dos mesmos foi avaliada pela citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que os grupos os quais estavam incorporados o cristal líquido, apresentaram menor taxa de morte. A citometria de fluxo utiliza como corante o Iodeto de Propídeo (PI, propidium iodide) que é uma alternativa viável já que este é um composto com afinidade para DNA dupla-fita e não atravessa a membrana plasmática íntegra. As células não viáveis perdem a competência da membrana plasmática, o que possibilita o acesso do PI ao interior da célula, aonde irá se intercalar nos pares de base do DNA dupla-fita. O PI ligado ao DNA genômico é excitado por laser azul de 488 nm e emite fluorescência a 617 nm, sendo detectado pelo citômetro. Desta forma a presença de fluorescência indica a perda de integridade de membrana e, conseqüentemente, a não viabilidade celular. Pela citometria de fluxo há também a possibilidade da avaliação do tipo de morte (apoptose ou necrose) e a fase em que a apoptose ocorre (fases iniciais/precoces e finais/avançadas).

Nossos resultados foram promissores nos ensaios no tempo de 8 h de exposição dos componentes, quando analisados pela citometria. Os resultados mostraram que a partir de terpinen-4-ol 1.06 mg/mL e Nistatina 0.032 mg/mL associados ao SPCL, não apresentaram citotoxicidade e foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle. Apesar de não ser encontrado estudos na literatura sobre a citotoxicidade do terpinen-4-ol associado ao SPCL, estudos que utilizaram o SPCL, como de Calixto et al. (2017), avaliaram a citotoxicidade de um sistema precursor de cristal líquido semelhante, afirmando que este sistema é seguro para administração de medicamentos no tratamento de várias doenças bucais. Ademais, Calixto et al. (2018) avaliaram um sistema precursor de cristal líquido associado ao peptídeo p1025 mostrando a ocorrência de citotoxicidade limitada e boa propriedade adesiva com potencial ação antimicrobiano.

Nossas avaliações com relação à nistatina, mostram que a maior concentração que não interferiu na viabilidade celular foi 0.064 mg/mL. Nossos estudos corroboram com de Sardi et al. (2016) que avaliaram a toxicidade da nistatina sobre linhagem celular NOK, obtendo baixa toxicidade, sendo que 0.4 mg/L foi capaz de inibir 50% das células e que manteve mais de 80% da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Estudos de Ruhil et al. (2014) avaliaram o efeito citotóxico da nistatina em células de camundongos (CCL 131) mostrando 50% de morte celular com dose 0.015 – 0.062 mg/ml. É difícil comparar nossos resultados com outras investigações porque alguns fatores como pH, isolados microbianos, tempo de incubação, temperatura, testes de concentração e outros fatores podem influenciar nos resultados.

A adesão de *Candida* à superfícies mucosas é considerada o primeiro passo na patogênese da candidíase oral (Dorocka-Bobkowska et al., 2003). Na avaliação da interferência dos medicamentos na adesão de *C. albicans* sobre células orais, houve redução, quando aplicados juntamente com concentrações não letais de nistatina e terpinen-4-ol, ocorrendo redução em média de 18% e 13%, respectivamente. Embora não tenhamos trabalhos na literatura abordando o uso do terpinen-4-ol, alguns estudos avaliaram o efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO), uma vez que o terpinen-4-ol é o seu principal componente. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com os estudos de Sudjana et al. (2012) que avaliaram o efeito do óleo de *M. alternifolia* sobre a adesão de isolados de *C. albicans* em células epiteliais e HeLa e verificaram redução significativa com a aplicação de 0.01 a 0.062% de *M. alternifolia*. Além disso, observaram que a concentração de TTO 0.125% diminuiu a hidrofobicidade da superfície celular, indicando um potencial mecanismo pelo qual a adesão pode ser reduzida. Dorocka-Bobkowska et al. (2003) examinaram o efeito de antifúngicos (nistatina, anfotericina B, natamicina) em concentrações subletais contra *C. albicans* e *C. glabrata* sobre células HeLa e HSC-3 (células de carcinoma). Os resultados mostraram que a adesão dos microrganismos sobre as células foi significativamente menor quando os medicamentos estavam presentes durante a fase de aderência e que a anfotericina B foi o medicamento que mais interferiu na aderência (50-60%), ocorrendo redução de 2 a 10% dos outros medicamentos comparado aos controles livre de drogas. Afirmam que os níveis sub-terapêuticos que persistirem na cavidade oral após o tratamento tópico podem modular a colonização quando presente durante a fase de aderência.

Pode-se concluir que o terpinen-4-ol e a nistatina, em curtos períodos de exposição (4 h e 8 h) e após 12 h, não são citotóxicos para queratinócitos orais (NOK Si). O

precursor de cristal líquido não demonstrou citotoxicidade no teste de citometria de fluxo, quando em contato com queratinóticos orais por 4 h e 8 h; além de mostrar redução na citotoxicidade do t-4-ol e nis, quando em associação a estes. Além do mais, os componentes (associados ou não ao SPCL) interferiram na adesão de *C. albicans* sobre células epiteliais, podendo ser utilizado para prevenção da doença fúngica. Assim, terpinen-4-ol e nistatina em associação ao SPCL ou não, podem ser utilizados para tratamento de infecções bucais.

### ***Agradecimentos***

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Pesquisa de São Paulo) Processo 2014/22220-5 e 2015/08742-1.

Nossos sinceros agradecimentos à Juliana Pirola pelo apoio em toda a pesquisa.

### ***Referências***

1. Calixto, G.M.F., Duque, C., Ainda, K.L., Rodrigues dos Santos, V., Massunari, L., Chorilli, M., 2017. Development and characterization of p1025- loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. International Journal of Nanomedicine 13, 31–41.
2. Calixto, G.M.F., Victorelli, F.C., Dovigo, L.N., Chorilli, M., 2018. Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery. AAPS PharmSciTech 19(2): 820-836.
3. Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin Microbiol Rev 19(1): 50-62.
4. Carvalho, F.C., Campos, M.L., Peccinini, R.G., Gremião, M.P., 2013. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. Eur J Pharm Biopharm 84(1):219-27.
5. Collette, J.R., Zhou, H., Lorenz, M.C., 2017. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. AAPS PharmSciTech 22: 9(4).

6. Chorilli, M., Prestes, P.S., Rigon, R.B., Leonardi, G.R., Chiavacci, L.A., Scarpa, M.V., 2009. Development of liquid-crystalline systems using silicon glycol copolymer and polyether functional siloxane. *Química Nova* 32(4): 1036–1040.
7. Dorocka-Bobkowska, B., Konopka, K., Düzgünes, N., 2003. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of Oral Biology* 48, 805- 14.
8. Dos Santos Ramos, M.A., Calixto, G., de Toledo, L.G., Bonifácio, B.V., dos Santos, L.C., de Almeida, M.T., Chorilli, M., Bauab, T.M., 2015. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. *International Journal of Nanomedicine* 16(10): 7455-66.
9. Francisconi, R.S., Bordini, E.A.F., Nogueira, M.N.M., Fontana, A., Bedran, T.B.L., Correia, M.F., Spolidorio, D.M.P., 2015. Effect of *Melaleuca Alternifolia* and Its components on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of US-China Medical Science* 12: 91-98.
10. Formariz, T.P., Urban, M.C.C., Silva Júnior, A.A., Gremiao, M.P.D., Oliveira, A.G., 2005. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41(3): 301-13.
11. Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R.J., Zhai, G., 2010. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today* 15(23-24): 1032–40.
12. Manfredi, M., McCullough, M.J., Polonelli, L., Conti, S., Al-Karaawi, Z.M., Vescovi, P., Poter, S.R., 2006. In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology* 21:177–82.
13. Nogueira, M.N., Aquino, S.G., Rossa Junior, C., Spolidorio, D.M., 2014. Terpinen-4-ol and alpha- terpineol (tea tree oil componentes) inhibit the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflammation Reserach* 63(9): 769-78.
14. R&D Systems, Inc. Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide, 2017. <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
15. Ramage, G., Milliga, S., Lappin, D.F., Sherry, L., Sweeney, P., Williams, C., Bagg, J., Culshaw, S., 2012. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Frontiers in Microbiology* 3: 220-40.

16. Rençber, S., Karavana, S.Y., Yılmaz, F.F., Eraç, B., Nenni, M., Özbal S., Pekçetin, Gurer-Orham, H, Hosgör Lomoncu, M., Güner, P., Ertan, G., 2016. Development, characterization, and *in vivo* assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral candidiasis. *International Journal of Nanomedicine* 11: 2641–2653.
17. Ruhil, S., Kumar, V., Balhara, M., Malik, M., Dhankhar, S., Kumar, M., H+Kumar Chhillar, A., 2014. In vitro evaluation of combination of polyenes with EDTA against *Aspergillus* spp. by different methods (FICI and CI Model). *Journal of Applied Microbiology* 117(3): 643-653.
18. Salmazi, R., Calixto, G., Bernegossi, J., Ramos, M.A., Bauab, T.M., Chorilli, M., 2015. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *International Journal of Nanomedicine* 10: 4815-24.
19. Sardi, J.C.O., Duque, C., Höfling, J.F., Gonçalves, R.B., 2012. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Medical Mycology* 50: 467–475.
20. Sardi, J.C.O., Gullo, F.P., Freires, I.A., Pitangui, N.S., Segalla, M.P., Fusco-Almeida, A.M., Rosalen, P.L., Regasini, L.O., Mendes-Giannini, M.J., 2016. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 2016; 86(4): 387-91.
21. Silva, W.J., Rached, R.N., Rosalen, P.L., Del Bel Cury, A.A., 2008. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly (methyl methacrylate) resin surface. *Brazilian Dental Journal* 19: 190-196.
22. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 70:1-20.
23. Sudjana, A.N., Carson, C.F., Carson, K.C., Riley, T.V., Hammer, K.A., 2012. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Medical Mycology* 50:863–870.

24. Sun, L., Zhang, C., Li, P., 2012. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(24): 6150–6.

### 3 DISCUSSÃO

Apesar da mucosa bucal ser um local para boa administração de drogas, tem como efeito indesejado, em relação ao tempo de contato da droga com a mucosa, grande volume de saliva. Desse modo, observa-se grande interesse no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, pois podem melhorar a biodisponibilidade do medicamento a fim de orientar sua ação para o local específico de interesse, sendo sua aplicabilidade uma alternativa eficaz e segura. A nanotecnologia possui o potencial de melhorar a distribuição de medicamentos levando ao aumento da eficácia e toxicidade reduzida, o que resulta em grande benefício para os pacientes<sup>16,17</sup>.

Dentre os sistemas de administração de fármacos, os cristais líquidos licotrópicos (LCS) têm atraído interesse significativo por exibirem propriedades físicas tanto de líquidos como de cristais: atributos de líquidos, porque são fluidos; e sólidos, pois apresentam uma estrutura organizada<sup>18</sup>. Têm sido extensivamente investigados por pesquisadores<sup>19</sup>, porque são biodegradáveis e possuem propriedades bioadesivas que também contribuem para suas aplicações na liberação de fármacos<sup>20</sup>. Permite melhor biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, tornando o tratamento das infecções mais eficaz<sup>3</sup>. Pela grande hidrofobicidade e volatilidade do componente, principalmente do terpinen-4-ol, sua aplicação em SPCL é uma alternativa eficaz e segura.

O diagrama ternário de fases é uma ferramenta utilizada para visualização da quantidade necessária de fase oleosa, fase aquosa e tensoativo para a formação de diferentes formas farmacêuticas constituídas por essas fases, tais como microemulsões e sistemas líquidos cristalinos<sup>21</sup>. Portanto, a construção desse diagrama serviu como ponto de partida para o estudo de delineamento dessa composição, pois revelou o comportamento físico químico da mistura de diferentes proporções dessas fases, facilitando a escolha da formulação mais adequada para a finalidade proposta.

O sistema desenvolvido comportou-se como fluido pseudoplástico, sendo esse comportamento muito desejável para formulações para uso tópico, pois ao colocar uma força na hora da aplicação através da seringa, a formulação diminuiu sua viscosidade, facilitando a aplicação da formulação; no entanto quando essa força cessou, a formulação conseguiu voltar a sua configuração mais rígida. Além disso, o aumento da viscosidade da formulação e sua característica elástica contribuiu com o aumento da força de destacamento entre a formulação e a membrana empregada no teste. Considerando a

aplicação bucal proposta para essas formulações, deve-se destacar que a elasticidade é uma propriedade importante para garantir resistência à deformação e boa retenção das formulações dentro da mucosa bucal<sup>23</sup>. Nesse sentido, destaca-se a importância da utilização de formulações nesse estudo.

O SPCL avaliado demonstrou aumento na mucoadesão, conforme aumentou a saliva na formulação, isso se demonstra favorável na aplicação clínica oral, uma vez que o medicamento entrará em contato com a saliva presente na cavidade oral, aumentando sua adesão e conseqüentemente aumento no tempo de contato, possibilitando melhor eficácia do medicamento.

Os resultados comprovaram a ação antifúngica dos componentes quando associados ao sistema precursor de cristal líquido em menores concentrações, quando comparados aos componentes isoladamente. Este fato se justifica pelo fato de que os cristais líquidos possuem afinidade para os lipídeos presentes da parede celular fúngica, podendo aumentar a interação entre os mesmos.<sup>1</sup> Salmazi et al. <sup>1</sup> (2015) também desenvolveram e avaliaram o sistema precursor de cristal líquido, porém associado com a curcumina, sobre *C. albicans* e verificaram que o cristal apresentou dezesseis vezes maior eficiência no controle dos microrganismos (isolado padrão) e duas vezes (isolado clínico) comparado ao uso do medicamento sem a formulação.

Além do SPCL, outra característica analisada nesse estudo foi o sinergismo dos componentes avaliados pelo ensaio do checkerboard. Esse teste permite a combinação de diferentes concentrações para verificar se ocorre interação positiva dos componentes avaliados, no qual seja significativamente maior do que quando utilizados individualmente<sup>24</sup>. Além de análises em culturas planctônicas, foram desenvolvidos biofilmes e, para diferenciação entre as células vivas e mortas, foi utilizado o teste de XTT que é um teste de quantificação baseado na atividade metabólica de microrganismos viáveis. Pode-se observar efeito sinérgico dos componentes, inclusive quando incorporados no SPCL, como também encontrados com outros óleos essenciais e nistatina. Rosato et al. <sup>24</sup> (2009) demonstraram efeito aditivo do TTO com nistatina, enquanto Castro et al. <sup>25</sup> (2015) observaram resultados com efeito sinérgico do timol e nistatina sobre espécies de *Candida*.

Apesar da nistatina ser rotineiramente utilizada para tratamento de infecções fúngicas orais, há relatos de casos que comprovam efeito tóxicos quando utilizados em longo período de tempo. Além disso, o uso tópico da nistatina limita a permanência do medicamento no local, principalmente devido aos agentes flavorizantes adicionados,

aumentando o volume de saliva no local, diminuindo o tempo de permanência e consequentemente eficácia no tratamento<sup>26</sup>.

Embora os avanços na caracterização das propriedades antimicrobianas e anti-inflamatória, poucos trabalhos têm sido feitos sobre a segurança e a toxicidade do terpinen-4-ol e do precursor de cristal líquido. A razão para o uso continuado do óleo é em grande parte devido ao uso aparentemente seguro do óleo por quase 80 anos. Evidências ao longo deste tempo sugerem que o uso tópico é seguro e que os eventos adversos são menores, auto-limitados, e pouco frequentes. Evidências mais concretas são escassas, e muita informação permanece fora do domínio público sob a forma de relatórios de trabalho patrocinado pelas empresas fabricantes<sup>27</sup>.

A citotoxicidade do terpinen-4-ol e a nistatina foi avaliada sobre células orais (queratinócitos) pelo teste de citometria de fluxo. Resultados demonstraram que o SPCL não foi tóxico, além de diminuir a toxicidade dos componentes quando associados. Em relação ao terpinen-4ol, não foi citotóxico em curtos períodos de tempo.

Estudos corroboram com estes resultados, como de Ramage et al.<sup>28</sup> (2012), o qual mostraram que o terpinen-4-ol utilizado sobre duas linhagens celulares distintas, fibroblastos e células epiteliais, com concentração 0.5 x CIM<sub>50</sub>, não apresentaram toxicidade. No estudo de Nogueira et al.<sup>5</sup> (2014), resultados mostraram que terpinen-4-ol 0.059 e 0.0073% podem ser utilizados nos experimentos com macrófagos. Sardi et al.<sup>29</sup> (2016) avaliaram a toxicidade da nistatina sobre linhagem celular NOK, obtendo baixa toxicidade, sendo que 0.4 mg/L foi capaz de inibir 50% das células e que manteve mais de 80% da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Estudo de Ruhil et al.<sup>30</sup> (2014) avaliaram o efeito citotóxico da nistatina pelo alamar blue em células de camundongos (CCL 131) mostrando que houve 50% de morte celular no intervalo 0.015 – 0.062 mg/ml. Nosso estudo também demonstrou que o óleo interfere na adesão de *Candida albicans* sobre células orais, sugerindo possível efeito preventivo para esse tipo de infecção.

#### **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 $\beta$ , 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, Pitangui 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.

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 19/03/2020**

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

**Araraquara, 19 de março de 2018.**

**Renata Serignoli Francisconi**