

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE
Candida albicans FRENTE À AÇÃO ANTIFÚNGICA
DO TIMOL**

Laís César de Vasconcelos

SAPIENTIA AEDIFICAT

2013

LAÍS CÉSAR DE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE *Candida albicans*
FRENTE À AÇÃO ANTIFÚNGICA DO TIMOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Odontologia Preventiva e Infantil.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Correia Sampaio

João Pessoa

2013

BIBLIOTECÁRIO: Edna Maria Lima da Fonseca

V331a Vasconcelos, Laís César de.

*Avaliação da viabilidade celular de Candida albicans
frente à ação antifúngica do timol / Laís César de
Vasconcelos.-- João Pessoa, 2013.*

69f. : il.

Orientador: Fabio Correia Sampaio

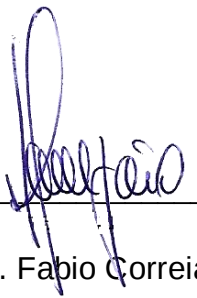
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

*1. Odontologia preventiva. 2. Odontologia infantil. 3.
Candida albicans. 4. Timol. 5. Viabilidade celular.*

LAÍS CÉSAR DE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE *Candida albicans*
FRENTE À AÇÃO ANTIFÚNGICA DO TIMOL**

Banca Examinadora



Prof. Dr. Fabio Correia Sampaio

Orientador - UFPB



Prof. Dr. Franklin Delano Soares Forte

Examinador - UFPB



Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford

Examinador - UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Laurylene, pelo compromisso com a minha formação e por acreditarem nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, acima de tudo, por abençoar a minha vida e por me dar forças para perseverar na concretização dos meus objetivos.

Aos meus pais, **Laurylene e Sergio**, pelo carinho e dedicação de sempre, pelo imenso amor que têm por mim e por toda compreensão. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Diogo**, pelo apoio e por sua preciosa amizade.

A toda minha **família**, pela força do amor que nos une.

A **Caio**, por toda paciência e carinho. Obrigada por compartilhar esse momento comigo!

Ao professor e orientador **Fabio Correia Sampaio**, um exemplo de pesquisador, por ter depositado em mim a confiança para a realização deste trabalho.

A **Allan Albuquerque**, por sua amizade, incentivo e por todas as orientações durante a efetivação desta pesquisa. O seu auxílio foi fundamental para mim. Muito obrigada!

Aos professores **Thayza Christina Montenegro Stamford, Franklin Delano Soares Forte, Jozinete Vieira Pereira e Edeltrudes de Oliveira Lima** pela disposição em participar da minha banca examinadora, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Às minhas queridas amigas, **Julyana e Priscilla**, pela grande amizade construída e pelo apoio constante.

A todos os **colegas** do curso de Mestrado, pela convivência e pelos momentos compartilhados.

Aos **professores** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, pela dedicação e por todo o conhecimento compartilhado.

À professora **Edeltrudes de Oliveira Lima**, por disponibilizar o timol utilizado neste trabalho.

Ao **Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL)**, na pessoa do professor Fabio Correia Sampaio, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

Candida albicans trata-se de um fungo comensal que habita inofensivamente nichos de várias partes do corpo humano, incluindo a cavidade oral, no entanto, sob certas circunstâncias, pode causar infecções superficiais das mucosas, como a estomatite protética, na qual um biofilme de *Candida* é formado sobre a superfície acrílica das próteses dentárias. O timol é um terpeno fenólico encontrado em diversas espécies vegetais e que possui atividade antimicrobiana frente a microrganismos orais, tal como *Candida albicans*, pois é capaz de interferir de forma significativa com a formação de biofilmes fúngicos, uma vez que inibe a atividade metabólica destes microrganismos por ação direta na membrana celular. Este estudo objetivou avaliar através de técnica de fluorescência a viabilidade celular de biofilmes de *Candida albicans* frente à ação antifúngica do timol. Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC® 11006™). A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos agentes antifúngicos (timol e miconazol) foram determinadas através de testes de microdiluição em caldo Sabouraud dextrose, sendo as drogas preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e o inóculo padronizado para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC/mL). Os biofilmes de *Candida albicans* foram cultivados sobre a superfície de discos de resina acrílica, nas células paralelas de fluxo, a partir de caldo Sabouraud suplementado com 10% de dextrose, e, após 12 horas de formação do biofilme no sistema de fluxo contínuo, foi realizada a exposição aos agentes antifúngicos, sendo avaliados períodos de 5, 15 e 30 minutos. Para contagem das unidades formadoras de colônia, a solução fúngica foi sequencialmente diluída e semeada em ágar Sabouraud dextrose. A viabilidade celular foi quantificada por fluorescência através da mistura dos corantes SYTO 9 e Iodeto de Propídio. Os valores médios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste T em nível de 5% de probabilidade. Os biofilmes tratados com o timol apresentaram, nos três tempos de exposição avaliados, baixos números percentuais de células viáveis detectadas através da técnica de fluorescência, e os valores médios dos três tempos de exposição entre miconazol e timol não diferiram estatisticamente ($p>0,05$), demonstrando que ambas as drogas possuem eficiência equivalente, levando-se em consideração suas respectivas concentrações fungicidas mínimas. Foi possível comprovar ainda que ambas as metodologias utilizadas para quantificação das células fúngicas apresentaram-se fortemente correlacionadas.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Timol, Viabilidade Celular.

ABSTRACT

Candida albicans is a yeast that lives harmlessly on various parts of the human body, including the oral cavity, however, under certain circumstances, may cause superficial infections of the mucous membranes, such as denture stomatitis, in which a biofilm of *Candida* is formed on the acrylic surface of dentures. Thymol is a phenolic terpene found in several plant species, which has antimicrobial activity against oral microorganisms such as *Candida albicans*, since it can significantly interfere with fungal biofilm formation and inhibit the metabolic activity of these microorganisms by direct action on cell membrane. This study evaluated through fluorescence technique the cell viability of *Candida albicans* biofilms under the antifungal activity of thymol. It was used strains of *Candida albicans* (ATCC® 11006™). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the antifungal drugs (miconazole and thymol) were determined by microdilution tests in Sabouraud dextrose broth. The drugs were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and the inoculum was standardized to correspond to 0.5 of McFarland's scale (10^6 UFC/mL). Biofilms of *Candida albicans* were grown, from Sabouraud broth supplemented with 10% dextrose, on the surface of acrylic resin disks in parallel flow chambers and, after 12 hours of biofilm formation in a continuous flow system, it was exposure to the antifungal agents, being evaluated periods of 5, 15 and 30 minutes. For counting of colony-forming units, the fungal solution was sequentially diluted and plated on Sabouraud dextrose agar. Cell viability was quantified by fluorescence by mixing SYTO 9 and Propidium Iodide dyes. Data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), Tukey's test and t-test at 5% probability. Biofilms treated with thymol showed, on the three incubation times evaluated, low percentage numbers of viable cells detected by fluorescence technique, and the average of the three incubation times between miconazole and thymol were not statistically different ($p > 0.05$), demonstrating that both drugs possess equivalent efficiency, taking into account their respective minimum fungicidal concentrations. It was possible to prove that both methodologies used to quantify fungal cells showed to be strongly correlated.

Keywords: *Candida albicans*, Thymol, Cell Viability.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
g/kg	Grama por quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
SM	Solução-mãe
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC/ml	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
α	Alfa
μg	Micrograma
μg/ml	Micrograma por mililitro
μl	Microlitro
%	Percentual
°C	Graus Celsius
>	Maior que
≥	Maior ou igual
<	Menor que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
™	Trade mark

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da biossíntese do ergosterol.	8
Figura 2- Estrutura química do miconazol (1-[2-(2,4-diclorobenziloxi)-2-(2,4-diclorofenil)-etil]-1H-imidazol).	9
Figura 3- Estrutura química do timol (2-isopropil-5-metilfenol).	12
Figura 4- Massa fúngica de <i>Candida albicans</i> e sobrenadante (solução salina) após a centrifugação.	19
Figura 5- Confeção dos discos de resina acrílica.	22
Figura 6- Sistema de fluxo contínuo para formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> .	24
Figura 7- Células paralelas de fluxo contínuo (FC 274-PC BioSurface Technologies Corporation, EUA) para formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> .	25
Figura 8- Remoção dos discos de resina das células de fluxo contínuo.	25
Figura 9- Inserção dos discos de resina acrílica em tubos de criogenia contendo a concentração fungicida mínima das drogas avaliadas (timol e miconazol).	26
Figura 10- Discos inseridos em tubos Falcon com solução salina.	26
Figura 11- Biofilme de <i>Candida albicans</i> disperso em sonificador (a) e homogeneizado em vórtex (b).	27
Figura 12- Diluições seriadas em 900 µl de solução salina para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro de solução fúngica.	29
Figura 13- Placa de microdiluição com a determinação da concentração inibitória mínima do timol.	31
Figura 14- Microdiluição do timol utilizando a solução-mãe padrão SM ₀ .	32
Figura 15- Subcultivo para determinação da CFM do timol. Poços 7 a 4 (a) e 3 a 1 (b).	33
Figura 16- Placa de microdiluição com a determinação da concentração inibitória mínima do miconazol.	34
Figura 17- Subcultivo para determinação da CFM do miconazol. Poços 10 a 7 (a), 6 a 3 (b) e 1 e 2 (c).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema de diluição das substâncias-teste (timol e miconazol) em placas de microdiluição.	21
Tabela 2- Microdiluição utilizando a solução-mãe padrão (SM ₀) do timol.	32
Tabela 3- Percentual dos valores médios de viabilidade celular e desvio padrão dos controles e das drogas testadas (timol e miconazol) em relação aos tempos de exposição nas respectivas concentrações fungicidas mínimas.	37
Tabela 4- Contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro de solução fúngica (UFC/ml x 10 ⁻¹).	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Percentual dos valores médios de viabilidade celular e desvio padrão dos controles e das drogas testadas (timol e miconazol) em relação aos tempos de exposição nas respectivas concentrações fungicidas mínimas. 38
- Gráfico 2-** Correlação entre os valores de viabilidade celular obtidos por fluorescência e pela contagem das UFC/ml. 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 <i>Candida albicans</i>	3
2.1.1 Biofilmes de <i>Candida albicans</i>	4
2.1.2 Inibição de <i>Candida</i> das superfícies das próteses dentárias	5
2.2 Agentes antifúngicos	6
2.2.1 Alvos da ação antifúngica	7
2.2.2 Miconazol	9
2.2.3 Timol	11
2.3 Viabilidade celular	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Delineamento do estudo	18
4.2 Local da pesquisa	18
4.3 Agentes antifúngicos	18
4.4 Meios de cultivo	18
4.5 Cepas fúngicas	18
4.6 Procedimentos da pesquisa	19
4.6.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima	19
4.6.1.1 Preparo do inóculo	19
4.6.1.2 Preparo das soluções-mãe (SM)	20
4.6.1.3 Preparo das placas de microdiluição	20
4.6.1.4 Leitura visual das placas de microdiluição	21
4.6.2 Confecção dos discos de resina acrílica	22
4.6.3 Formação do biofilme fúngico na célula de fluxo	23
4.6.3.1 Esterilização do sistema	23
4.6.3.2 Formação do biofilme	23

4.6.3.3 Quantificação da viabilidade celular por fluorescência	29
4.7 Análise dos dados	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Concentrações Inibitórias Mínimas e Concentrações Fungicidas Mínimas	31
5.2 Quantificação celular	36
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

A microbiota bucal é uma das mais variadas do corpo humano e tende a permanecer íntegra ao hospedeiro quando preservado o equilíbrio entre a resistência e os fatores que determinam a virulência dos microrganismos. A quebra deste equilíbrio por parte de microrganismos, como os fungos, contra o hospedeiro pode desta forma, proporcionar uma agressão, dando origem a processos infecciosos como a candidose (MARSH, 2010).

Candida é um dos patógenos oportunistas humanos mais comuns e se trata de um fungo comensal que habita inofensivamente várias partes do corpo humano, no entanto, sob certas circunstâncias, *Candida* pode causar infecção superficial das mucosas ou contribuir no agravamento de doenças sistêmicas (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *Candida* é a sua versatilidade de adaptação a diferentes habitats para crescimento e formação de comunidades microbianas, constituindo biofilmes (COSTERTON et al., 1995).

A aderência de *Candida albicans* às várias superfícies biológicas, ou não, é considerada um pré-requisito para a colonização e patogenicidade deste fungo, sendo as forças eletrostáticas e germinações importantes no processo de adesão de *Candida* aos biomateriais, como aqueles utilizados na confecção das próteses dentárias (MAZA et al., 2002). A formação do biofilme de *Candida albicans* tem sido descrito como um processo que começa com a adesão a um substrato, seguido pela proliferação das células da levedura em toda a superfície desse substrato e do início do desenvolvimento de hifas (CHANDRA et al., 2001). O passo final de desenvolvimento do biofilme é a fase de maturação, em que o crescimento das hifas é elevado e a matriz extracelular envolve o biofilme (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

As infecções superficiais de *Candida* associadas a certos dispositivos são encontrados com frequência, como a estomatite protética, na qual um biofilme de *Candida* pode ser formado sobre a superfície acrílica das próteses dentárias (DOUGLAS, 2003). Uma das principais consequências do crescimento fúngico em biofilmes é o aumento da resistência à terapia antimicrobiana, que é a razão pela qual infecções associadas à formação de biofilmes são frequentemente refratárias à antibioticoterapia convencional (RAMAGE et al., 2001a; HE et al., 2007).

Os mecanismos de resistência de um biofilme aos agentes antimicrobianos ainda não são completamente compreendidos, mas podem incluir: dificuldade de penetração das drogas através da matriz do biofilme; alterações fenotípicas resultantes da limitação de nutrientes; e expressão de genes de resistência. Estes mecanismos podem operar concomitantemente, e variar de acordo com os microrganismos presentes no biofilme e com a natureza do agente antimicrobiano (MAH; O'TOOLE, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002).

O miconazol é um derivado imidazol sintético que possui uma rápida ação fungicida quando usado topicamente contra uma grande variedade de leveduras e dermatófitos (BARASCH; GRIFFIN, 2008). Em relação aos efeitos colaterais deste antifúngico, são descritas reações adversas, tais como desconfortos gastro-intestinais (náuseas, vômitos e diarreias) e reações alérgicas (VASCONCELOS et al., 2003). Além disso, sabe-se que as infecções fúngicas podem tornar-se de difícil tratamento, fato relacionado à aquisição pelos agentes etiológicos de resistência frente a estes antifúngicos tradicionalmente utilizados (ARAÚJO et al., 2004). Desta forma, novos agentes devem ser constantemente desenvolvidos e testados frente a microrganismos patogênicos (BARASCH; GRIFFIN, 2008).

O timol, também conhecido como ácido tímico, é um monoterpeno fenólico encontrado como componente majoritário em diversas espécies vegetais a exemplo de *Thymus*, particularmente *T. vulgaris* L., e é reconhecido por possuir uma série de propriedades farmacológicas, incluindo ação antimicrobiana frente a bactérias orais e também por demonstrar atividade antifúngica, a qual pode envolver efeitos sobre a membrana celular (SÁNCHEZ et al. 2004). Estudos têm mostrado que óleos essenciais contendo timol são amplamente utilizados devido às suas propriedades antimicrobianas e desinfetantes e por atuar também como aditivos antibacterianos em alimentos (BURT et al., 2007). Notavelmente, o timol também tem sido utilizado com sucesso em estudos *in vitro* contra fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus* e *C. albicans* (GIORDANI et al., 2004).

Este estudo objetivou, portanto, avaliar através de técnica de fluorescência a viabilidade celular de biofilmes de *Candida albicans*, cultivados em um sistema de fluxo contínuo, frente à ação antifúngica do timol.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A homeostase é uma característica da microbiota oral entre indivíduos saudáveis e, nesta condição, os microrganismos são capazes de coabitar em saprofitismo nos diferentes habitats da boca, numa dependência direta do pH, dos nutrientes e da superfície mucosa. A microbiota residente contribui para a saúde do hospedeiro por prevenir o estabelecimento de microrganismos exógenos e potencialmente patógenos, no entanto, distúrbios desta microbiota podem resultar no maior crescimento de outros microrganismos bucais como os fungos (MARSH, 2010).

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um importante agente patogênico dos seres humanos. Um fator crucial para isto é a sua capacidade e versatilidade de sobreviver como um microrganismo comensal em locais anatomicamente distintos. Esta capacidade significa que o espectro de doenças causadas por *C. albicans* é superior ao da maioria dos outros microrganismos comensais. À semelhança de outros patógenos, a virulência de *C. albicans* inclui o reconhecimento e ligação com proteínas celulares das células hospedeiras, e ainda, ligação com microrganismos competidores (co-agregação). Intuitivamente, a invasão de *C. albicans* aos tecidos é facilitada por meio da transição entre células na forma de levedura e o crescimento filamentoso. A morfogênese refere-se à transição entre as células leveduriformes unicelulares a uma forma de crescimento filamentosa, quer seja através do crescimento de hifas como de pseudohifas. De todas as espécies de *Candida*, apenas *C. albicans* e *Candida dubliniensis* apresentam ambos os tipos de crescimento filamentoso. Assim, estas espécies são capazes de crescer isotropicamente (levedura) ou apicalmente (hifas e pseudohifas), e são mais propriamente definidas como polimórficas em seus padrões de crescimento (CALDERONI; FONZI; 2001).

A alteração de forma representa uma resposta ou condição adaptativa do fungo para sobreviver em condições biológicas diversificadas como

temperatura e pH (ÁLVARES; SVLDZLNSKI; CONSOLARO, 2007). Segundo Kuleta, Kozik e Kozik (2009), as mudanças fenotípicas da *C. albicans* são condições importantes, principalmente, no processo de invasão ao hospedeiro tornando o fungo mais virulento durante os processos infecciosos.

Para Grassi e Hammerle (1994), a multiplicação deste fungo por brotamento é semelhante a uma fermentação e se caracteriza pela existência de células filhas que se desligam da célula matriz por garroteamento. Já a forma de hifa representa uma verdadeira divisão celular e a formação de células filhas ocorre a partir de divisão nuclear e formação de paredes longitudinais. As formações filiformes resultantes deste processo são chamadas micelos. *Candida albicans* na forma de micelos é capaz de invadir pele e mucosas, e um grande número de hifas num preparo microscópico indica um processo patológico.

2.1.1 Biofilmes de *Candida albicans*

Os biofilmes são comunidades microbianas que se formam nas superfícies e são incorporados em uma matriz extracelular. Estes biofilmes podem ser encontrados aderidos ao tecido vivo ou a superfícies de diferentes materiais (FINKEL; MITCHELL, 2011). Muitas infecções resultam de biofilmes patogênicos e, portanto, o significado biomédico destes é substancial (HASAN et al., 2009).

Candida albicans forma biofilmes patogênicos que são evocados por mudanças na imunidade do hospedeiro ou na ecologia do ambiente oral (GANGULY; MITCHELL, 2011). Dentre os microrganismos que habitam a boca, *Candida albicans* merece especial atenção pela sua prevalência, com forte representatividade em associações a próteses dentárias (FALCÃO; SANTOS; SAMPAIO, 2004). As interações entre a microbiota oral e *Candida albicans* são importantes na formação do biofilme fúngico da prótese. Entre os fatores de virulência de *Candida albicans*, tais como aderência, interferência com o sistema de defesa do hospedeiro, sinergismo com bactérias e a produção de hidrolases ou de metabólitos, os considerados de maior importância são a aderência e a persistência (NIKAWA et al., 2001).

Biofilmes de *Candida albicans* em superfícies abióticas são constituídos por dois tipos celulares: células leveduriformes e células filamentosas. *In vitro*, a camada basal do biofilme é composta de leveduras, das quais emanam as células filamentosas que são também incorporadas numa densa camada de matriz extracelular, cujo componente primário é o betaglucano (FINKEL; MITCHELL, 2011; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006; NETT et al., 2007) *In vivo*, a arquitetura do biofilme é mais complexa, com células filamentosas e leveduriformes intercaladas, e a matriz apresentará ainda células de defesa como os neutrófilos (ANDES et al., 2004).

Muitas doenças provocadas por *Candida albicans* envolvem o crescimento destes fungos em biofilmes. Estas infecções têm um grande impacto na saúde pública, porque os microrganismos organizados em biofilmes apresentam uma susceptibilidade drasticamente reduzida a terapias antifúngicas convencionais (NETT; ANDES, 2006). A comprovação da resistência dos microrganismos é de grande importância na terapêutica antifúngica, bem como na pesquisa de novas substâncias que atuem no combate ao desenvolvimento desses microrganismos ou no tratamento das patologias causadas por fungos (CANDIDO et al., 1996).

2.1.2. Inibição de *Candida* das superfícies de próteses dentárias

A superfície interna de próteses totais e parciais removíveis apresenta irregularidades e microporosidades que facilitam a colonização e a penetração de bactérias e fungos na base de resina acrílica (SESMA et al., 2005). *Candida* pode ser cultivada em meios adequados a partir de esfregaços do palato ou da prótese e o diagnóstico confiável de infecção é dado pelo considerável crescimento de fungos na superfície de encaixe dessas próteses. Em estudo realizado por Vasconcelos et al. (2010), os autores observaram que dentre os casos diagnosticados como infecção, as culturas da superfície da prótese mostraram um alto número de colônias de *Candida* (50% com valores $\geq$ a 100 colônias) em relação às culturas da mucosa (16,7% com valores $\geq$ a 100 colônias), ficando demonstrado que a prótese pode realmente funcionar como um reservatório para a colonização e crescimento de fungos.

Alguns procedimentos têm sido recomendados para prevenir a formação de biofilme em próteses, usando agentes antimicrobianos como a clorexidina e os hipocloritos. Apesar da alta eficiência, o uso prolongado desses agentes pode levar à colonização de organismos mais resistentes, alteração de cor da resina ou danos ao metal de próteses removíveis (NIKAWA et al., 1999). Outros métodos também têm sido usados para remover o biofilme: meios mecânicos, como a escovação, e soluções químicas para imersão da prótese (JAGGER et al., 2002).

Na limpeza das próteses, o agente químico ideal deve ser efetivo na remoção de depósitos orgânicos e inorgânicos, além de possuir propriedades bactericidas e fungicidas. Além disso, é importante que o produto seja compatível com os materiais utilizados para confecção das próteses e de baixo custo. Os peróxidos e hipocloritos são os agentes químicos de limpeza mais comuns, no entanto, estas soluções podem promover deterioração da superfície das próteses (NUÑEZ et al., 2008).

Torna-se oportuno, assim, a pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico e antibacteriano, que possam ser utilizadas na supressão de espécies de *Candida* e outros microrganismos da superfície de próteses dentárias.

2.2 Agentes Antifúngicos

Segundo Stein (2005), um agente antifúngico ideal deve apresentar as seguintes propriedades: alta atividade antifúngica, amplo espectro de ação, ação fungicida, relutância em induzir resistência e apresentar baixa toxicidade. No entanto, apesar dos grandes avanços da ciência, atualmente nenhum agente antifúngico disponível satisfaz todos estes requisitos, sendo cada vez mais oportuno avaliar os mecanismos de ação e a susceptibilidade de diferentes microrganismos frente às drogas antifúngicas.

2.2.1 Alvos da ação antifúngica

Um agente antifúngico considerado eficaz deve apresentar baixa toxicidade para o hospedeiro e agir com máxima especificidade nas células fúngicas, nas quais, os alvos de atuação devem ser necessariamente essenciais para o crescimento e a viabilidade celular. Desta forma, duas estruturas celulares fúngicas são consideradas importantes alvos de ação antifúngica: a parede celular e a membrana plasmática (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

A parede celular é uma estrutura dinâmica, ausente nas células de mamíferos, e cuja complexa estrutura tem a função de proporcionar à célula fúngica resistência mecânica suficiente para resistir a alterações de pressão osmótica, além de permitir a plasticidade adequada para favorecer o crescimento e a divisão celular, e de manter a forma e a integridade das células fúngicas (BOWMAN; FREE, 2006). A constituição da parede celular é de aproximadamente 80 a 90% de hidratos de carbono (tais como glicanos, quitina, mananos, quitosana, ácido poliglicurônico ou celulose), contendo ainda cerca de 6 a 25% de proteínas e 1 a 7% de lipídios (CHAFFIN et al., 1998).

A membrana citoplasmática dos fungos atua como uma barreira semipermeável no transporte ativo e passivo de substâncias na célula. É quimicamente constituída na sua maior parte por lipídios e proteínas, podendo ambos estar ligados a açúcares. As membranas plasmáticas estão inseridas num modelo denominado mosaico-fluido, o qual consiste numa bicamada lipídica intercalada por proteínas globulares transmembranares e ainda constituídas por proteínas globulares extrínsecas e intrínsecas à membrana. Uma membrana fúngica típica possui em sua constituição lipídios do tipo fosfolipídios, glicolipídios e esteróis. O esterol predominante nas leveduras é o ergosterol, análogo ao colesterol nas células dos animais, e que contribui para as diversas funções celulares, sendo importante para a integridade e a fluidez membranar, permitindo que muitas das enzimas da membrana possam exercer corretamente a sua função, as quais incluem a síntese de quitina, importante para a divisão e o crescimento celular (CZUB; BAGINSKI, 2006).

De acordo com Dupont et al. (2012), os principais esteróis são representados por três formas predominantes: colesterol em animais vertebrados, fitosteróis (sitosterol, estigmasterol, campesterol) em plantas e ergosterol em fungos. Cada um destes esteróis é o produto final de uma longa via biossintética que deriva de precursores iniciais comuns (acetil-CoA a esqualeno epóxido). O esqualeno é ciclizado para a formação do lanosterol, o qual sofre várias reações bioquímicas de desmetilação (através da enzima 14- α -desmetilase) até originar, nos fungos, o ergosterol (Figura 1).

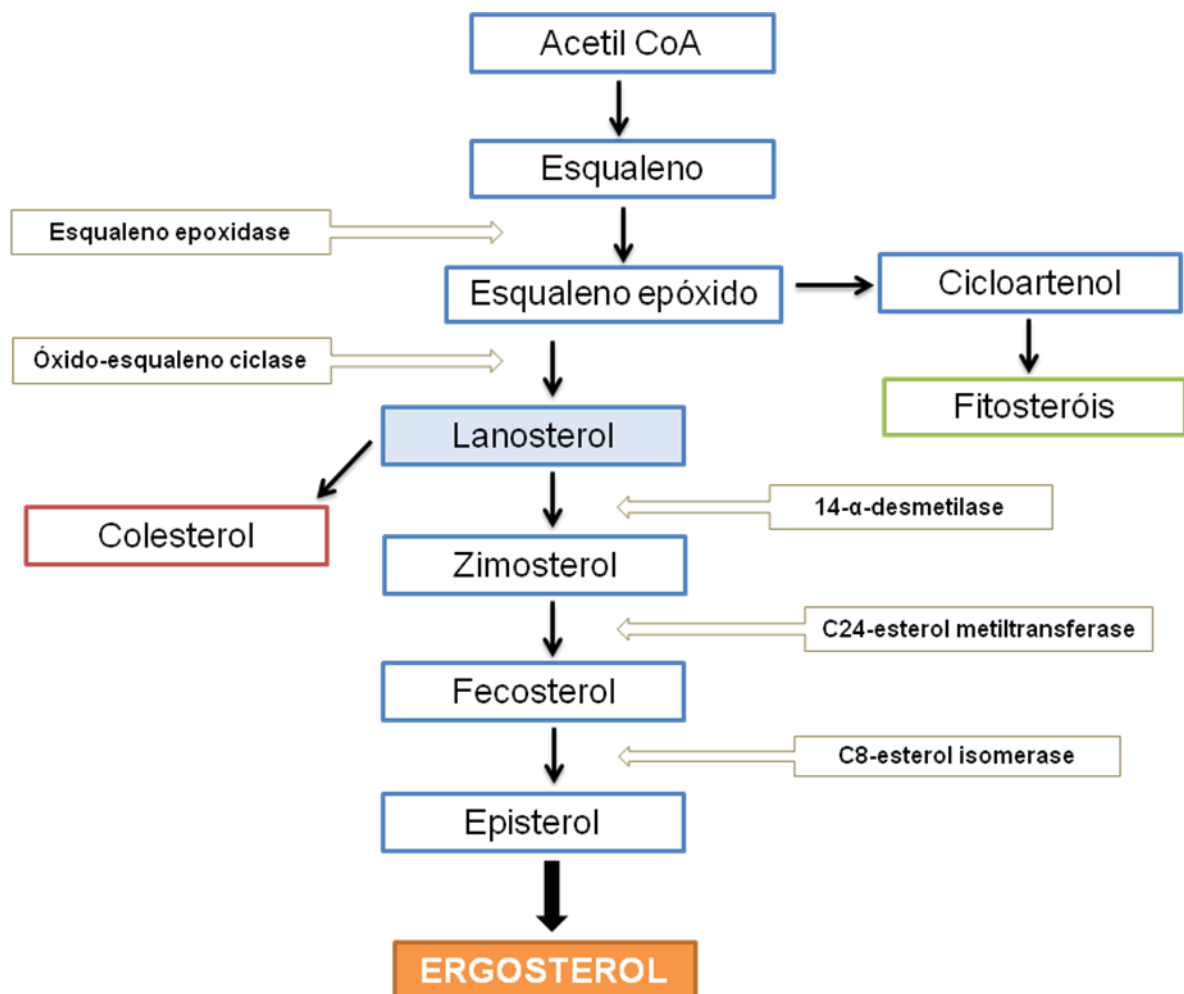


Figura 1- Esquema da biossíntese do ergosterol. Fonte: Adaptado de Dupont et al. (2012) e Pereira (2012).

2.2.2 Miconazol

Descoberto na década de 1960, os antifúngicos azólicos compõem um grande grupo de compostos sintéticos que exibem atividade contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo fungos, parasitas e bactérias. Dependendo do número de moléculas de nitrogênio no anel azólico, os antifúngicos azólicos são classificados em imidazólicos ou triazólicos. Os imidazóis possuem duas moléculas de nitrogênio e têm sido historicamente utilizados para tratar doenças superficiais. O miconazol (cuja estrutura química está representada na Figura 2) é um exemplo de agente antifúngico imidazólico. Os triazóis, a exemplo do fluconazol e do itraconazol, possuem três moléculas de nitrogênio e são conhecidos por apresentar um amplo espectro de atividade contra fungos que causam doenças sistêmicas ou disseminadas (FOTHERGILL, 2006).

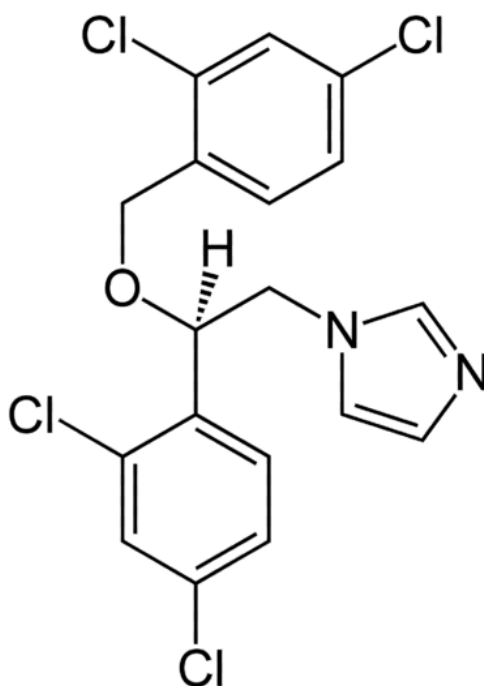


Figura 2- Estrutura química do miconazol (1-[2-(2,4-diclorobenziloxi)-2-(2,4-diclorofenil)-etil]-1H-imidazol). Fonte: TSUTSUMI et al. (2011).

De acordo com Mahmoudabadi e Drucker (2006), os antifúngicos azólicos interagem diretamente com os lipídios da membrana fúngica, sem necessariamente se ligar a eles, ou seja, a interação com os fosfolipídios e ácidos graxos das membranas celulares provoca o vazamento de proteínas e aminoácidos, levando a uma desorganização da camada lipídica. Segundo

Fothergill (2006), o miconazol possui atividade contra diversas espécies de microrganismos, incluindo *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pseudallescheria boydii*, *Trichosporon* spp. e *Candida* spp., e é usado principalmente como um agente tópico para o tratamento de dermatomicoses e candidídeos. Ainda segundo os autores, em altas concentrações, o miconazol causa tanto danos diretos à membrana como inibição do alongamento das hifas. A capacidade de desenvolver hifas é um importante fator de virulência dos fungos.

Para Vandenbosch et al. (2010), os antifúngicos azólicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., pois estes compostos inibem a enzima 14- α -desmetilase (a qual catalisa a remoção oxidativa do grupo 14- α -metil do lanosterol), uma enzima crucial na via de biossíntese do ergosterol. Desta forma, a diminuição resultante nos níveis de ergosterol e o acúmulo de intermediários esteróis tóxicos na membrana citoplasmática conduzem à inibição do crescimento celular.

Pesquisas recentes têm mostrado que a atividade fungicida do miconazol frente a células de *C. albicans* também está relacionada com a indução de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas químicas instáveis e extremamente reativas formadas após a redução de uma pequena parte do oxigênio utilizado na produção mitocondrial de energia para o metabolismo celular, e que podem provocar injúria tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Embora o mecanismo exato deste acúmulo de ERO não seja completamente compreendido, a inibição combinada da catalase e da peroxidase, enzimas envolvidas na defesa antioxidante das células, parece estar envolvida (FRANÇOIS et al., 2006).

Conforme relatado no estudo de Gourlay e Ayscough (2005), o miconazol também induz alterações no citoesqueleto de actina das células fúngicas, levando a uma estabilidade aumentada deste filamento, o que gera consequentemente, uma menor dinâmica de remodelação do citoesqueleto celular frente a estímulos agressivos. Assim, quando ocorre um estresse oxidativo mitocondrial, resultante do aumento da formação de ERO, haverá a formação de marcadores de apoptose, culminando na morte celular. Para Thevissen et al.

(2007), isto ocorre porque, diferentemente do que acontece em condições normais, não será possível o acoplamento das mitocôndrias ao citoesqueleto de actina e a formação de canais por onde ocorre a liberação das ERO no citoplasma.

Vandenbosh et al. (2010), avaliaram a atividade fungicida do miconazol frente à biofilmes maduros de diferentes espécies de *Candida* crescidos *in vitro*, e sua relação com a indução de ERO. O efeito do miconazol foi avaliado através do plaqueamento e contagem das colônias fúngicas e da medição do nível de indução de ERO. Para isto, ensaios de concentração inibitória mínima foram realizados na ausência e na presença do ácido ascórbico, um supressor de ERO. Segundo os autores, os níveis de ERO aumentaram em todos os biofilmes de *Candida* após a adição do miconazol, no entanto, a indução ERO não foi o único fator que fundamentou a atividade fungicida da droga, pois, com a inibição das ERO pelo ácido ascórbico, não houve um aumento na sobrevivência das células do biofilme de *Candida*.

Para Georgopapadakou (1998), apesar da sua abundância de utilização, pouca resistência adquirida ou inata dos antifúngicos azólicos, tais como o miconazol, são relatadas na literatura. No entanto, conforme Fothergill (2006), como os fatores responsáveis pelo desenvolvimento de resistência dos microrganismos a uma droga incluem a duração e o nível de exposição, bem como a taxa de crescimento do organismo, é válido, portanto, o estudo de demais substâncias que apresentem atividade antimicrobiana.

2.2.3 Timol

Os terpenos, largamente distribuídos na natureza, se referem a compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, originados a partir da condensação de unidades do hidrocarboneto isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Os terpenos são classificados de acordo com as unidades de átomos de carbono em hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Um terpeno que contém oxigênio em sua fórmula é chamado terpenóide. Os monoterpenos são formados

a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno e são as moléculas mais representativas desta classe, permitindo uma grande variedade estrutural de compostos (BAKKALI et al., 2008). Terpenos podem ser encontrados como componentes de muitos óleos essenciais utilizados extensivamente como fragrâncias, aromatizante alimentares, e também como substâncias ativas em alguns fármacos (GOMES-CARNEIRO; FELZENSZWALB; PAUMGARTTEN, 1998).

O timol (Figura 3) é um composto classificado no grupo de monoterpenos, e apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou pó cristalino branco, com aroma forte. A partir da análise da sua estrutura química, pode-se inferir que, do ponto de vista biofísico, este composto pode ter um comportamento anfipático e/ ou hidrófobo. Isto sugere a capacidade do timol de afetar a organização membranar e a eletrostática de superfície celular. Esta suposição pode explicar os efeitos do timol sobre a permeabilidade das membranas e sobre a atividade de proteínas intrínsecas, tais como ATPases ou receptores de membrana (SÁNCHEZ et al., 2004).

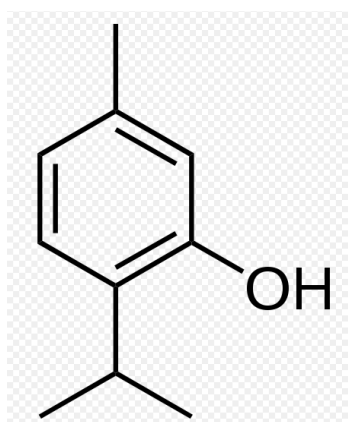


Figura 3- Estrutura química do timol (2-isopropil-5-metilfenol). Fonte: BAKKALI et al. (2008).

Os óleos essenciais de muitas plantas aromáticas têm efeitos antifúngicos. Estes óleos são misturas muito complexas de vários componentes (terpenos, aldeídos, ésteres, álcoois acíclicos, etc), com diferentes quimiotipos. A atividade anti-*Candida* de diversos constituintes dos óleos essenciais, tais como o timol, o carvacrol e o eugenol, está bem estabelecida na literatura, sendo creditada ao timol uma série de propriedades farmacológicas incluindo efeitos antimicrobianos e antifúngicos (PAULI, 2006). A fonte natural usual do timol é o

óleo essencial obtido a partir de espécies vegetais, como *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), podendo também ser constituinte de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. A principal aplicação terapêutica do timol é em preparações orais para suprimir a atividade bacteriana e fúngica, sendo também empregue como conservante e antioxidante (PRIESTLEY et al., 2003). Para Omram e Esmailzadeh (2009), o óleo essencial obtido a partir de *Thymus vulgaris* L. pode ser utilizado no controle e tratamento de candidoses. Os autores avaliaram a atividade anti-*Candida* do tomilho (*Thymus vulgaris* L.), do poejo (*Mentha pulegium* L.) e do limão (*Citrus aurantifolia* Christm.) sobre diferentes espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, e verificaram que óleo essencial de tomilho teve o maior efeito inibitório contra as diferentes espécies de *Candida*.

De acordo com Braga et al. (2007), o timol, um dos principais componentes do óleo essencial de tomilho, é capaz de alterar a adesão de *C. albicans* às células mucosas humanas por prejudicar a formação e a viabilidade das hifas. Além disso, Braga et al. (2008), sugerem que o timol pode interferir de forma significativa, não só com as primeiras fases de formação do biofilme fúngico, mas também com biofilmes maduros, uma vez que também inibe a atividade metabólica de *Candida*.

Para Pina-Vaz et al. (2004), o efeito fungicida dos componentes majoritários de espécies de *Thymus*, entre eles o timol, resulta principalmente de danos diretos à membrana da célula e tal efeito está relacionado com a natureza bioquímica dos compostos - monoterpenos - que muito provavelmente funcionam como solventes da membrana celular. Ahmad et al. (2011), consideram que o efeito antifúngico de monoterpenos, tais como o timol e o carvacrol, são atribuídos à sua capacidade em inibir a biossíntese do ergosterol e tornar a membrana citoplasmática porosa. Para os autores, é ponderada a hipótese de que estes compostos lipofílicos penetram na célula e atuam na via de formação do ergosterol, e assim, prejudicam a sua biossíntese. Porém, ao mesmo tempo, estes compostos também são capazes de reagir com a própria membrana por meio do seu radical hidroxila (através de ligações de pontes de hidrogênio) causando ruptura da integridade membranar, e tornando assim, a extensão da lesão na membrana um efeito combinado dos dois acontecimentos.

A enzima H^+ ATPase é considerada um novo alvo antifúngico promissor. Refere-se a uma proteína de membrana da família das ATPases, responsável pela translocação de íons. Este enzima desempenha um papel crucial na fisiologia da célula fúngica, uma vez que mantém o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana celular, regula o pH intracelular e o crescimento celular (MANZOOR; AMIN; KHAN, 2002). Ahmad et al. (2010) avaliaram a atividade da H^+ ATPase e correlacionaram com o pH intracelular de *Candida* na presença de dois fenóis naturais, o eugenol e o timol. Os autores observaram que o efeito dos compostos foi rápido e letal, sendo possível sugerir que ambos tenham interagido diretamente com a enzima, a qual funcionou como um alvo específico na superfície celular para a atuação do agente antifúngico, uma vez que as cepas tratadas mostraram aumento da acidificação interna (o que resulta em uma diminuição da viabilidade das células fúngicas), sendo a diminuição do pH intracelular ainda mais significativa nas células expostas ao timol, em comparação com o eugenol.

De acordo com Ahmad, Khan e Mazoor (2013), o mecanismo molecular da resistência de *Candida* aos antifúngicos azólicos inclui a sobre-expressão de bombas de efluxo de drogas, além de mutações e sobre-expressão de genes que codificam as proteínas alvo dos azóis. A sobre-expressão dos genes de bombas de efluxo MDR1, FLU1, CDR1 e CDR2 e alterações genéticas no gene ERG11 (responsável por codificar a enzima 14- α -desmetilase) são os principais mecanismos de resistência de *Candida* aos medicamentos azólicos. Portanto, a inibição de bombas de efluxo pode ser uma alternativa para reverter os mecanismos de resistência aos antifúngicos. Desta forma, os autores avaliaram o efeito sinérgico de dois monoterpenos (timol e carvacrol) com o fluconazol para estimar possíveis alterações na resistência ao antifúngico azólico. Ficou demonstrado que ambos os monoterpenos inibiram as bombas de efluxo em 70-90% e diferenças significativas na expressão de CDR1 e MDR1, induzidas pelos monoterpenos, revelou redução na resistência ao fluconazol. Assim, o timol e carvacrol exibiram a capacidade de aumentar a eficácia de fluconazol através da quimio-sensibilização das células fúngicas à droga e por diminuir o efluxo do agente antifúngico, podendo, portanto, ser utilizados na terapia antifúngica como drogas isoladas ou em combinação com medicamentos convencionais.

Conforme Botelho et al. (2007), vários compostos derivados de plantas são comumente avaliados quanto aos seus efeitos antimicrobianos contra microrganismos patogênicos. *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae), popularmente conhecida como "alecrim pimenta" é um arbusto tipicamente encontrado no Nordeste do Brasil e, como as folhas de *L. sidoides* são amplamente utilizadas na medicina popular, os autores supracitados realizaram estudo com o objetivo de avaliar a composição e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides*. Foi demonstrado que os principais constituintes do óleo são o timol (56,7%) e o carvacrol (16,7%), e a atividade antimicrobiana destes componentes foi então testada contra espécies de bactérias cariogênicas do gênero *Streptococcus*, bem como *Candida albicans*, através de diluição em caldo e difusão em disco. O óleo essencial e seus principais componentes (timol e carvacrol) exibiram potente atividade antimicrobiana contra os organismos testados, sendo que os mais sensíveis foram *C. albicans* e *Streptococcus mutans*. Os autores sugerem que o óleo essencial de *L. sidoides* e seus principais componentes têm potentes efeitos antimicrobianos contra patógenos orais e sugerem a sua utilização no combate ao crescimento de microrganismos orais.

Fontenelle et al. (2007) realizaram pesquisa com o objetivo testar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. contra *Candida* spp., avaliar *in vivo* os seus efeitos toxicológicos, e determinar os seus principais constituintes químicos. Para isto, a atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão em ágar e microdiluição de caldo. Os efeitos toxicológicos agudos e subcrônicos foram determinados em ratos; e a composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Foi observado que o óleo essencial obtido a partir de *L. sidoides* foi eficaz contra todas as cepas testadas e os seus principais constituintes foram timol (59,65%), o e-cariofileno (10,60%) e o p-cimeno (9,08%). A administração do óleo essencial (3g/kg) por via oral foi desprovida de toxicidade evidente, não induzindo quaisquer alterações histopatológicas, hematológicas, sorológicas ou bioquímicas importantes. Segundo os autores, o óleo essencial de *L. sidoides*, e o seu constituinte majoritário, o timol, pode ser uma fonte promissora na busca de novas drogas antifúngicas, devido à sua eficácia e baixa toxicidade.

2.3 Viabilidade celular

O kit de viabilidade celular LIVE/DEAD® BacLight™ é composto por dois corantes fluorescentes, o SYTO-9 e o iodeto de propídio. O SYTO-9 é um corante de ácido nucleico verde-fluorescente, que geralmente rotula ambos os microrganismos vivos e mortos. Em contraste, o iodeto de propídio é um corante de ácido nucleico vermelho-fluorescente, por vezes visto como alaranjado, que penetra apenas nas células com membranas danificadas, desloca o SYTO-9 (por ter maior afinidade pelo DNA) e permite a identificação dos microrganismos mortos. O uso combinado desses corantes, baseado na integridade da membrana, não é afetado pelo metabolismo celular, sendo, portanto, mais adequado para testes de viabilidade em biofilmes (ALAKOMI et al., 2005).

Filoché et al. (2007) quantificaram a biomassa bacteriana viável em um modelo de biofilme após a utilização de agentes antimicrobianos. Para tanto, as células bacterianas foram coradas em placas de microtitulação com corantes fluorescentes dicromáticos (LIVE/DEAD® BacLight™). A proporção da biomassa viável foi calculada a partir da relação entre microrganismos viáveis (fluorescência verde) e não viáveis (fluorescência vermelha) em comparação com o grupo controle. Os dados de emissão de fluorescência foram coletados utilizando um leitor de placas de microdiluição (FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha).

Com o objetivo de analisar a viabilidade celular em biofilmes de *Candida albicans*, Jin et al. (2005) utilizaram o kit de viabilidade celular LIVE/DEAD® BacLight™, comumente empregado para analisar a viabilidade bacteriana. Estudos pilotos foram, portanto, realizados previamente para validar a utilização deste kit em leveduras (uma vez que os corantes fluorescentes do kit só tinham sido utilizados até então para a coloração de células bacterianas), sendo observado que os corantes foram também capazes de diferenciar bem as células vivas e mortas de *Candida albicans*. Os autores quantificaram, desta forma, as células viáveis e não viáveis de acordo com a sua distinta emissão de fluorescência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar através de técnica de fluorescência a viabilidade celular de biofilmes de *Candida albicans*, cultivados em um sistema de fluxo contínuo, frente à ação antifúngica do timol.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do timol (Sigma-Aldrich®) sobre cepas padronizadas de *Candida albicans*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do miconazol (Sigma-Aldrich®) sobre cepas padronizadas de *Candida albicans*;
- Avaliar comparativamente a supressão fúngica do biofilme de *Candida albicans* formado em sistema de fluxo contínuo sobre a superfície de corpos-de-prova de resina acrílica, frente à ação antifúngica do timol e do miconazol.
- Correlacionar as metodologias utilizadas para quantificação das células fúngicas (contagem por plaqueamento das UFC/ml e a quantificação celular por fluorescência).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de uma pesquisa laboratorial, de natureza básica e de caráter transversal e prospectivo. O estudo teve enfoque experimental, quantitativo e qualitativo. Esta pesquisa foi desenvolvida no período de outubro de 2012 a setembro de 2013.

4.2 Local da pesquisa

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I – Castelo Branco III, João Pessoa/PB.

4.3 Agentes antifúngicos

Os fármacos antifúngicos (timol e miconazol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Brasil). As soluções foram preparadas no momento da execução dos testes, dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10%.

4.4 Meios de cultivo

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ágar Sabouraud dextrose e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose adquiridos da HIMEDIA®. Os meios de cultura foram solubilizados com água deionizada e esterilizados em autoclave.

4.5 Cepas fúngicas

Foram utilizadas para compor universo e amostra cepas padronizadas da *American Type Culture Collection* de fungos *Candida albicans* (ATCC® 11006™).

4.6 Procedimentos da Pesquisa

4.6.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos agentes antifúngicos (timol e miconazol) foram determinadas através de testes de microdiluição.

4.6.1.1 Preparo do Inóculo

Após 48h de cultivo do microrganismo em meio caldo Sabouraud dextrose, o inóculo fúngico foi centrifugado por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado (Figura 4) e acrescentou-se ao tubo Falcon 240µl de solução salina. O inóculo foi então levado para estufa por 1 hora, sendo agitado em vórtex a cada 15 minutos. Em seguida, os tubos foram levados novamente para centrifugação por 15 minutos e foi feita uma nova lavagem com 480µl de solução salina para dar início à padronização do inóculo.



Figura 4 - Massa fúngica de *Candida albicans* e sobrenadante (solução salina) após a centrifugação.

O inóculo foi padronizado através da leitura de absorbância (FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha) para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC/mL). Para a leitura da absorbância, 100µl do inóculo foram colocados em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato, com comprimento de onda de 530 nm, sendo o valor de absorbância que corresponde a 0,5 da escala de McFarland de aproximadamente 0,12 (Liu et al., 2007).

4.6.1.2 Preparo das Soluções-Mãe (SM)

Para o preparo da solução-mãe padrão (SM₀), tanto o timol (SIGMA - ALDRICH®) como o miconazol (SIGMA - ALDRICH®) foram inicialmente pesados em balança analítica de precisão dentro de tubos tipo Falcon. A proporção seguida foi de 1mg do agente antifúngico /1 ml do diluente - dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Os tubos contendo as SM₀ foram homogeneizados em vórtex e armazenados em geladeira até o uso.

O preparo das SM₁, SM₂ e SM₃ do timol e do miconazol obedeceram, respectivamente, as seguintes proporções: SM₁ = 1,5ml do meio Sabouraud dextrose/ 1,5 ml da SM₀; SM₂ = 2,5 ml do meio Sabouraud dextrose/ 0,5 ml da SM₀; e SM₃ = 4,5 ml do meio Sabouraud dextrose/ 0,5 ml da SM₀, de modo que se obtiveram soluções com diferentes concentrações dos agentes antifúngicos.

4.6.1.3 Preparo das placas de microdiluição

Todo o procedimento foi feito em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados. As placas com 96 orifícios com fundo em “U” foram preparadas de forma que cada poço tivesse um volume final de 100 µL. Nos poços foram distribuídas as soluções de forma a conter as diferentes concentrações dos produtos teste. O sistema de diluição foi controlado, portanto, pelo volume da solução-mãe utilizada de acordo com a tabela de microdiluição (Tabela 1) fornecida de forma que se obtivesse diferentes concentrações que variassem de 400µg/mL até 15µg/mL. Realizou-se ainda o controle de esterilidade do meio e o controle de crescimento do inóculo fúngico. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1- Esquema de diluição das substâncias-teste (timol e miconazol) em placas de microdiluição.

Poços		Solução Mãe	SM (μL)	Inóculo (μL)	Meio (μL)	Qtde. Extrato (μg)	Vol. Final (mL)	Conc. final (μg/mL)
A1	D1	1	80	20	-	40	0.1	400
A2	D2	1	70	20	10	35	0.1	350
A3	D3	1	60	20	20	30	0.1	300
A4	D4	1	50	20	30	25	0.1	250
A5	D5	1	40	20	40	20	0.1	200
A6	D6	1	30	20	50	15	0.1	150
A7	D7	1	20	20	60	10	0.1	100
A8	D8	2	55	20	25	9,2	0.1	91,85
A9	D9	2	50	20	30	8,4	0.1	83,5
A10	D10	2	45	20	35	7,5	0.1	75,15
A11	D11	2	40	20	40	6,7	0.1	66,8
A12	D12	2	35	20	45	5,6	0.1	58,45
B1	E1	3	50	20	30	5	0.1	50
B2	E2	3	45	20	35	4,5	0.1	45
B3	E3	3	40	20	40	4	0.1	40
B4	E4	3	35	20	45	3,5	0.1	35
B5	E5	3	30	20	50	3	0.1	30
B6	E6	3	25	20	55	2,5	0.1	25
B7	E7	3	20	20	60	2	0.1	20
B8	E8	3	15	20	65	1,5	0.1	15

(Adaptado de Andrews, 2001).

Após o preenchimento de todos os poços, as placas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 35 μL de resazurina (0,01 %, 10 mg diluída em 80 mL), misturada ao conteúdo do poço (Liu et al., 2007). As placas foram seladas com parafilme e re-incubadas por mais 1 hora antes de se fazer a leitura.

4.6.1.4 Leitura visual das placas de microdiluição

A mudança de cor nos orifícios foi interpretada como microrganismo sensível ao agente antifúngico testado. Poço com cor rosa-violáceo ou rosa indica atividade fúngica com reação química de óxido-redução da resazurina em resofurina, sendo, portanto, o último poço azul (esquerda para direita) aquele que representou a concentração inibitória mínima (CIM), interpretada como ausência

de células viáveis por inibição do crescimento celular, já que não houve mudança na coloração do corante. Esta etapa do experimento foi realizada em triplicata.

Após determinação da CIM, foram retirados 100 µL para subcultivo (em duplicata) em placas de ágar Sabouraud dextrose da concentração considerada como inibitória e das demais concentrações imediatamente mais concentradas. Após 48 horas de incubação a 37°C, foi considerada como a concentração fungicida mínima (CFM) a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível do subcultivo.

4.6.2 Confeção dos discos de resina acrílica

De modo a reproduzir o material comumente empregado na confecção da superfície palatina de uma prótese dentária, foram confeccionados, para este experimento, discos de resina acrílica, a qual foi manipulada conforme as recomendações do fabricante (VIPI Flash® VIPI, Brasil). Para tanto, foram utilizados moldes de silicone de condensação (Optosil/Xantopren®, Heraeus, Brasil) nas dimensões de 12,7 mm de diâmetro e 3,81mm de espessura, que depois de preenchidos com a resina acrílica, foram prensados com lâmina de vidro para obtenção de uma superfície com as exatas dimensões (Figura 5).

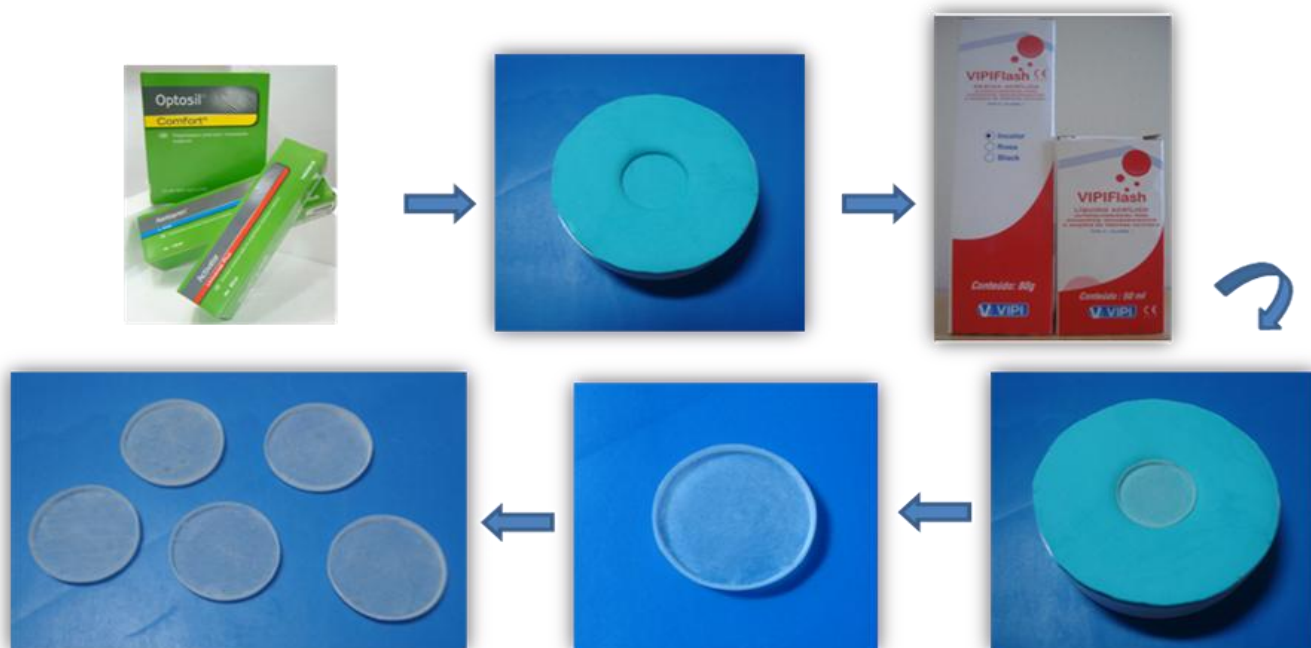


Figura 5 - Confeção dos discos de resina acrílica.

4.6.3 Formação do Biofilme Fúngico na Célula de Fluxo

Os biofilmes de culturas puras de *Candida albicans* foram cultivados a partir do caldo Sabouraud dextrose suplementado com 10% de dextrose em células paralelas de fluxo (FC 274-PC BioSurface Technologies Corporation, EUA) sobre a superfície dos discos de resina acrílica.

4.6.3.1 Esterilização do Sistema

As mangueiras de silicone, a célula paralela e as seringas de escape do sistema foram esterilizadas em autoclave, enquanto que as válvulas da seringa e as mangueiras internas da bomba peristáltica foram esterilizadas em glutaraldeído 2%.

Os discos de resina acrílica foram colocados com água deionizada em recipientes de polipropileno (autoclaváveis) e esterilizados em autoclave.

4.6.3.2 Formação do Biofilme

Inicialmente, cultivou-se em caldo Sabouraud dextrose o inóculo fúngico que foi utilizado nesta etapa do experimento, bem como foram preparados 3 litros de caldo Sabouraud dextrose e placas de ágar Sabouraud, ambos suplementados com dextrose a 10%. Antes de iniciar os procedimentos para a formação do biofilme fúngico, foram coletados 15 ml de saliva humana estimulada, a qual foi posteriormente centrifugada por 30 minutos, autoclavada, filtrada e armazenada em geladeira até o momento da sua utilização. Prepararam-se ainda as concentrações fungicidas mínimas – CFM das drogas a serem testadas e para isto, os agentes antifúngicos foram pesados e diluídos em dimetilsulfóxido a 10% de acordo com os valores das CFM determinadas previamente neste estudo.

A água deionizada dos recipientes em que os discos de resina acrílica foram autoclavados foi descartada e 1,5 ml de saliva humana esterilizada (centrifugada e autoclavada) foi adicionada a cada um dos tubos com pipeta automática para a formação da película adquirida sobre a superfície dos discos,

os quais permaneceram incubados nesta saliva por 4 horas, em temperatura ambiente, sobre mesa agitadora.

Os discos de resina acrílica foram posteriormente inseridos nas células paralelas e as mangueiras do sistema foram conectadas à bomba peristáltica e ao meio de cultura. O sistema foi mantido em estufa a uma temperatura de 37°C.

O meio de cultura sem presença do fungo foi bombeado por 5 minutos, em uma taxa de fluxo lenta (1 ml/min), para permitir a formação de um filme condicionante (película) sobre os discos. Em seguida, o fluxo foi interrompido e a solução fúngica (padronizada por espectrofotometria - FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha) foi adicionada ao meio na proporção de 3 ml de solução fúngica para 500 ml do meio (foram necessários, portanto, 18 ml de inóculo fúngico padronizado para os 3 litros de meio de cultura utilizados no sistema de fluxo). O experimento teve duração de 12 horas, e o meio de cultura juntamente com o inóculo foram mantidos sob agitação constante (Figuras 6 e 7).



Figura 6 - Sistema de fluxo contínuo para formação de biofilme de *Candida albicans*.



Figura 7 - Células paralelas de fluxo contínuo (FC 274-PC BioSurface Technologies Corporation, EUA) para formação de biofilme de *Candida albicans*.

Após o período de 12 horas a bomba peristáltica foi desligada e o fluxo interrompido. As células paralelas foram abertas e os discos de resina foram removidos (Figura 8) e inseridos em tubos de criogenia contendo a concentração fungicida mínima dos antifúngicos a serem testados (Figura 9). Solução salina foi utilizada como controle. Tanto para o timol, bem como para o miconazol, foram avaliados diferentes tempos de exposição de 5 minutos, 15 minutos e 30 minutos.

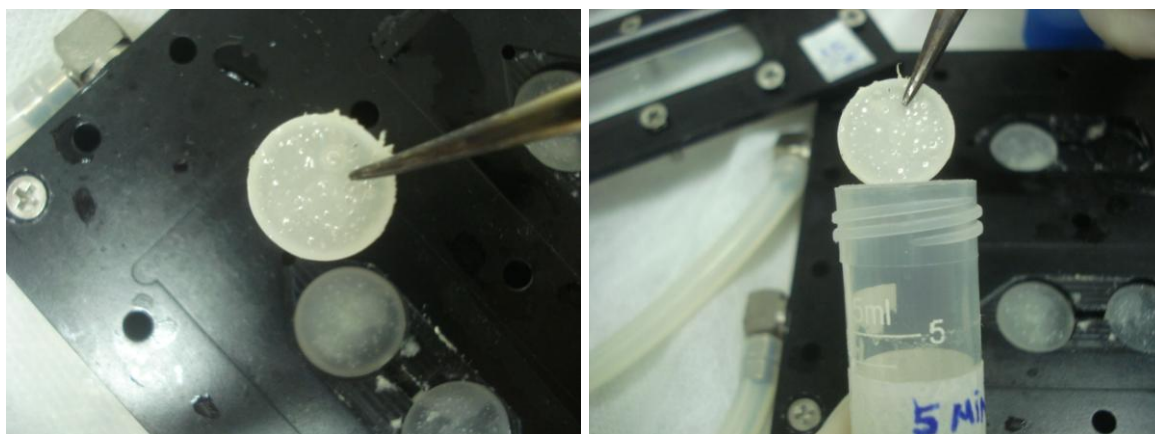


Figura 8- Remoção dos discos de resina das células paralelas de fluxo contínuo.

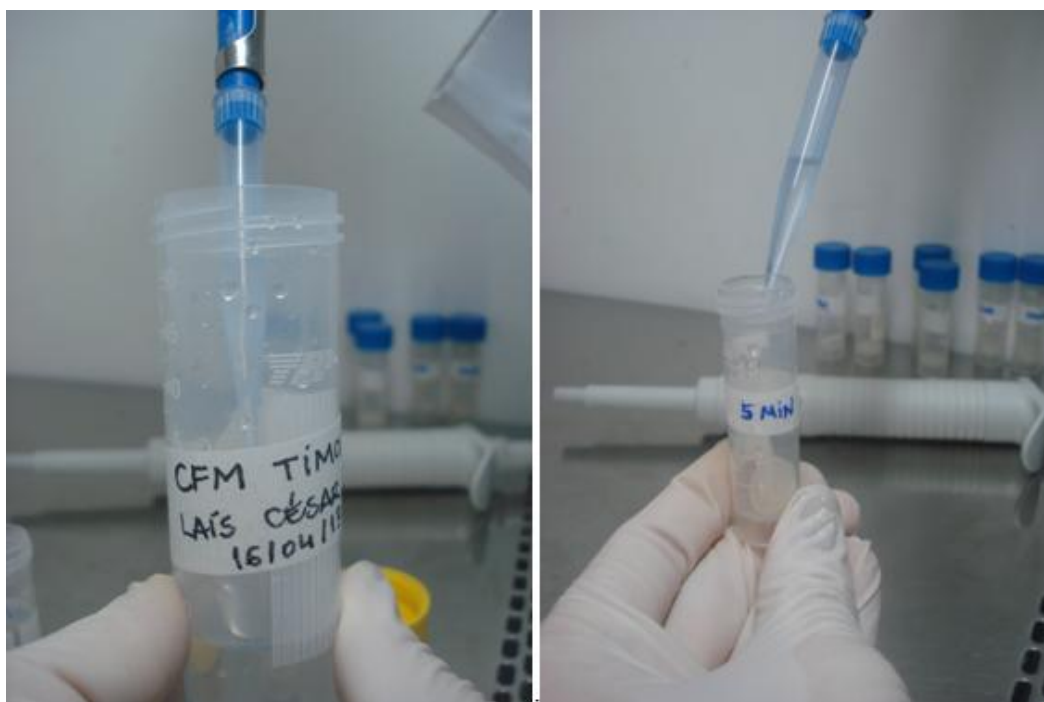


Figura 9 - Inserção dos discos de resina acrílica em tubos de criogenia contendo a concentração fungicida mínima das drogas avaliadas (timol e miconazol).

Posteriormente, após os tempos de exposição, os discos foram removidos e colocados dentro de tubos tipo Falcon estéreis com 3 ml de solução salina (Figura 10). O biofilme formado sobre os discos foi, em seguida, disperso em sonicador (2 minutos) e homogeneizado em vórtex (2 minutos) (Figura 11).

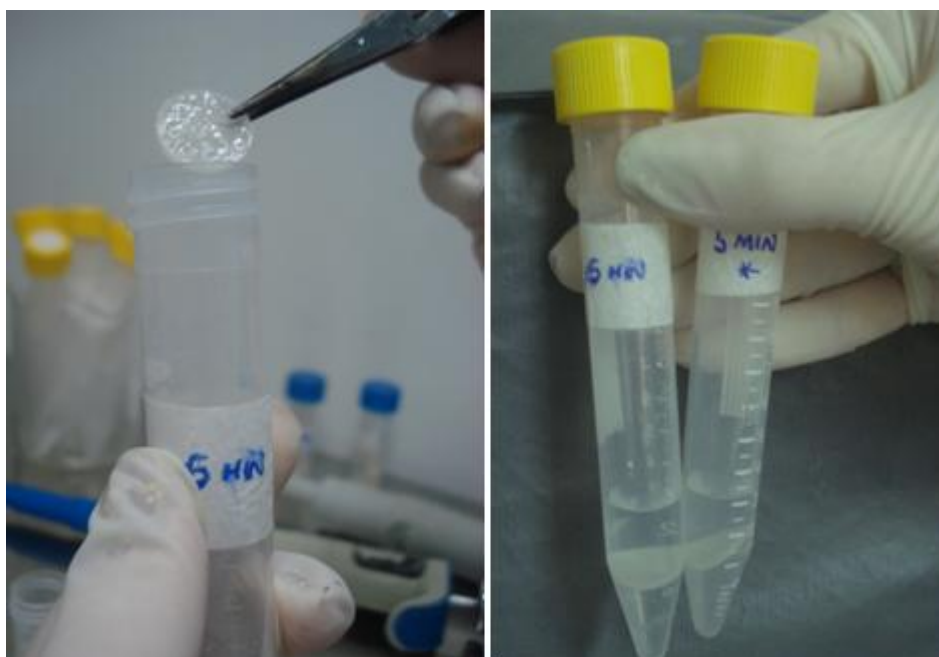


Figura 10- Discos inseridos em tubos Falcon com solução salina.



(a)



(b)

Figura 11- Biofilme de *Candida albicans* disperso em sonicador (a) e homogeneizado em vórtex (b).

Os discos foram removidos dos tubos, e estes levados para centrífuga por 15 minutos em uma velocidade de 8000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1 ml de solução salina foi adicionado aos tubos. A solução fúngica foi homogeneizada em vortex por 1 minuto e o conteúdo transferido para tubos eppendorfs pré-pesados em balança analítica. Estes eppendorfs contendo o biofilme fúngico foram centrifugados em microcentrífuga por 10 minutos e em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com pipeta. Os eppendorfs foram pesados para a obtenção do peso úmido do biofilme. De acordo com o peso de cada biofilme, acrescentou-se aos eppendorfs solução salina na proporção de 1 ml para cada 35 mg de peso (FILOCHE et al., 2007). Os tubos foram homogeneizados e em seguida, os microrganismos foram quantificados por absorbância e pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de solução fúngica.

Para a quantificação do número de células por absorbância, 100 µl do conteúdo de cada eppendorf foram pipetados em placas de 96 poços de fundo chato e levados para leitura (FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha). Para a contagem das UFC/ml, 100 µl da solução fúngica foram sequencialmente diluídos em 900 µl de solução salina até a diluição 10^{-3} (Figura 12). Em seguida, semeou-se uma alíquota de 50 µl de cada diluição em placa de Petri esterilizada, de 90 x 15 mm, contendo meio ágar Sabouraud dextrose suplementado com dextrose a 10%, a qual foi incubada em estufa por 48 horas antes da contagem. As colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias manual (Phoenix®, CP 608, Araraquara, SP, Brasil).

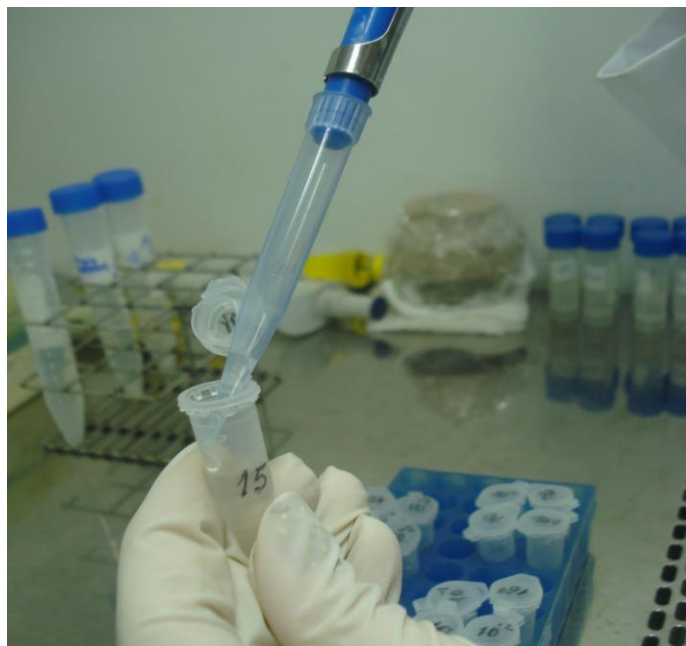


Figura 12 - Diluições seriadas em 900 µl de solução salina para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro de solução fúngica.

4.6.3.3 Quantificação da viabilidade celular por fluorescência

Primeiramente, o inóculo fúngico foi distribuído em dois tubos Falcon, pipetando-se 3 ml em cada tubo, e centrifugado por 15 minutos em uma velocidade de 8000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as massas fúngicas re-suspensas em 240µl de solução salina. Para o preparo das cepas vivas e mortas, a um dos tubos foi adicionado 4,8 ml de solução salina (para manter os fungos vivos) e ao outro foi adicionado, por 45 minutos, 4,8 ml de álcool isopropílico a 70% (para manter os fungos mortos), seguido de nova centrifugação e re-suspensão em 4,8ml de solução salina. Em seguida, os inóculos fúngicos (vivos e mortos) foram padronizados por absorbância (FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha) para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC/ml) e preparou-se a curva de calibração, a qual foi usada como referência para as leituras dos poços analisados. Para isto, fez-se uma combinação entre fungos vivos e mortos, em diferentes volumes, em tubos eppendorf. A curva de calibração possuiu a seguinte concentração: 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de fungos viáveis e o inverso complementar (100%, 80%, 50%, 20% e 0%) de fungos mortos. 30 µl das diferentes concentrações de misturas

entre fungos vivos e mortos foram transferidos dos eppendorfs para uma placa preta de 96 poços, apropriada para fluorescência.

A viabilidade celular foi quantificada por fluorescência por meio da mistura dos corantes SYTO 9 e Iodeto de Propídio do kit de viabilidade celular (LIVE/DEAD® BacLight™). Cada componente foi diluído em um tubo tipo Falcon contendo 2,5 mL de água deionizada estéril (ultra pura). Em seguida, os dois componentes foram misturados na proporção de 1:1.

Para cada poço de leitura, um volume de 30 µl de cada solução fúngica a ser avaliada (após os tempos de exposição de 5, 15 e 30 minutos nas concentrações fungicidas mínimas dos agentes antifúngicos) foram colocados em poços da placa de fluorescência juntamente com 30 µl da mistura dos corantes. A mistura dos corantes fluorescentes também foi adicionada aos poços da curva de calibração. Solução salina foi utilizada como controle. Após a exposição de cada poço à mistura de reagentes, a placa foi coberta com papel laminado evitando ao máximo qualquer exposição à luz, sendo aguardados 10 minutos antes de fazer a leitura de fluorescência no leitor de fluorescência em microplacas (FluoStar OPTIMA, BMG LabTech, Alemanha).

4.7 Análise dos Dados

Os dados foram registrados na forma de banco de dados do Microsoft Office Excel - Windows®, e analisados por meio de estatística descritiva, através de percentuais, gráficos e tabelas, além da análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e teste T em nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1 Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM)

Em relação ao timol (SIGMA - ALDRICH[®]), observou-se, após a leitura visual das placas de microdiluição, que o valor correspondente à concentração inibitória mínima (CIM), caracterizada por ausência de atividade celular (sem alteração de cor do corante), foi de 350µg/ml, relativo ao poço 2 da placa (Figura 13). Para determinar de forma mais segura e precisa o valor da CFM do timol, o esquema de microdiluição contemplou também a SM₀ da droga para obter-se concentrações mais altas, seguindo a Tabela 2 (Figura 14).

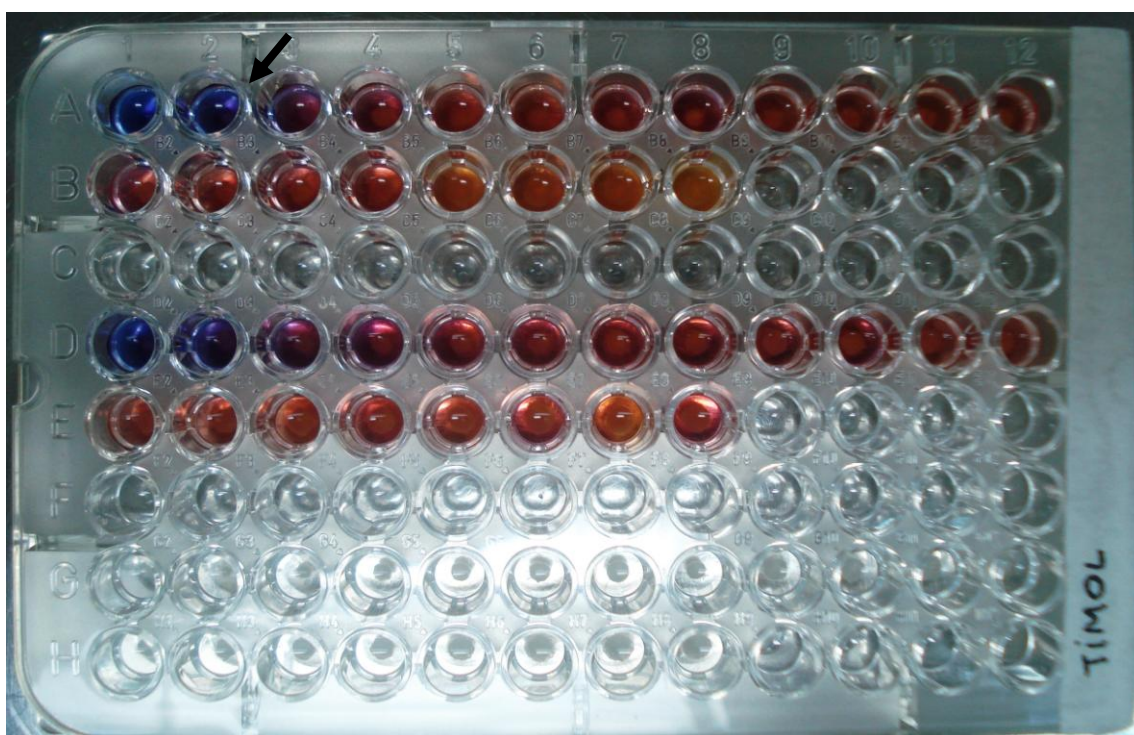


Figura 13- Placa de microdiluição com a determinação da concentração inibitória mínima do timol.

Tabela 2 – Microdiluição utilizando a solução-mãe padrão (SM₀) do timol.

Poços		Solução Mãe	SM (μL)	Inóculo (μL)	Meio (μL)	Qtde. Extrato (μg)	Vol. Final (mL)	Conc. final (μg/mL)
A1	D1	0	80	20	-	80	0.1	800
A2	D2	0	70	20	10	70	0.1	700
A3	D3	0	60	20	20	60	0.1	600
A4	D4	0	50	20	30	50	0.1	500
A5	D5	0	40	20	40	40	0.1	400
A6	D6	0	30	20	50	30	0.1	300
A7	D7	0	20	20	60	20	0.1	200

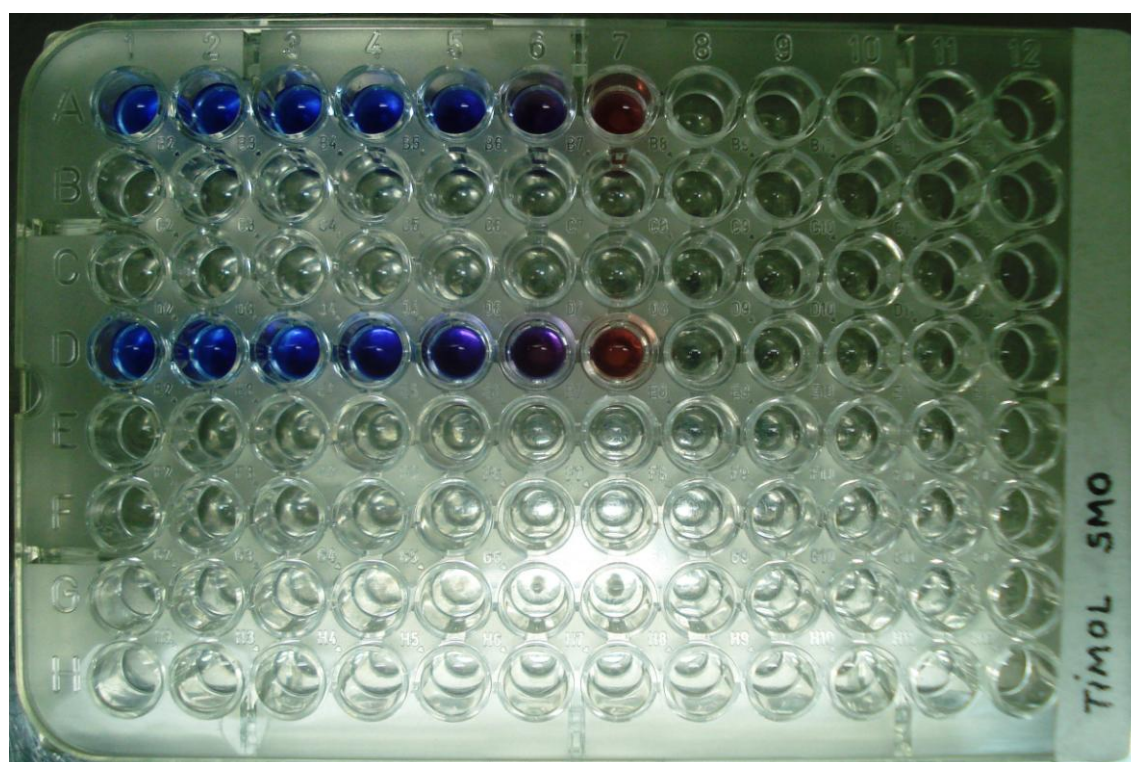


Figura 14 - Microdiluição do timol utilizando a solução-mãe padrão SM₀.

Assim, foi realizado, em seguida, o subcultivo em placas de ágar Sabouraud dextrose e após 48 horas de incubação a 37°C foi possível determinar a concentração fungicida mínima (CFM) do timol, a qual foi de 400μg/ml (poço 5) (Figura 15).

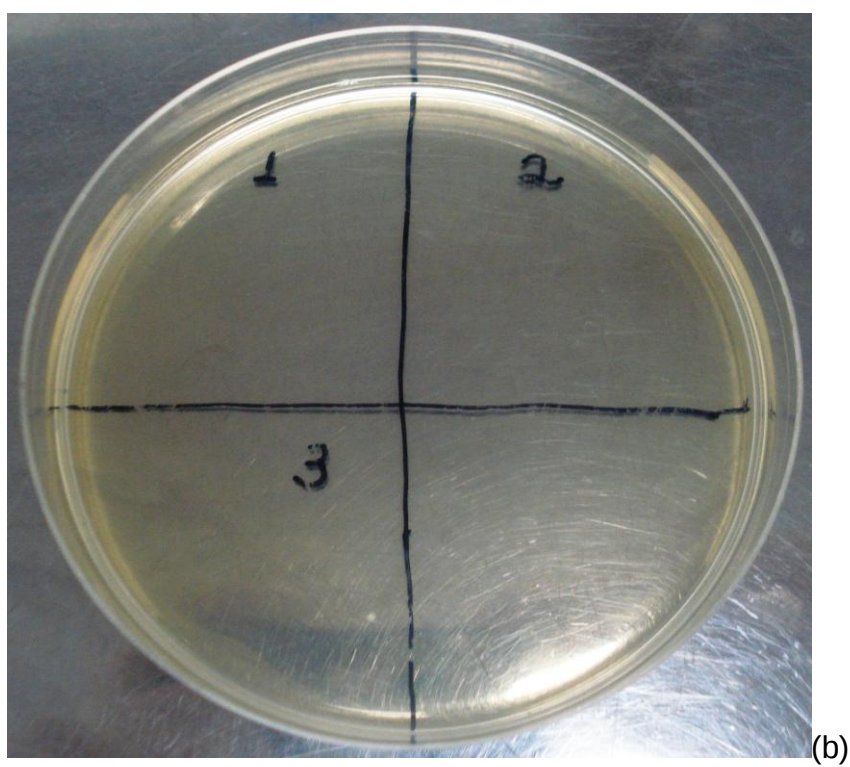
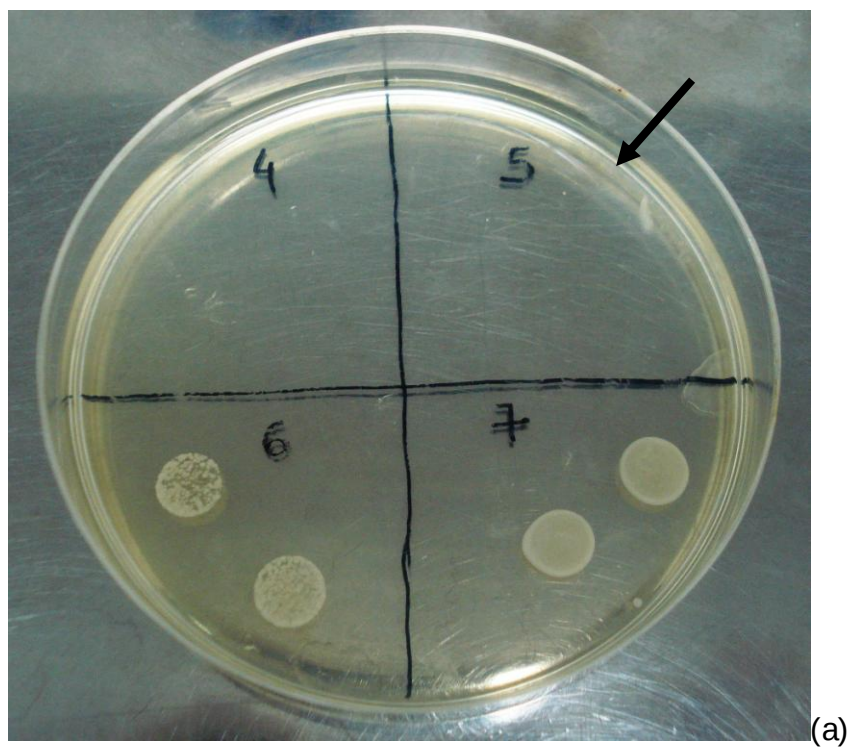


Figura 15 - Subcultivo para determinação da CFM do timol. Poços 7 a 4 (a) e 3 a 1 (b).

Para o miconazol, (SIGMA - ALDRICH®), obteve-se um valor correspondente à concentração inibitória mínima de 75,15µg/ml, correspondente ao poço 10 da placa de microdiluição (Figura 16).

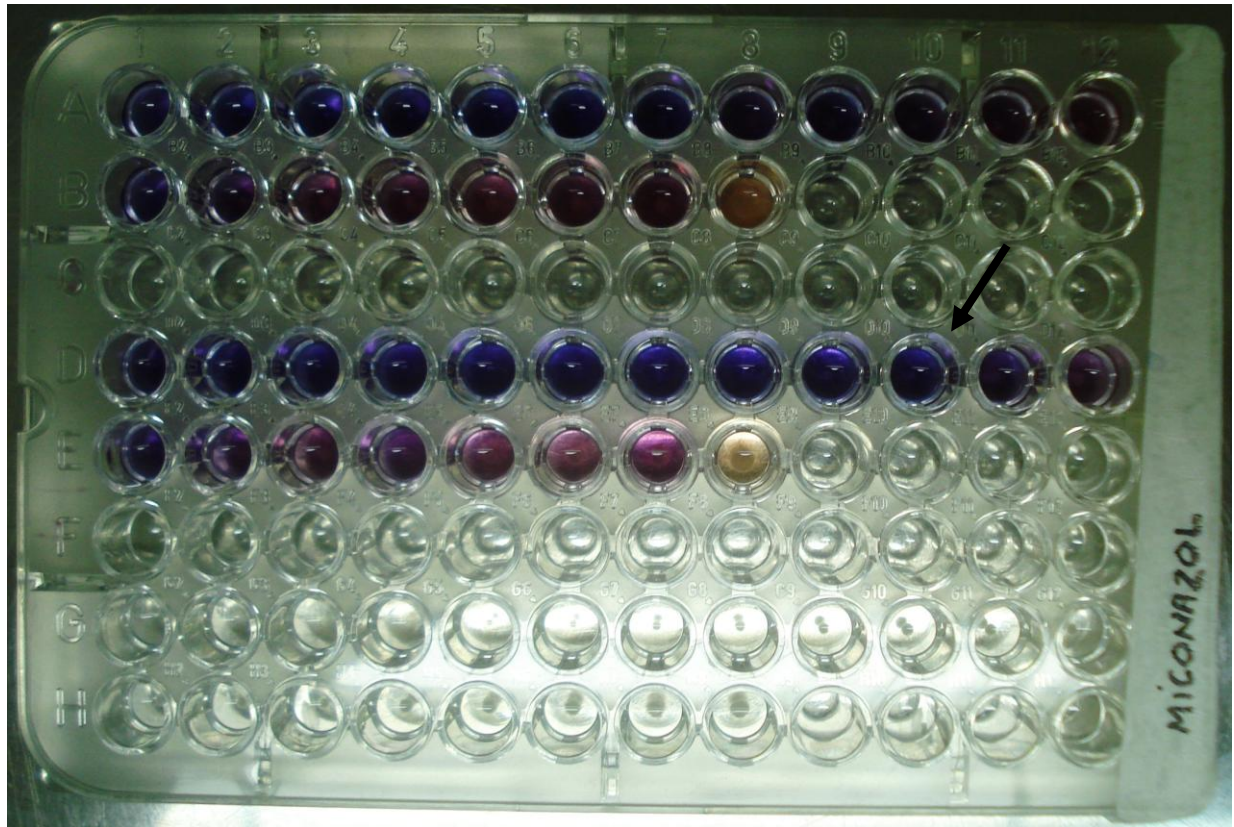
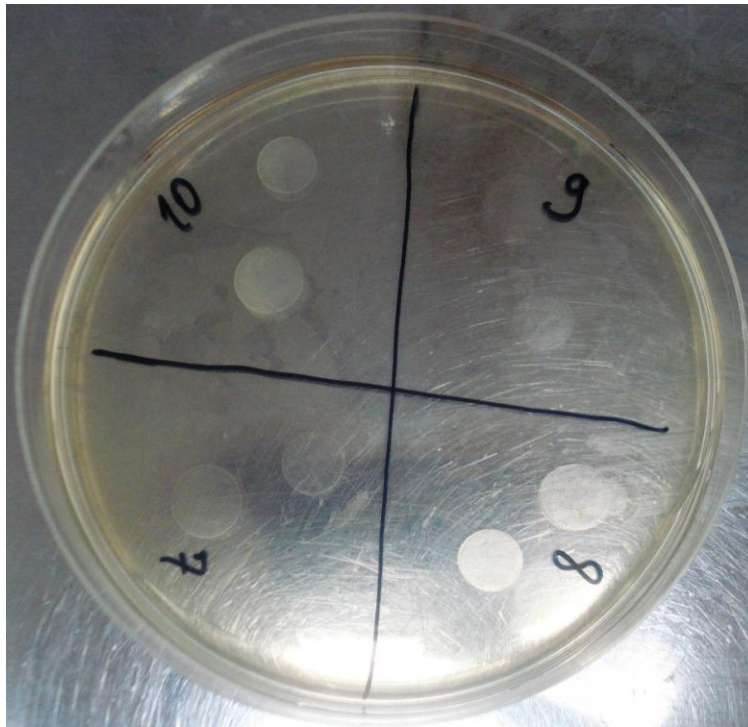
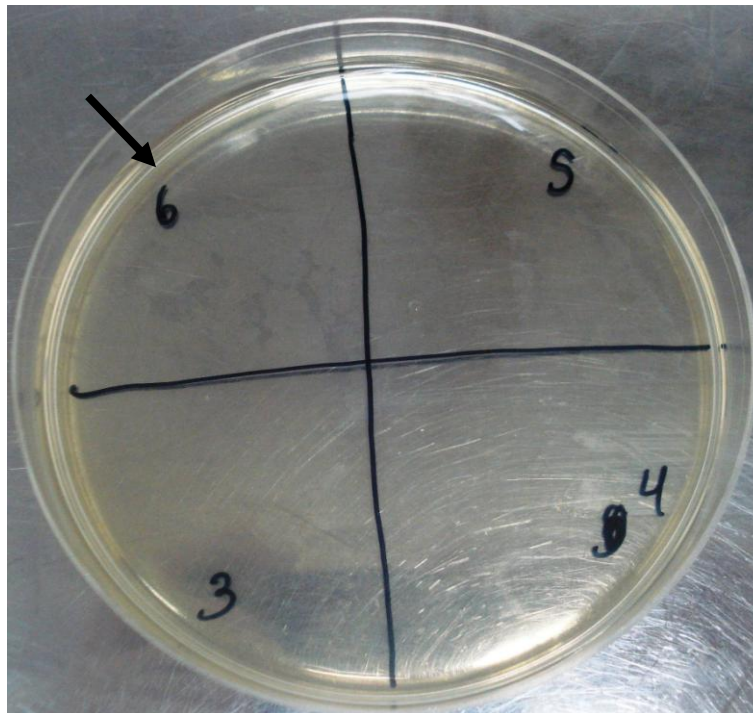


Figura 16- Placa de microdiluição com a determinação da concentração inibitória mínima do miconazol.

Desta forma, foi realizado, posteriormente, o subcultivo em placas de ágar Sabouraud dextrose da concentração inibitória mínima e das demais concentrações imediatamente mais concentradas (poços de 1 a 10) e após 48 horas de incubação a 37°C foi possível determinar a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível do subcultivo (CFM), a qual foi de 150µg/ml (poço 6) (Figura 17)



(a)



(b)

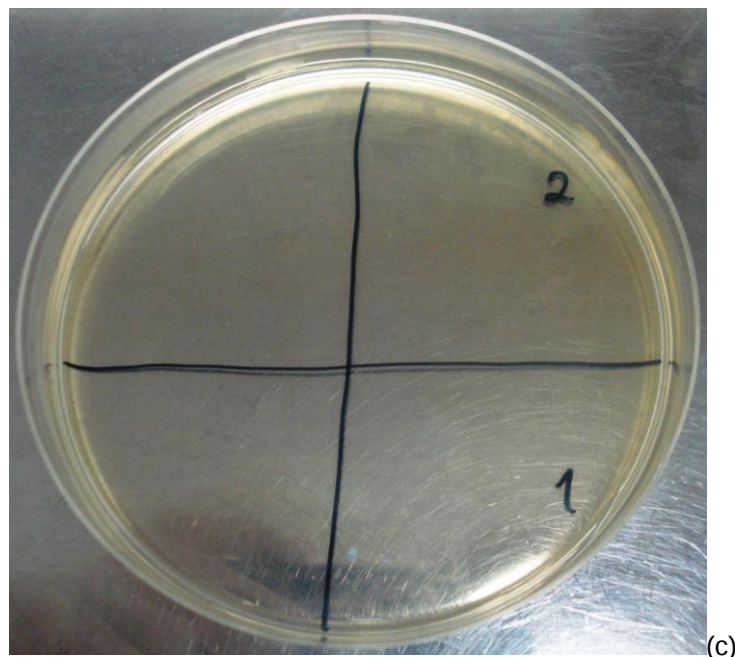


Figura 17 - Subcultivo para determinação da CFM do miconazol. Poços 10 a 7 (a), 6 a 3 (b) e 1 e 2 (c).

5.2 Quantificação celular

Levando-se em consideração as médias e os desvios padrão entre os diferentes tempos de exposição, foi possível observar que o timol apresentou, em 5 e 30 minutos, uma baixa quantidade percentual de células viáveis (aproximadamente 28% e 31%, respectivamente), sendo estes valores ainda menores após 15 minutos de exposição (aproximadamente 18%). No entanto, foi demonstrado que estes valores de viabilidade entre os tempos de exposição não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). O miconazol apresentou, em todos os tratamentos (5, 15 e 30 minutos), um baixo número percentual de células viáveis (cerca de 25%), sem haver diferença estatística significativa, indicando que esta droga apresenta um tempo de ação rápido, menor ou igual a 5 minutos de exposição, e tempos superiores a este não representaram incrementos na ação fungicida. Como esperado, os controles positivos representados pela solução salina incubada com os microrganismos permitiram um amplo crescimento do fungo, apresentando cerca de 90% de células vivas, e, ao compararmos cada uma das drogas com os respectivos controles, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), independente do tempo de exposição avaliado. (Tabela 3, Gráfico 1).

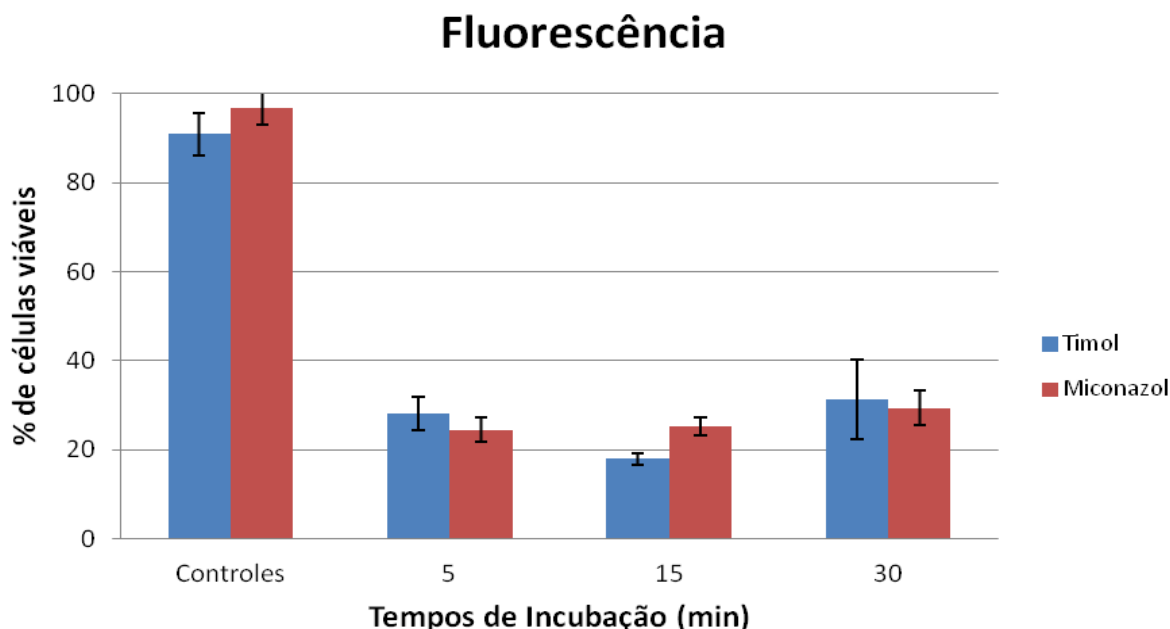
Foi demonstrado ainda, ao comparar os controles e cada tempo de exposição entre as drogas, que não houve diferenças significativas entre os controles do timol e do miconazol ($p > 0,05$). Além disto, o timol e o miconazol apresentaram, após 5 e 30 minutos de exposição, valores de viabilidade celular que não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), no entanto, os 15 minutos de exposição foram mais significativos para a redução da viabilidade de *C. albicans* para o timol do que para o miconazol, sendo estes valores diferentes entre si ($p < 0,05$) (Tabela 3). O valor médio dos três tempos de exposição entre miconazol e timol não diferiu estatisticamente pelo teste T em nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$), demonstrando que ambas as drogas possuem eficiência equivalente, levando-se em consideração as suas respectivas concentrações fungicidas mínimas.

Tabela 3 - Percentual dos valores médios de viabilidade celular e desvio padrão dos controles e das drogas testadas (timol e miconazol) em relação aos tempos de exposição nas respectivas concentrações fungicidas mínimas.

Antifúngicos	Controles (Solução Salina)	Tempos de Exposição (minutos)		
		5	15	30
Timol	90,91 ± 4,77 a A	28,01 ± 3,72 b B	17,96 ± 1,33 b C	31,24 ± 8,91 b B
Miconazol	96,72 ± 3,77 a A	24,42 ± 2,74 b B	25,22 ± 1,95 b B	29,31 ± 3,89 b B

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas linhas, e da mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey e teste T a 5% de probabilidade.

Gráfico 1 - Percentual dos valores médios de viabilidade celular e desvio padrão dos controles e das drogas testadas (timol e miconazol) em relação aos tempos de exposição nas respectivas concentrações fungicidas mínimas.

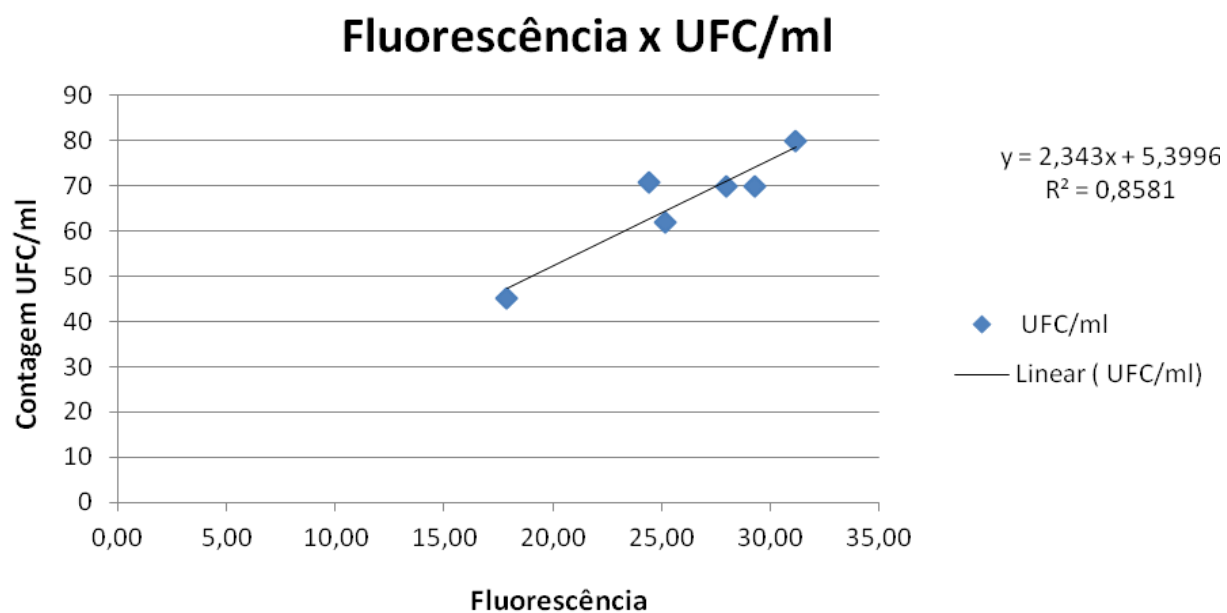


Os valores das contagens das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro de solução fúngica estão representados na Tabela 4. O gráfico 2 demonstra a relação existente entre os valores de viabilidade celular obtidos pela técnica de fluorescência e pela contagem das UFC/ml, sendo observado um grau de correlação de aproximadamente 85%, o que comprova que ambas as metodologias apresentaram-se fortemente correlacionadas.

Tabela 4 - Contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro de solução fúngica (UFC/ml x 10⁻¹).

Antifúngicos	Controles (Solução Salina)	Tempos de Exposição (minutos)		
		5	15	30
Timol	8250 x 10 ⁻¹	70 x 10 ⁻¹	45 x 10 ⁻¹	80 x 10 ⁻¹
Miconazol	11250 x 10 ⁻¹	70,9 x 10 ⁻¹	62,5 x 10 ⁻¹	70 x 10 ⁻¹

Gráfico 2 - Correlação entre os valores de viabilidade celular obtidos por fluorescência e pela contagem das UFC/ml.



6 DISCUSSÃO

Candida albicans é um fungo dimórfico que pode atuar de forma comensal ou como um agente patógeno oportunista com a capacidade de provocar uma grande variedade de infecções, que podem ser superficiais ou bastante graves. Além dos tecidos e mucosas, diversos biomateriais se mostram susceptíveis à colonização e à formação de biofilmes de *Candida* (RADFORD, CHALLACOMBE, WALTER, 1999). Para Baillie e Douglas (1999), o interesse em se estudar biofilmes microbianos vem crescendo rapidamente, particularmente no caso da investigação de biofilmes bacterianos, sendo os biofilmes fúngicos ainda um pouco negligenciados. No entanto, ao contrário do desenvolvimento típico de um biofilme bacteriano, *C. albicans* é capaz de sofrer alterações de uma forma de levedura para uma forma filamentosa, o que dá a este fungo características de desenvolvimento únicas. Assim, é cada vez mais evidente que infecções por biofilmes de *C. albicans* se tornem um problema clínico crescente, e, com o arsenal limitado de tratamentos existentes, os interesses nesta área devem ser continuamente investigados.

No estudo de Ramage et al. (2001b), as características do desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans* foram avaliadas para permitir a reconstrução tridimensional do biofilme. Os autores verificaram que a complexidade do biofilme aumentou com o tempo, levando a uma arquitetura tridimensional com grande heterogeneidade espacial durante a maturação, o que ocorreu no período de 8 e 12 horas. Nesta pesquisa, apesar de não ter sido possível a visualização tridimensional dos biofilmes, a susceptibilidade de *Candida albicans* às drogas testadas foi avaliada após um período mínimo de 12 horas de fluxo contínuo, garantindo, desta forma, que as células fúngicas se organizassem em um biofilme maduro, heterogêneo e complexo.

O efeito do pré-condicionamento das superfícies também tem sido relatado como tendo um efeito positivo sobre a aderência inicial e a formação de biofilmes de *Candida albicans*, sendo demonstrado que a presença de películas de soro ou saliva, que são normalmente encontradas no ambiente oral, aumentam a aderência inicial de células de *C. albicans* e podem potencializar a colonização a superfícies acrílicas e materiais de revestimento de próteses dentárias

(NIKAWA et al. 2000), o que justificou, nesta pesquisa, a imersão em saliva humana dos discos de resina acrílica para a formação de uma película adquirida, antes do início da formação dos biofilmes.

Segundo Wei, Xu e Wu (2011), para que haja manutenção da organização de um biofilme, é necessário que os microrganismos suportem a ação contínua de fluidos fisiológicos e desta forma, no intuito de simular as condições encontradas pelos microrganismos em um biofilme formado *in vivo*, é necessário que se utilize sistemas de formação de biofilmes que permitam um fluxo dinâmico de fluidos ou meios de crescimento que proporcionem nutrientes adequados para o desenvolvimento das células fúngicas. Assim como nesta pesquisa, os autores supracitados, para avaliar a ação de agentes antifúngicos, formaram biofilmes de *C. albicans* a partir de caldo Sabouraud em células paralelas de fluxo contínuo, e afirmaram que este se constitui em um método único e eficaz para formação de biofilmes *in vitro*.

Da mesma forma, para Ramage, Wickes e López-Ribot (2008), embora alguns estudos utilizem metodologias estáticas para a formação de biofilmes microbianos, os sistemas de fluxo contínuo são ideais para simular as condições reais que ocorrem nos sistemas biológicos e, portanto, são imprescindíveis para fornecer informações adequadas acerca do desenvolvimento dos biofilmes e de algumas características importantes em relação aos testes de agentes antimicrobianos, uma vez que podem ser considerados compatíveis com os biofilmes formados após a utilização de modelos animais ou com aqueles recuperados diretamente de amostras clínicas.

De acordo com Jin et al. (2005), uma série de substâncias corantes podem ser utilizadas para permitir a quantificação e até mesmo a visualização de biofilmes microbianos, como por exemplo, o corante FUN-1, amplamente usado na investigação da resistência antifúngica e na viabilidade celular em biofilmes de *Candida*. No entanto, os autores ressaltam que o FUN-1 pode induzir a uma sobreavaliação de células vivas, especialmente quando a densidade celular é elevada. Desta forma, para compreender melhor a heterogeneidade de biofilmes de *Candida*, em termos de viabilidade celular, estes sugerem a utilização do SYTO-9 e do iodeto de propídio, que foram empregados nesta pesquisa, pois, com a combinação destes corantes as células são uniformemente coradas de verde (vivas) ou vermelhas (mortas), independentemente da morfologia celular,

uma vez que se baseiam na integridade da membrana, sendo, portanto, mais adequados para testes de viabilidade em biofilmes fúngicos.

Investigando a capacidade de o timol interferir na formação de hifas de *Candida albicans* e com a sua viabilidade, Braga et al. (2007) empregaram a microscopia de fluorescência, através da utilização dos corantes fluorescentes SYTO-9 e iodeto de propídio. O estudo demonstrou inicialmente que o valor de CIM do timol para as cepas de *C. albicans*, determinado sobre células planctônicas, foi de 133µg/ml, o que difere dos resultados desta pesquisa, na qual foi obtido um valor de CIM de 350 µg/ml. De acordo com Duarte et al. (2007), ainda não existe um consenso que classifique, de forma aceitável, a ação dos agentes antimicrobianos com base na determinação de suas concentrações inibitórias mínimas, no entanto, Aligiannis et al. (2001) propuseram uma classificação dos compostos antimicrobianos naturais fundamentado nos valores de CIM e determinaram como inibidores fortes aqueles que possuem CIM até 500 µg /ml; inibidores moderados aqueles com CIM entre 600 e 1500 µg/ml; e inibidores fracos os que apresentam CIM acima 1600 µg/mL.

Foi ainda demonstrado por Braga e colaboradores (2007) que na ausência do timol, aproximadamente 93% das células fúngicas encontraram-se viáveis, ao passo que após 6h de incubação com 1x CIM, ½ x CIM e ¼ x CIM havia, respectivamente, 54%, 29% e 23% de células danificadas. Os resultados desta pesquisa corroboram os autores supracitados quando se observa que na ausência do antifúngico, cerca de 90% das células de *Candida albicans* estavam viáveis, no entanto, na presença da CFM do timol, os biofilmes tiveram sua massa viável reduzida em uma proporção ainda maior, observando-se 28%, 18% e 31% de células vivas após 5, 15 e 30 minutos de exposição, respectivamente (Tabela 3, Gráfico 1). Nesta pesquisa, as médias dos três tempos de exposição indicam que após 15 minutos de atuação, o timol exibiu uma maior redução do número de células viáveis em relação aos demais tempos avaliados, inclusive após 30 minutos de exposição, podendo ser sugerida a criação de um possível mecanismo de resistência por parte de *C. albicans* após períodos de tempo superiores há 15 minutos; ou ainda que haja uma rápida degradação do agente após 15 minutos, fazendo com que este não exiba eficazmente sua ação antifúngica; além disto, pode-se considerar ainda uma possível rápida volatilização do agente antifúngico após 15 minutos iniciais.

É conveniente ressaltar que nesta pesquisa foi utilizada a concentração fungicida mínima (CFM) das drogas para avaliar a inibição dos biofilmes fúngicos, cuja arquitetura e interações celulares são responsáveis por aumentar a resistência destes microrganismos aos agentes antifúngicos. Baillie e Douglas (1998) relatam que as concentrações necessárias de uma droga para que haja redução da atividade metabólica celular em aproximadamente 50% devem ser 5 a 8 vezes mais elevadas para os biofilmes do que para as células planctônicas, levando-se em consideração suas correspondentes concentrações inibitórias mínimas.

Corroborando os resultados desta pesquisa, Pina-Vaz et al. (2004) observaram que após um rápido período de exposição (15 minutos), óleos essenciais de espécies de *Thymus*, os quais possuem como componentes majoritários o timol e o carvacrol, apresentaram alta atividade antifúngica contra *Candida* spp., com representação de mais de 90% das células coradas com o iodeto de propídio, o que corresponde à morte celular. Também confirmando estes dados, Ahmad et al. (2011), ao investigarem a eficácia das mesmas substâncias em isolados clínicos sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, ressaltaram que a atividade antifúngica de ambos os compostos ocorreu rapidamente e que o iodeto de propídio penetrou em mais de 95% das células fúngicas sensíveis, indicando ruptura estrutural da membrana celular. A permeação de iodeto de propídio, em particular após um curto período de exposição, como no presente estudo, indica que o mecanismo de ação da droga envolve uma lesão primária na membrana celular, resultante de sua solubilização.

Do mesmo modo, Dalleau et al. (2008) testaram, *in vitro*, a atividade antibiofilme de 10 terpenos contra três espécies de *Candida* e mostraram que o timol, o carvacrol, e o geraniol foram os mais eficientes na redução do desenvolvimento de *C. albicans* tanto na forma planctônica como crescidas em biofilme, já que estes compostos induziram a inibição de aproximadamente 80% da massa fúngica do biofilme. Igualmente, nesta pesquisa, o timol, após 15 minutos de exposição, foi capaz de inibir 82% da massa fúngica do biofilme de *Candida albicans*. Para os autores citados, estes resultados reforçam o interesse potencial de utilização de terpenos, como o timol, como agentes antibiofilme a serem usados sozinhos ou em associação com antifúngicos azólicos, no intuito de neutralizar fenômenos de resistência.

Segundo Sánchez et al. (2004) e Pina-Vaz et al. (2004), o que suporta a ideia de que o timol interfere com a produção de formas viáveis de *Candida albicans*, ou seja, apresenta efeito antimicrobiano, é o fato de que este antifúngico pode afetar a estrutura e a superfície eletrostática das membranas celulares, uma vez que os terpenos, ao se inserir entre as cadeias de ácidos graxos que constituem as bicamadas lipídicas, alteram as propriedades e funções da membrana, aumentando a sua fluidez e alterando a sua permeabilidade, pois são capazes de interferir negativamente com a biossíntese do ergosterol.

Embasando o efeito antifúngico do timol sobre biofilmes maduros de *Candida albicans*, Braga et al. (2008) observaram que o valor da CIM foi de 125µg/ml para as células planctônicas de *C. albicans*, mas, com o intuito de alcançar resultados mais satisfatórios sobre biofilmes maduros foi utilizada nos testes a concentração de 2x CIM. Ficou demonstrado que após 6 horas de exposição com o timol, os biofilmes de *C. albicans* apresentaram redução de 45,1% em sua atividade metabólica; o mesmo ocorreu após 12 horas, porém com 68% de inibição, e, após 24 horas de exposição, o percentual de inibição foi de 88,3%. Os resultados desta pesquisa estão de acordo com os autores supracitados, no entanto, a ação antifúngica do timol foi demonstrada em tempos de exposição bem menores (5, 15 e 30 minutos) (Tabela 3).

Lamfon et al. (2004) realizaram estudo visando estimar, *in vitro*, a susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* frente a antimicrobianos, como o miconazol. Para isto, os biofilmes foram cultivados sobre discos de resina acrílica, assim como utilizado nesta pesquisa, no entanto, estes biofilmes não foram formados em sistema de fluxo contínuo que permitisse o crescimento dinâmico do biofilme fúngico, assim como ocorre na cavidade oral e como o que foi desenvolvido nesta pesquisa. Segundo os autores, a exposição ao miconazol (CIM = 256µg/ml) por 24 horas resultou em 99,2% de redução na viabilidade, o que se traduz em uma redução significativa da massa fúngica dos biofilmes, não havendo diferença significativa entre 24 e 48 horas de exposição. Nesta pesquisa, os biofilmes de *C. albicans* expostos à CFM do miconazol também apresentaram uma ampla redução do número de células viáveis (aproximadamente 75%), no entanto, foi verificado que o início de ação da droga ocorreu já nos primeiros 5 minutos de exposição, sem diferença entre os demais tempos testados (15 e 30 minutos), ficando demonstrado que períodos de tempo superiores a este não

representam acréscimos na sua atuação como agente fungicida (Tabela 3, Gráfico 1).

Ao investigar a atividade antifúngica do miconazol (625 µg/ml) isoladamente e em combinação com a berberina (2000 µg/ml), um alcalóide encontrado em diversas espécies vegetais, sobre biofilmes de *C. albicans* formados *in vitro* em células paralelas de fluxo contínuo, Wei, Xu e Wu (2011) verificaram que quando as drogas foram testadas isoladamente nenhuma inibição significativa foi observada na formação dos biofilmes em comparação com o controle, enquanto que a associação dos agentes promoveu 91% de inibição da massa fúngica após 24 horas. Estes dados vão de encontro com aqueles encontrados nesta pesquisa, em que o miconazol, testado sobre os biofilmes numa concentração inferior (150 µg/ml), foi capaz de promover rapidamente a inibição de *C. albicans*, havendo aproximadamente 25% de viabilidade celular após a sua administração, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Atualmente, sabe-se que a ação fungicida do miconazol é derivada da ação desta droga na biossíntese do ergosterol, importante na integridade da membrana celular (AHMAD et al., 2011), além da indução de espécies reativas de oxigênio (FRANÇOIS et al., 2006). Com o objetivo de investigar se a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) está diretamente envolvida com o efeito antifúngico do miconazol, Kobayashi et al. (2002) examinaram a ação de um antioxidante, o pirrolidinoditiocarbamato (PDTC), na produção de ERO e relataram que a presença do PDTC foi capaz de inibir, de maneira dose-dependente, a produção de ERO induzida pelo miconazol, resultando na recuperação de 50% a 70% de viabilidade das células de *C. albicans*. Assim, os autores sugerem que a produção de ERO é um acontecimento importante induzido por esta droga, além da inibição da síntese do ergosterol, podendo ambos os mecanismos atuar concomitantemente para a ação deste agente antifúngico.

7 CONCLUSÕES

- Os biofilmes de *Candida albicans* foram eficazmente inibidos após a utilização do timol como agente antifúngico, sendo apresentados baixos valores percentuais de células viáveis detectados através da técnica de fluorescência. Além disto, foi possível evidenciar a equivalente eficiência antifúngica entre o timol e o miconazol na supressão dos biofilmes, levando-se em consideração suas correspondentes concentrações fungicidas mínimas.
- A CIM do timol foi de 350 µg/ml e a CFM foi de 400 µg/ml, enquanto que para o miconazol determinou-se uma CIM de 75,15µg/ml e uma CFM de 150µg/ml.
- Ao se correlacionar as metodologias utilizadas para quantificação das células fúngicas, foi possível comprovar que a contagem por plaqueamento das UFC/ml e a quantificação celular por fluorescência apresentaram-se seguramente correlacionadas.

REFERÊNCIAS*

- Ahmad A, Khan A, Yousuf S, Khan L A, Manzoor N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*. 2010; 81(8): 1157-62.
- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA *et al*. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(1): 41-50.
- Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 48(1-2): 80-6.
- Alakomi HL, Matto J, Virkajarvi I, Saarela M. Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations. *J. Microbiol Methods*. 2005; 62(1): 25– 35.
- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49(9): 4168-70.
- Álvares CA, Svldzlnski TIE, Consolaro MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2007; 43(5): 319-27.
- Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 2004; 72(10): 6023- 31.
- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(1): 5-16.
- Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Santos Filho L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev. patol. trop*. 2004; 33(1): 55-64.
- Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(8): 1900–5.
- Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 1999; 48(7): 671-9.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Barasch A, Griffin AV. Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials. *Future Microbiol.* 2008; 3(3): 365-9.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6): 588–94.

Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(3): 349-56.

Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 2006; 28(8): 799-808.

Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 2007; 50(6): 502–6.

Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(5): 472-7.

Burt SA, Van Der Zee R, Koets AP, De Graaff AM, Van Knapen F, Gaastra W *et al.* Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157 H7. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(14): 4484–90.

Calderoni RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9(7): 327-35.

Candido RC, Fischman O, Ito IY, Paula CR. *Candida albicans*: Biotyping by susceptibility to antimycotics. *Rev. Microbiol.* 1996; 27(2): 81-6.

Chaffin W, López-Ribot J, Casanova M, Gozalbo D, Martinez J. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(1): 130-180.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183(18): 5385-94.

Costerton JW, Lewandowski IZ, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49(1): 711–45.

Czub J, Baginsky M. Comparative Molecular Dynamics Study of Lipid Membranes Containing Cholesterol and Ergosterol. *Biophys. J.* 2006; 90(7): 2368-82.

Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(6): 572–6.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167–93.

Douglas LJ. *Candida* biofilm and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11(1): 30-6.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol. 2007; 111(2):197-201.

Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? Evolution. 2012; 66(9): 2961-8.

Falcão AFP, Santos LB, Sampaio NM. Candidíase associada a próteses dentárias. Sitientibus. 2004; 1(30): 135-46.

Filoché SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. J Microbiol Methods. 2007; 69(3): 489–96.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(2): 109-18.

Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Kerntopf MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(5): 934-40.

Fothergill AW. Miconazole: a historical perspective. Expert Rev Anti Infect Ther. 2006; 4(2): 171-5.

François IEJA, Cammue BPA, Borgers M, Ausma J, Dispersyn GD, Thevissen K. Azoles: mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*. Curr Med Chem. 2006; 5(1): 1–11.

Ganguly S, Mitchell A. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2011; 14(4): 380-5.

Georgopapadakou NH. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. Curr Opin Microbiol. 1998; 1(5): 547-57.

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytother Res. 2004; 18(12): 990-5.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Gomes-Carneiro MR, Felzenszwalb I, Paumgartten, FJ. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1, 8-cineole, citral, citronellal, (-)- menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res.* 1998; 416(1-2): 129–36.

Gourlay CW, Ayscough KR. Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 10): 2119-32.

Grassi M, Harmmerle C. *AIDS em Odontologia.* São Paulo: Revinter; 1994.

Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC: Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* 2009; 11(8-9): 753-61.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2007; 163(3): 137-43.

Jagger DC, Al-Akhazami L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *Int J Prosthodont.* 2002; 6(15): 549-52.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HHP, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2005; 159(3): 353–60.

Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozawa S, Tsuji N, Yagihashi A *et al.* Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3113-7.

Kuleta JK, Kozik MR, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(2): 211–24.

Lamfon H, Porter SR, Mccullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(2): 383-5.

Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods.* 2007; 42(4): 325-9.

Mah TFC, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 34–39.

Mahmoudabadi AZ, Drucker DB. Effect of amphotericin B, nystatin and miconazole on the polar lipids of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Indian J Pharmacol.* 2006; 38(6): 423-6.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Manzoor N, Amin M, Khan LA. Effect of phosphocreatine on H⁺ extrusion, pH_i and dimorphism in *Candida albicans*. Indian J Exp Biol. 2002; 40(7): 785–90.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. J Dent. 2010; 38(S1): S11-S15.

Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. Mycopathologia. 2008; 166 (5-6): 369-83.

Maza JL, Elquezabal N, Prado C, Ellacuría J, Soler I, Pontón J. *Candida albicans* adherence to resin composit restorative dental material: influence of whole human saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94(5): 589-92.

Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(4): 340–5.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, Vanhandel M, Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(2): 510-20.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. Int J Prosthodont. 1999; 2(12): 153-9.

Nikawa H, Equusa H, Makihiro S, Yamashiro H, Fukushima H, Jin C *et al.* Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16(5): 279-83.

Nikawa H, Nishimura H, Makihiro S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses, 2000; 43(3-4): 139-43.

Núñez JMC, Oliveira LV, Lira AF, Mesquita MF, Henriques GEP, Consani RLX. Effect of denture cleansers on the surface of resilient lining materials. Cienc Odontol Bras. 2008; 11(2): 71-7.

Omram SM, Esmailzadeh S. Comparison of anti-*Candida* activity of thyme, pennyroyal, and lemon essential oils versus antifungal drugs against *Candida* species. Jundishapur J Microbiol. 2009; 2(2): 53-60.

Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compound from essential oils. Med Res Rev. 2006; 26(2): 223–68.

Pereira FO. Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum*. [tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2012.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pinto E, Oliveira SC, Tavares C, Salgueiro L *et al.* Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004; 18(1): 73-8.

Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. Br J Pharmacol. 2003; 140(8): 1363-72.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1999; 10(1): 99-116.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 2006; 6(7): 979-86.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001a; 45(9): 2475-9.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001b; 18(4): 163-70.

Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. Rev Iberoam Micol. 2008; 25(1):37-40.

Sánchez ME, Turina AV, García DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. Colloids Surf B Biointerfaces. 2004; 34(2): 77-86.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 2008; 14(7): 582-90.

Sesma N, Laganá DC, Gil C, Morimoto S. Capacidade de remoção do biofilme por meio de um produto enzimático para higienização de bases protéticas. RPG rev. pos-grad. 2005; 12(4): 417-22.

Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol. 2005; 56(4): 845-57.

Thevissen K, Ayscough KR, Aerts AM, Du W, De Brucker K, Meert EM *et al.* Miconazole Induces Changes in Actin Cytoskeleton prior to Reactive Oxygen Species Induction in Yeast. J Biol Chem. 2007; 282(30): 21592-7.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Tsutsumi S, Iida M, Tada N, Kojima T, Ikeda Y, Moriwaki T *et al.* Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *Int J Pharm.* 2011; 421(2): 230-6.

Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis HJ, Coenye T. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. Biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(4): 694-700.

Vasconcelos LCS, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses.* 2003; 1(46): 192-6.

Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Peixoto MHP. *Streptococcus mutans* in denture stomatitis patients under antifungal therapy. *Rev odonto ciênc.* 2010; 2(25): 120-5.

Wei GX, Xu X, Wu CD. *In vitro* synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(6): 565-72.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.