

# Atividade antifúngica do $\alpha$ -terpinen sobre *Candida albicans*

## Antifungal activity of $\alpha$ -terpinen on *Candida albicans*

Caroline Coradi Tonon <sup>1,a</sup>, Renata Serignoli Francisoni <sup>1,b</sup>, Patricia M. Maquera Huacho <sup>1,b</sup>, Marília Ferreira Correia <sup>1,b</sup>, Ester Alves Ferreira Bordini <sup>1,a</sup>, Janaina de Cássia Orlandi Sardi <sup>2,c</sup>, Denise M. Palomari Spolidorio <sup>3,c</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** avaliar a atividade antifúngica do  $\alpha$ -terpinen sobre culturas planctônicas e biofilme de *Candida albicans*. **Material e Métodos:** Primeiramente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do  $\alpha$ -terpinen sobre microrganismos planctônicos. A Nistatina foi utilizada como controle positivo. Biofilme de *Candida albicans* foi desenvolvido e, após o tratamento com diferentes concentrações de  $\alpha$ -terpinen, foi quantificado em UFC/mL, além da atividade metabólica das células ser avaliada por XTT. **Resultados:** a menor concentração capaz de inibir o crescimento (CIM) foi 0,2 % para o  $\alpha$ -terpinen e 4  $\mu$ g/mL para a Nistatina. Na CIM, os resultados mostraram que a partir da concentração 0,05 % de  $\alpha$ -terpinen e 2  $\mu$ g/mL de Nistatina houve diminuição de *C.albicans* quando comparado ao controle. A CFM foi para  $\alpha$ -terpinen 0,2 % e Nistatina 8  $\mu$ g/mL. Na quantificação as concentrações eficazes foram de  $\alpha$ -terpinen (0,1%) e Nistatina (128 $\mu$ g/mL), e no teste do XTT, observou-se que  $\alpha$ -terpinen (0,1%) e Nistatina (256 $\mu$ g/mL) diminuem a viabilidade quando comparado com o controle. **Conclusão:** Assim, pode-se afirmar que  $\alpha$ -terpineol pode ser uma alternativa para tratamento de infecções fúngicas.

**PALAVRAS CHAVE:** *Candida albicans*, biofilme, nistatina.

### SUMMARY

**Objective:** to evaluate the antifungal activity of  $\alpha$ -terpinen on planktonic cultures and biofilm of *Candida albicans*. **Material and Methods:** first, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM) of  $\alpha$ -terpinen were determined. Nystatin was used as a positive control. Biofilm of *Candida albicans* was developed and, after treatment with different concentrations of  $\alpha$ -terpinen, was quantified in CFU/

<sup>1</sup> Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade de Campinas. São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São Paulo, Brasil.

<sup>a</sup> Aluna do curso de pós-graduação- Doutorado.

<sup>b</sup> Doutora.

<sup>c</sup> Professora.

mL, in addition to metabolic activity of the cells being evaluated by XTT. **Results:** the lowest concentration able to inhibit the growth (MIC) was 0.2% for  $\alpha$ -terpinen and 4  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for Nystatin. Results showed that from the concentration 0.05% of  $\alpha$ -terpinen and 2  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of Nystatin, there was a decrease of *Candida albicans* when compared to the control, in planktonic culture. CFM was 0.2% for  $\alpha$ -terpinen and 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for Nystatin. Regarding the quantification, effective concentrations were  $\alpha$ -terpinen (0.1%) and Nystatin (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and in the XTT test,  $\alpha$ -terpinen (0.1%) and Nystatin (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) decreased metabolic activity when compared to control. **Conclusion:** Thus, it can be stated that  $\alpha$ -terpineol may be an alternative for the treatment of fungal infections.

**KEY WORDS:** *Candida albicans*, biofilm, nystatin.

## INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta aproximadamente 700 microrganismos distintos, os quais formam a microbiota mais complexa do corpo humano. Esses microrganismos, incorporados a uma matriz de substâncias poliméricas compõem o biofilme dental (1) e essa associação favorece as trocas metabólicas, genéticas inter e intra-espécies (2,3,4). Com isso, os microrganismos na forma de biofilme são menos susceptíveis aos antimicrobianos que na forma planctônica (5,6,7).

Má qualidade de higiene bucal e alguns fatores predisponentes, juntamente com o biofilme, podem gerar infecções fúngicas, sendo que a candidíase é uma das principais. A levedura do gênero *Candida* é a causadora da candidíase bucal, a qual é um microrganismo saprófito, que, devido à fatores predisponentes, pode ser tornar patogênico (8). A capacidade de aderir, colonizar e formar tubos germinativos na mucosa oral contribui para o seu desenvolvimento.

Os agentes antifúngicos mais utilizados na prevenção e tratamento contra o gênero *Candida* são a anfotericina B, nistatina e fluconazol. A nistatina, usada no tratamento do candidíase oral, é um antifúngico poliênico, que apresenta características fungicidas e fungistática (9), atua na desestruturação da membrana celular de fungos e leveduras e na permeabilidade da membrana celular (10). Porém, estudos têm demonstrado a existência de *Candida albicans* resistentes e que alguns medicamentos ocasionam lesões nos rins e fígado (11).

Assim, extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem sendo cada vez mais utilizados na medicina, sendo que uma grande porcentagem das novas

moléculas descobertas provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos. Estudos com produtos de origem natural apresentaram resultados entusiasmantes sobre os patógenos bucais, no controle da resposta inflamatória mostrando que estes agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas (12).

O  $\alpha$ -terpinen é um monoterpeno, encontrado na *Melaleuca alternifolia* ou Tea Tree Oil (TTO) e outras plantas como *Hajeb Layoun arboreta* e *Alpinia zerumbet*. Atua induzindo a perda da membrana, o que interfere na integridade e na fisiologia da célula do micro-organismo (13), além de apresentar amplo espectro de atividade antimicrobiana (antibacteriana, antiviral e antifúngica) e atividade antiinflamatória (14,15). Estudos in vitro relacionam o uso medicinal deste produto à eficácia no tratamento de diversas infecções bacterianas (16,17,18) e fúngicas, como a candidíase (7,19,20).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do  $\alpha$ -terpinen sobre *Candida albicans* na forma planctônica e em biofilme.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reativação da espécie

Foi utilizada neste estudo cepa de referência de *Candida albicans* (ATCC 5314), reativada em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) (pH 7.0) com 0,165M MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) a 37°C por 18h. A suspensão, então, foi centrifugada e as células lavadas 2 vezes com solução salina tampão fosfato (PBS) estéril. Em seguida, o material resultante teve sua turbidez ajustada a 600 nm até atingir absorbância correspondente a  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

### **Preparo das soluções**

O  $\alpha$ -terpinen (Sigma, MO, USA) foi diluído em RPMI 1640 nas concentrações 0,1% - 0,0064%, acrescido de DMSO 0.4% (Sigma, MO, USA) como solubilizante (12).

A nistatina (Sigma, MO, USA) foi utilizada como controle positivo. Foram realizadas diluições em DMSO nas concentrações 0,03125 – 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de acordo com a norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (21).

### **Análise antimicrobiana do $\alpha$ -terpinen em microrganismos planctônicos (CIM e CFM)**

Foi empregado o método de microdiluição em caldo em placas de microtitulação de 96 poços para a determinar a Concentração Inibitória Mínima (M27-A2 – CLSI) (21). Cada poço recebeu 200  $\mu\text{L}$  das diluições e 2  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Candida albicans*, resultando numa concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC/mL. O meio de cultura RPMI 1640 foi utilizado como controle negativo.

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em agitador a 75 rpm (Rotações por minuto). Decorrido esse período, os poços foram examinados visualmente para comprovar a presença de turvação e absorbância foi determinada a 590 nm em leitor de ELISA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três momentos diferentes (n=9).

Dos poços que não mostraram crescimento visível foram retiradas duas alíquotas, as quais foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar e mantidas a 37°C por 48 horas, para a determinação da Concentração Fungicida Mínima. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a  $\geq 99.9\%$ .

### **Análise antimicrobiana do $\alpha$ -terpinen em biofilme**

#### **Formação do biofilme**

O biofilme foi formado em placas de microtitulação, como descrito por Thein et al. (22). Culturas de *Candida albicans* foram reativadas e transferidas para placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$  para cada poço). As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos, em agitador a 75 rpm, tempo que correspondeu à fase de adesão dos microrganismos à superfície dos orifícios. Após este tempo, a suspensão foi aspirada e os poços foram lavados com PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril para a remover os microrganismos não aderidos. 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 foi adicionado em cada poço para promover o crescimento do biofilme e

mantidos a 37°C por 48 h a 75 rpm para posterior análise.

#### **Efeito do $\alpha$ -terpinen em biofilme**

Para explorar a ação do  $\alpha$ -terpinen na formação de biofilme, após 48 h, o meio de cultura foi trocado por 100  $\mu\text{L}$  das diluições de  $\alpha$ -terpinen e nistatina, sendo que poços sem tratamento foram utilizados como controle negativo do biofilme. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C por 24 h, sendo posteriormente o efeito do  $\alpha$ -terpinen e nistatina sobre o biofilme analisado pelo método de XTT.

#### **Análise da viabilidade do biofilme (Teste de XTT)**

O ensaio de XTT é um teste de viabilidade celular, colorimétrico, e que permite realizar uma estimativa do metabolismo ativo microbiano por meio da redução das enzimas desidrogenase presentes no sistema de transporte de elétrons no cristal de formazano (23). O sal de XTT (2,3 - Bis - (2 - Methoxy - 4 - Nitro - 5 - Sulfohenyl) - 2H - Tetrazolium-5-Carboxanilide, Sigma, MO, USA) foi preparado em água ultra purificada na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi filtrada e estocada a -80 °C. Solução de menadiona (Sigma, MO, USA) foi preparada em acetona a 0.4 mM previamente ao experimento. Após as 24 horas de incubação, as soluções de tratamento foram removidas dos poços e estes foram lavados 2 vezes com PBS estéril. 200  $\mu\text{L}$  de solução de XTT (contendo 158  $\mu\text{L}$  de PBS com 200 mM glicose, 40  $\mu\text{L}$  de XTT e 2  $\mu\text{L}$  de menadiona diluída) foram adicionados a cada poço e as placas permaneceram incubadas por 3 h no escuro a 37 °C, sendo, então, a absorbância determinada em 492 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três momentos diferentes (n=9).

#### **Quantificação do biofilme**

Para a quantificação em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), 3 poços (n=3) de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a análise. Cada poço lavado duas vezes com PBS estéril e a massa do biofilme foi raspada cuidadosamente na presença de 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Todo o procedimento foi padronizado e realizado por um único operador. A suspensão resultante foi diluída e plaqueada em meio Sabouraud Dextrose Ágar e as placas foram mantidas a 37°C por 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em momentos diferentes. A contagem das colônias foi realizada por um pesquisador imparcial à pesquisa e a reprodutibilidade inter-examinador

foi avaliada calculando os coeficientes de correlação intra-classe (CCI) e o intervalo dos limites de 95%.

### Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão e as diferenças entre os grupos quantificados em UFC/mL e teste de XTT foram analisados pelo teste de Shapiro Wilk, teste de ANOVA e comparados no teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### Avaliação: CIM e CFM

A tabela 1 mostra os resultados para CIM e a CFM de  $\alpha$ -terpinen. A menor concentração capaz de inibir o crescimento foi  $\alpha$ -terpinen 0,2 % e nistatina 4  $\mu$ g/mL em culturas planctônicas. Na gráfico 1 observa-se que a partir da concentração de  $\alpha$ -terpinen 0,05 % e nistatina 2  $\mu$ g/mL houve diminuição dos microrganismos quando comparado com o controle

( $p < 0.05$ ). Entretanto, as menores concentrações fungicidas foi  $\alpha$ -terpinen 0,2%, e nistatina 8  $\mu$ g/mL (tabela 1).

### Quantificação do biofilme

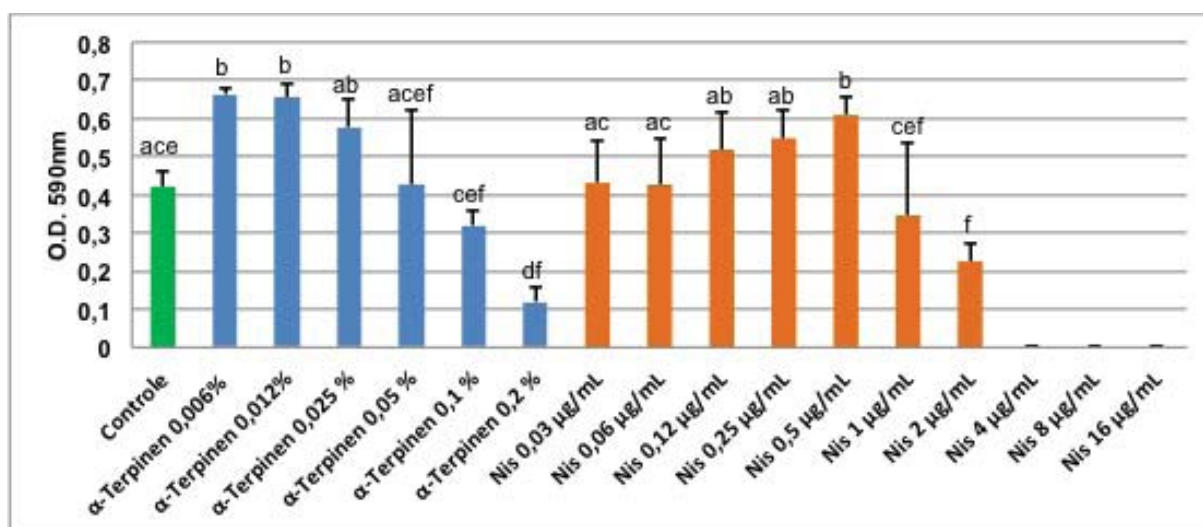
Em relação ao biofilme (gráfico 2), a partir da concentração 0,1% de  $\alpha$ -terpinen houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, sendo que a concentração 0,2% foi mais eficaz. Para a nistatina, concentração 256  $\mu$ g/mL foi capaz de eliminar totalmente o biofilme ( $p < 0.05$ ).

### Teste de viabilidade: XTT

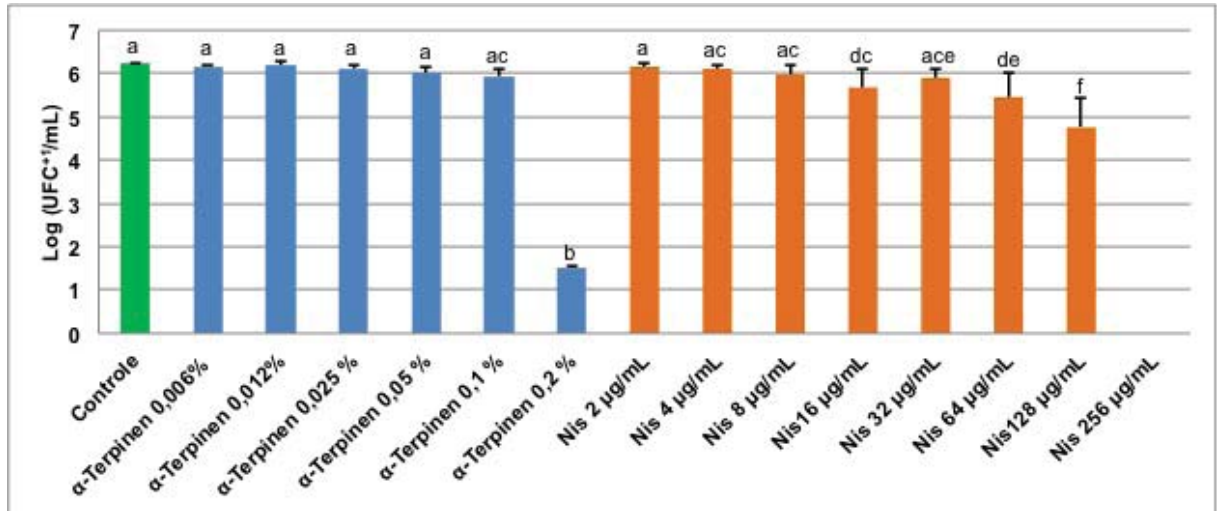
A gráfico 3 mostra que a partir de  $\alpha$ -terpinen 0,1 % e nistatina 256  $\mu$ g/mL houve diminuição da viabilidade celular quando comparado ao controle ( $p < 0.05$ ). Dessa forma, considerou-se que o  $\alpha$ -terpinen é capaz de diminuir, mas não eliminar, a viabilidade celular de *Candida albicans* em biofilme.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) visual e Concentração fungicida mínima (CFM) do  $\alpha$ -terpinen sobre cultura planctônica de *C. albicans* (ATCC 5314).

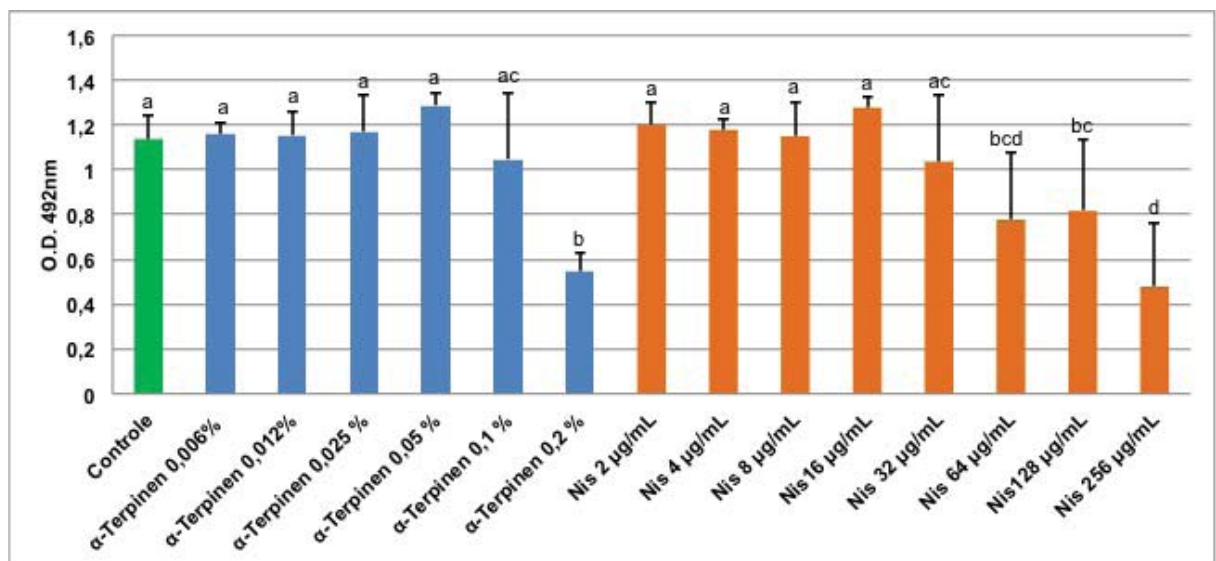
	Concentração Inibitória Mínima	Concentração Fungicida Mínima
$\alpha$ -terpineol	0,2%	0,2%
Nistatina	4 $\mu$ g/mL	8 $\mu$ g/mL



**Gráfico 1.** Atividade antifúngica do  $\alpha$ -terpinen e Nistatina (Nis) sobre culturas planctônicas de *Candida albicans* (ATCC 5314). Letras diferentes indicam diferença estatística. Médias iguais a 0,00 não entram no teste de ANOVA.



**Gráfico 2.** Atividade antifúngica (UFC/mL) do  $\alpha$ -terpinen e Nistatina (Nis) em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 5314). Letras diferentes indicam diferença estatística. Médias iguais a 0,00 não entram no teste de ANOVA.



**Gráfico 3.** Atividade antifúngica (XTT) do  $\alpha$ -terpinen e Nistatina (Nis) em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 5314). Letras diferentes indicam diferença estatística.

## DISCUSSÃO

Existe grande procura por produtos alternativos para tratamentos de infecções, já que há grande disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Nesta linha de pesquisa, como mostrado anteriormente, encontra-se o Tea Tree Oil (TTO), utilizado para tratamento de fungos, principalmente *Candida albicans* (24). O TTO tem mostrado sucesso em diversos estudos, e apresenta propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias. Porém, ainda são necessárias muitas evidências clínicas para o uso seguro do óleo (19).

No presente estudo os efeitos do componente  $\alpha$ -terpinen foram analisados tanto em culturas planctônicas, quanto em biofilmes de *Candida albicans*. A tabela 1 mostra os resultados para CIM e CFM e a gráfico 1 mostra o efeito antifúngico dose-dependente do  $\alpha$ -terpinen nos fungos em suspensão. As concentrações encontradas são semelhantes às descritas na literatura por Ramage et al. (CIM<sub>90</sub> de 0,5%) (25), Trinh et al. (CIM de 0,125% e CFM de 0,25%) (26) e Hammer et al. (CIM entre 0 – 12% e CFM entre 0 – 25%) (27).

Na análise do teste do XTT, o propósito foi verificar a viabilidade do biofilme sobre diferentes concentrações do componente. Pode-se observar que conforme aumenta a concentração, a viabilidade do biofilme diminui. Na quantificação do biofilme (UFL/mL) observa-se que, a partir da concentração 0,1% do  $\alpha$ -terpinen houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Porém, por se tratar de biofilme, a eficácia do  $\alpha$ -terpinen foi menor ao compararmos com os resultados em culturas planctônicas.

No estudo de Ramage et al., (25), o  $\alpha$ -terpinen inibiu o crescimento do biofilme quando este foi tratado por 0, 1 e 2 horas após sua formação, reduzindo rapidamente a viabilidade após 2 min de cerca de 55% do biofilme. Esta atividade manteve-se, reduzindo a viabilidade do biofilme em cerca de 61, 75, e 94% após 5, 15, e 60 min, respectivamente. Os  $\alpha$ -terpinen, assim como terpinen-4-ol, mostraram melhor atividade do que TTO em 60 min.

A *Candida albicans* em muitas formas de avaliação tem alta sensibilidade ao TTO e aos seus componentes.

Este comportamento é explicado por Carson et al. num estudo que mostrou que, assim como foi encontrado para as bactérias, o TTO altera a permeabilidade das células de *Candida albicans* e *Candida glabrata* (19).

Outras pesquisas demonstram que a fluidez da membrana das células de *Candida albicans* é significativamente aumentada, confirmando que o óleo altera substancialmente as propriedades da membrana (28). O TTO também inibe a respiração em *Candida albicans* em uma maneira dependente da dose (29), além de inibir *Candida albicans*, *Candida glabrata*, e *Saccharomyces cerevisiae* por meio de acidificação induzida pela glicose. A acidificação ocorre em grande parte pela expulsão de prótons ATPase de membrana do plasma, a qual é alimentada por ATP derivado da mitocôndria. A inibição desta função sugere que o plasma e / ou membranas mitocondriais foram afetados negativamente. Estes resultados são consistentes com um mecanismo proposto de ação antifúngica no qual TTO provoca alterações ou danos no funcionamento das membranas de fungos (28). No mesmo estudo, os autores demonstraram que o tratamento de *Candida albicans* com óleo e seus componentes alterou tanto a permeabilidade quanto a fluidez da membrana. A formação de tubos germinativos, ou a conversão micelial de *Candida albicans* também é inibida pelo TTO (19).

Considerável atenção tem sido dada para a questão de quais os componentes de TTO são responsáveis pela atividade antimicrobiana. As primeiras indicações são de que a atividade pode ser atribuída principalmente ao terpinen-4-ol e ao  $\alpha$ -terpinen, sendo que o  $\alpha$ -terpinen representa uma percentagem de 2-12% do óleo de *Melaleuca alternifolia*, com CIMs e CFMs que são geralmente os mesmos ou ligeiramente menor do que os valores obtidos para TTO (30).

Sobre a segurança e toxicidade de TTO e seus componentes, estudos avaliam a citotoxicidade de componentes TTO contra várias linhas de células demonstraram que terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpinen, terpinoleno,  $\alpha$ -felandreno, aromadendreno, sabinene e  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno foram mais ativos do que o TTO (31,32), ao passo que 1,8-cineol pareceram ser menos ativos do que TTO (31). No estudo de Ramage et al. o TTO e Terpinen-4ol (CIM<sub>50</sub> = 0,25%) foram citotóxicos tanto para fibroblastos quanto para células epiteliais, porém, ao utilizar 0.5 x CIM<sub>50</sub>, TTO

e Terpinen-4-ol não demonstrou toxicidade (25). No estudo de Nogueira et al. o TTO 0,031% e o Terpinen-4-ol 0.119 % foram citotóxicos para macrófagos, porém  $\alpha$ -terpinen não apresentou redução de 50% da viabilidade em nenhuma das concentrações testadas (0.0064 - 0.0007 %)(15).

Apesar dos avanços na caracterização das propriedades antimicrobianas e anti-inflamatória do TTO e poucos trabalhos terem sido feitos sobre a segurança e a toxicidade do óleo, a razão para o seu uso continuado é em grande parte o uso aparentemente seguro do óleo por quase 80 anos. Evidências ao longo deste tempo sugerem que o uso tópico é seguro e que os eventos adversos são menores, auto-limitados, e pouco frequentes (16).

Apesar dos resultados promissores deste estudo, algumas limitações podem ser encontradas em relação ao curto período de formação do biofilme que pode não ser o suficiente para representar um biofilme dental maduro. Além disso, mais espécies de *Candida* envolvidas com a formação de biofilme devem ser estudadas para fornecer um melhor conhecimento do papel do  $\alpha$ -terpinen na inibição do biofilme.

Assim, de acordo com nossos resultados,  $\alpha$ -terpineol pode ser uma alternativa para tratamento de infecções fúngicas. Pesquisas in vitro e in vivo devem ser realizadas para investigar outros possíveis mecanismos de ação do  $\alpha$ -terpineol e sua segurança e toxicidade, a fim de desenvolver novas formulações que sejam capazes de inibir a adesão e a progressão de infecções por *Candida* spp.

### Correspondência:

Patricia M. Maquera Huacho

e-mail: patricia\_mmaquera@hotmail.com

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Howard KK, Xuesong H, Renate L, Maxwell HA, Wenyuan S. Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71:653-670.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88:982-990.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005; 1:589-595.
- Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 3:204-211.
- Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 34-39.
- Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol.* 2005; 3:7-15.
- Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15:4-12.
- Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Cury AADB. Effects of Nystatin, Fluconazole and Propolis on Poly (Methyl Methacrylate) Resin Surface. *Braz Dent J.* 2008; 19: 190-196.
- Cione APP, Liberale MJ, Silva PM. Development and validation of an HPLC method for stability evaluation of nystatin. *Braz J Pharm Sci.* 2010; 46: 305-310.
- Lavra ZMM, Sonogo F, Silva RMF, Medeiros FPM. Development and validation of an analytical method for Nystatin vaginal cream by high performance liquid chromatography. *Braz J Pharm Sci.* 2008; 44: 637-643.
- Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8:217-226.
- Abe S, Maruyama N, Hayama K, et al. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential Oils. *Mediators Inflamm.* 2003; 12:323-328.
- Oliveira ACM, Spolidorio DMP, Fontana A, et al. Use of *M. alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. *Rev Bras Pl Med.* 2011; 13(4): 492-499.
- Sun LM, Zhang CL, Li P. Characterization, antibiogram, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with Terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(24): 6150-6156.
- Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res.* 2014; 63:769-778.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:914-920.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91:492-497.
- Mann CM, Cox SD, Markham JL. The outer membra-

- ne of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett Appl Microbiol.* 2000; 30: 294–297.
19. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *ClinMicrobiol Ver.* 2006; 19:50-62.
  20. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:195–199.
  21. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A2. 2nd.ed. 2002. Wayen, PA: CLSI.
  22. Thein ZM, Smaranayake YH, Smaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS.* 2007;115: 1241-1251.
  23. Groppo FC, Ramacciato JC, Simoes RP, Florio FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J.* 2002; 52(6): 433-437.
  24. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 2006;6:158-165.
  25. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, et al.. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol.* 2012; 3:220.
  26. Trinh HT, Lee IA, Hyun YJ, Kim DH. *Artemisia princeps* Pamp. Essential oil and its constituents eucalyptol and  $\alpha$ -terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF- $\kappa$ B activation. *Planta Med.* 2011; 77:1996–2002. doi: 10.1055/s-0031-1280094
  27. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J appl Microbiol.* 2003; 95: 853–860.
  28. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53:1081–1085.
  29. Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl. Microbiol.* 2000; 88:170-175.
  30. Williams LR, Home VN, Asre S. Oils of *Melaleuca alternifolia*. Their antifungal activity against *C. albicans* in perspective. *Int J Aromatherapy.* 1990; 2:12-13.
  31. Hayes AJ, Leach DN, Markham JL. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *J Essent Oil Res.* 1997; 9:575–582.
  32. Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med.* 2000; 66:366–368.

Recibido: 18-12-2018  
Aceptado: 06-05-2019