



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LILIAN MARIA DAMAS RAMOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DEORÉGANO (OEO) COM NANOPARTÍCULA DE PRATA
BIOLÓGICA (AgNPsbio) CONTRA *Candida albicans* SC5314**

LILIAN MARIA DAMAS RAMOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DEORÉGANO (OEO) COM NANOPARTÍCULA DE PRATA
BIOLÓGICA (AgNPsbio) CONTRA *Candida albicans* SC5314**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto Almeida.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ramos, Lílian Maria .

Atividade antifúngica de óleo essencial de orégano (OEO) com nanopartículas de prata biológica (AgNPsbio) contra *Candida albicans* SC5314 / Lílian Maria Ramos. - Londrina, 2016.

50 f. : il.

Orientador: Ricardo Sérgio de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* - Teses. 2. Composto natural com atividade antifúngica - Teses. 3. Nanotecnologia - Teses. I. de Almeida, Ricardo Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

LILIAN MARIA DAMAS RAMOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DEORÉGANO (OEO) COM NANOPARTÍCULA DE PRATA
BIOLÓGICA (AgNP_{Sbio}) CONTRA *Candida albicans* SC5314**

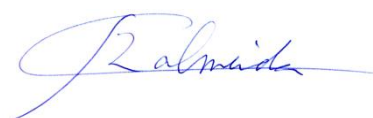
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Idessânia Nazareth da Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Aprovada em: 25 de setembro de 2015.



Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto Almeida
Orientador
Universidade Estadual de Londrina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por terem possibilitado e provido toda a minha educação, pela compreensão, carinho, paz e força principalmente no momento que estive incapaz de prosseguir.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto Almeida, por ter me acolhido e me direcionado na vida acadêmica e científica com muita paciência e respeito.

Aos professores Luciano Ap^o Panagio, Gerson Nakazato, Renata Kobayashi, Alexandre

Tadachi Morey, que sempre estiveram presentes em minha caminhada científica, também compartilhando seu vasto conhecimento de maneira muito prestativa e sempre me auxiliando sabiamente frente aos vários percalços encontrados;

À Profa Dra. Ionice Felipe por me acolher e compartilhar seu vasto conhecimento de vida e de pesquisa.

À minha amiga e companheira Raquel Arruda por ser meu braço direito e ombro amigo nos momentos mais difíceis dessa caminhada

À minha amiga Claci Sandra pela inestimável ajuda não somente no cotidiano laboratorial mas também fora dele;

Às minhas amigas de laboratório Loana, Andressa, Patrícia, Karla, Aline e ao meu amigo Felipe, pela amizade sincera, companhia e momentos de descontração.

Aos amigos de pesquisa, Sara, Juan, Alane e Sandy que sempre estiveram presentes em meu cotidiano, me auxiliando não somente nos experimentos, mas dando apoio em inúmeros momentos de dúvida.

Aos companheiros de turma Vanessa, Renata, Erick, Caio, Luiz e Lully pela amizade e apoio durante nossa jornada comum;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado.

A todos os professores, alunos e funcionários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração e ótima convivência.

Ao meu esposo, Fagner Rodrigues de Lima, que para o bem ou para o mal, sempre esteve ao meu lado nesta batalha, se estressando com meu estresse, se cansando com meu cansaço e aprendendo com os erros, como eu também aprendi.

Ao meu filho Inácio, por ser minha razão de continuar lutando.

RAMOS, Lilian Maria Damas. **Atividade antifúngica de óleo essencial de orégano com nanopartículas de prata biológica contra *Candida albicans***. 2015. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A nanotecnologia tem emergido no século XXI como uma ciência interdisciplinar, da mesma forma, a busca por fitoterápicos tem se tornado comum, devido à necessidade da redução de efeitos colaterais e surgimento de micro-organismos resistentes. A proposta deste estudo foi investigar os efeitos da utilização das nanopartículas de prata biológica (AgNPbio) e do óleo essencial de orégano (OEO) contra uma cepa de *Candida albicans* SC5314 em células epiteliais de linhagem FaDu (orofaringe). As sensibilidades da cepa para AgNPbio e OEO foram avaliadas pelo teste de microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), que foi de 15,6 μM (CIM) e 31,2 μM (CFM) para a AgNPbio e 0,12% (CIM e CFM) para o OEO. O tipo de interação entre AgNP/OEO na atividade antifúngica foi avaliada pelo método de “checkerboard” pelo cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os dados obtidos mostraram a ocorrência de sinergismo entre AgNPbio e OEO. Também foram realizados ensaios de filamentação utilizando OEO, onde se observou que este reduziu a formação de hifas pelo fungo. Além destes foram realizados testes de invasão e endocitose, por meio de permeabilização das células epiteliais e coloração diferencial, onde se observou redução estatisticamente significativa na endocitose com a utilização das AgNPs. A avaliação do efeito protetor de AgNPbio/OEO sobre o dano às células FaDu por *C. albicans* mostrou resultados positivos. Desta forma, observamos que os compostos testados interferem na patogenicidade do fungo, como a endocitose e filamentação do fungo, sugerindo uma interessante alternativa para o controle da candidíase.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. *Candida albicans*. Óleo essencial de orégano. Células epiteliais.

RAMOS, Lilian Maria Damas. **Antifungal activity of oregano essential oil in combination with biological silver nanoparticles against *Candida albicans***. 2015. 50 p. Thesis (Master's Degreee in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The nanotechnology has emerged in the century XXI as an interdisciplinary Science, of the same form, the search for herbal drugs has become commonplace, due to need to reduce collateral effects and appearance of resistant microorganisms. The purpose of this study was to investigate the effects of the utilization of biological silver nanoparticles (AgNPbio) and oregano essential oil (OEO) against one *Candida albicans* strain. For experiments was used the typical strain SC5314, and epithelial lineage cells FaDu. The sensitivities of the strain to AgNPbio and OEO were evaluated by broth microdilution assay, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), which were of 15.6 μM (MIC) and 31.2 μM (MFC) for AgNPbio, and 0.12% (MIC and MFC) for OEO. The type of interaction between AgNPbio/OEO on antifungal activity was evaluated using the "checkerboard" method and the calculation of the fractioned inhibitory concentration index (FICI). The data showed the occurrence of synergism between AgNPbio and OEO. Were also carried out filamentation tests using OEO, where was observed that this reduced the formation of the hyphae by fungal. In addition to these, invasion and endocytosis assays were performed by differential staining, on which we observed a statistically significant a reduction in endocytosis with the use of AgNPbio. The evaluation of protector effect of AgNPbio/OEO on the damage to FaDu cells by *C. albicans* showed positive results. Thus, we observed that the compounds tested step in the fungi pathogenicity such as endocytosis and fungi filamentation, suggesting an interesting alternative to the candidiasis control.

Keywords: Silver nanoparticles. *Candida albicans*. Oregano essential oil. Protection. Epithelial cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP	Nanopartícula de prata
AgNPbio	Nanopartícula de prata biológica
AgNPs/FLC	Associação de nanopartículas de prata com fluconazol
ALS	Agglutinin - like sequence
ANSI	American National Standards Institute
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
HWP1	Hyphal Wall Protein 1
ICIF	Índice Concentração Inibitória Fracionada
ISSO	International Organization for Standardization
LDH	Lactato Desidrogenase
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NP	Nanopartícula
OEO	Óleo Essencial de Orégano
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
SAPs	Aspartil proteinases secretadas
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
YPD	Yest extract Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	<i>Candida albicans</i>	9
1.2	POLIMORFISMO E PROCESSOS DE INVASÃO E DANO ÀS CÉLULAS EPITELIAIS PELO FUNGO	11
1.4	ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO	16
1.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE <i>Fusarium oxysporum</i>	17
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	ARTIGO	32
	<i>Conclusão</i>	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans*

Taxonomicamente, o gênero *Candida* é um membro da família Candidaceae, na ordem Saccharomycetes, pertencente à classe Hemiascomycetes, do filo Ascomycota, do reino Fungi. Aproximadamente 150 espécies pertencem ao gênero *Candida*, mas somente 13 espécies estão associadas a infecções em humanos (ODDS, F. C 1988; CALDERONE, R.A 2002 apud ALMEIDA, 2009). *C. albicans* pode viver tanto como um comensal inofensivo sobre a pele humana e superfícies mucosas quanto como um patógeno agressivo que causa uma grande variedade de doenças, desde candidíase orofaríngea até disseminada (HUMMERT et al., 2010). A candidemia é geralmente de difícil diagnóstico, tratamento e apresenta índices de mortalidade que se aproximam a 50% e com altos custos ao sistema de saúde (WILLE et al., 2013). Infecções sanguíneas por *Candida* correspondem à quarta causa de infecções sanguíneas hospitalares nos Estados Unidos da América, sendo responsáveis por até 10% de todas as infecções sanguíneas em pacientes hospitalizados (CORZO-LEON et al., 2014). Nucci e colaboradores (2013) publicaram um estudo de vigilância realizado na América Latina que foi conduzido entre novembro de 2008 e outubro de 2010, reportando uma incidência de 1,18 episódios de candidemia para cada 1000 admissões, sendo que *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* contabilizaram mais de 80% dos casos. No Brasil, ainda são escassos os estudos de vigilância sobre infecções fúngicas, o trabalho de Colombo et al. (2006) foi o último grande estudo publicado sobre a epidemiologia da candidemia no Brasil, este foi um estudo vigilância laboratorial prospectivo em 11 hospitais terciários públicos de 9 grandes cidades brasileiras, onde avaliaram a incidência, distribuição das espécies, frequência de resistência antifúngica, e fatores de risco para candidemia devido à espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. Neste estudo observaram uma incidência de 1.49 a 5.30 casos a cada 1000 admissões, sendo espécies do gênero *Candida* o 4º patógeno isolado com mais frequência em culturas sanguíneas, e dentre o gênero, *C. albicans* a espécie mais incidente representando 40,9% dos casos. Após este, estudos sobre a incidência de infecções por *Candida* foram publicados de forma a demonstrar sua incidência em determinadas condições. Bergamasco et al. (2012) observaram a epidemiologia de candidemia em pacientes com câncer hematológico e tumores sólidos em 4 regiões do Brasil, neste estudo *C. albicans* também foi a espécie mais frequente, tanto em pacientes com câncer hematológico quanto em

pacientes com tumores sólidos, seguido por *C. tropicallis* e *C. parapsilosis*. Em um estudo regionalizado, avaliando a epidemiologia de candidemia durante 11 anos no Hospital São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil, Wille et al. (2013) observaram um aumento na incidência de candidemia ao decorrer do tempo. Também neste estudo, *C. albicans* foi a espécie mais encontrada. Silva-Rocha et al. (2014), publicaram um estudo avaliando a distribuição de espécies de *Candida*, realizando genotipagem e avaliando fatores de virulência isolados da cavidade oral de pacientes receptores de transplante de rim em 2 cidades de 2 diferentes regiões do Brasil. Este Estudo apresentou resultados extremamente interessantes como os isolados obtidos na região Sul expressaram de forma mais eficiente todos os fatores de virulência in vitro, sendo que 40% dos isolados obtidos nessa região vieram de lesões, enquanto apenas 18,4% dos isolados da cidade da região Norte foram de infecções. Além disso apontou mais uma vez *C. albicans* como a espécie mais frequentemente isolada e também a mais virulenta.

C. albicans é considerada a mais virulenta dentre as espécies do gênero, onde também se destacam as espécies de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (NAGLIK et al., 2011). Arendrup (2013) avaliou a patogenicidade de oito diferentes espécies de *Candida* através de infecção hematogênica em ratos, observando que as únicas espécies que levaram a morte foram *C. albicans* e *C. tropicalis*. Ao contrário de certas bactérias patogênicas que expressam uma única toxina como fator de virulência (por exemplo, o *Clostridium tetani*), *C. albicans* apresenta uma variedade de fatores que contribuem para sua virulência. Entretanto, ao invés de expressar esses fatores conjuntamente, foi demonstrado que dependendo do nicho do hospedeiro cada fator pode ser expresso de forma diferenciada, podendo para o desenvolvimento de uma infecção ou uma relação de comensalismo (ALMEIDA, 2009).

Os principais fatores de virulência de *C. albicans* compreendem adesão, formação de hifas, capacidade de responder a mudanças de pH, secreção de hidrolases, formação de biofilme, “switching” fenotípico, bem como fatores específicos associados com a invasão, dano celular e indução ou evasão da resposta imune. Estes fatores podem contribuir para sua sobrevivência, atividade e persistência no hospedeiro (MOHANDAS, BALLAU, 2011; NAGLIK et al., 2011; YANG, 2003). Os fatores de virulência também podem variar de acordo com o tipo de ambiente, por exemplo, podem-se destacar diferenças entre a patogênese da candidíase orofaríngea e sanguínea, tendo em vista que o microambiente da orofaringe, que contém células epiteliais, proteínas salivares antimicrobianas e várias espécies de bactérias, é distinto daquela dos vasos sanguíneos, que contém as células endoteliais, células sanguíneas,

proteínas plasmáticas e é normalmente estéril (PARK et al., 2009). Este fato somado às diferenças encontradas na expressão de genes isolados de cada local levam a acreditar que diferentes determinantes de virulência e diferentes vias regulatórias permitem a *C. albicans* iniciar e manter uma infecção em diferentes microambientes do hospedeiro (PARK et al., 2009). Fortalecendo esta ideia, Dalle e colaboradores (2010) observaram que *C. albicans* é capaz de invadir células de diferentes sítios anatômicos através de diferentes mecanismos, que serão discutidos posteriormente.

1.2 POLIMORFISMO E PROCESSOS DE INVASÃO E DANO ÀS CÉLULAS EPITELIAIS PELO FUNGO

C. albicans é um fungo polimórfico que possui a habilidade de mudar rapidamente entre as formas leveduriforme e filamentosa (HAN, CANNON, VILLAS-BÔAS, 2011). Podendo crescer como células leveduriformes arredondadas, hifas filamentosas, que correspondem a cadeias de células alongadas de paredes paralelas sem constrições no septo, ou pseudohifas que apresentam cadeias de células variavelmente alongadas com constrições nos septos, sendo estas duas últimas formas denominadas na literatura como formas filamentosas (KUMAMOTO, VINCES, 2005). Esta capacidade de transição pode ser considerada um fator de virulência crítico, já que as formas filamentosas se demonstram essenciais para a invasão através do tecido hospedeiro e também apresentam alta resistência à fagocitose, devido à sua morfologia, ao passo que, a forma de levedura demonstra ser importante para a disseminação através do sistema sanguíneo e aderência às superfícies endoteliais (HAN, CANNON, VILLAS-BÔAS, 2011).

Devido à aderência ser essencial para *C. albicans* persistir sobre as superfícies mucosas, este organismo expressa múltiplas estruturas de superfície diferentes que medeiam a aderência às células epiteliais. Estas várias estruturas denominadas adesinas, frequentemente são expressas de forma diferente em leveduras e hifas, promovendo a aderência por meio de diferentes mecanismos (ZHU, FILLER, 2010). A adesão requer interação entre a parede celular do fungo e a superfície das células epiteliais, variando entre interações não específicas, como por exemplo, hidrofobicidade e específicas como ligações proteína-proteína (NAGLIK et al., 2011). De fato, o contato físico da levedura com as células epiteliais é suficiente para desencadear rapidamente a formação de hifas e expressão de genes que medeiam a adesão como as adesinas, incluindo membros da família Als (Agglutinin-like-sequence) e Hwp1 (Hyphal wall protein 1) (MARTIN et al., 2011). Hwp1 é uma manoproteína de parede celular

que é expressa especificamente na superfície da hifa, sendo reconhecida pela célula hospedeira como um substrato para a atividade da transglutaminase da superfície das células epiteliais orais (MARTIN et al., 2011; SOHN et al., 2003). No entanto, a família de adesinas identificadas que possui um maior papel na ligação epitelial é a família Als, particularmente a Als3 como uma proteína hifa-específica (NAGLIK et al., 2011). Também foi demonstrado que Als3 pode atuar como uma invasina podendo desencadear a endocitose pela célula hospedeira (PHAN et al., 2007) e também atuar como um receptor de ferritina, facilitando a aquisição de ferro (ALMEIDA et al., 2008).

Após a adesão à célula hospedeira, a invasão é importante para a patogênese da candidíase mucosa, já que foi observado que *C. albicans* mutantes com capacidade reduzida de invadir as células epiteliais *in vitro* normalmente apresentam virulência reduzida em modelos de experimentação animal (ZHU, FILLER, 2010). Os processos de invasão podem apresentar muitos benefícios para os microrganismos, já que, um estilo de vida intracelular pode promover proteção contra o sistema imune, evitar competição com outros microrganismos comensais, dar proteção contra tratamentos antimicrobianos, permitir acesso à nutrientes e auxiliar na transposição de barreiras a fim de colonizar tecidos sub-epiteliais profundos ou iniciar uma infecção sistêmica (DALLE et al., 2010).

Resultados de alguns estudos sugerem que *C. albicans* pode invadir células epiteliais por dois mecanismos distintos. (DALLE et al., 2010; WACHTLER et al., 2012). Um destes mecanismos é a indução da endocitose das hifas pela célula epitelial. Neste mecanismo, a endocitose é induzida por proteínas parecidas com invasinas que são expressas na superfície da hifa de *C. albicans*. Estas proteínas ligam as proteínas de superfície induzindo-a a produzir estruturas semelhantes a pseudópodes que engolfam o microrganismo e levam-no para seu interior (ZHU, FILLER, 2010). Os primeiros passos para este processo são dirigidos pelas células hospedeiras já que foi observado que hifas mortas são internalizadas eficientemente mesmo não causando danos a célula que a endocitou (MORENO-RUÍZ et al., 2009). Para o melhor entendimento deste processo, devemos entender o que é e como pode ocorrer a endocitose em células animais. A endocitose pode ser definida como um processo biológico dependente de energia, vital para células eucarióticas, e altamente conservado entre tipos celulares e espécies, acontecendo com o rearranjo dinâmico da membrana, dos microtúbulos, dos filamentos de actina e filamentos intermediários, todos estes, constituintes do citoesqueleto da maioria das células eucarióticas (DALY, 2004; FERREIRA et al., 2014). O processo de endocitose envolve múltiplos estágios, no primeiro acontece o “engolfamento” da partícula em invaginações da membrana que são comprimidas para formar vesículas envoltas

pelas mesmas também conhecidas como endossomas, estas formam uma população heterogênea no interior da célula e podem ser equipadas com diferentes maquinarias endocíticas, podendo se originar de diferentes regiões da membrana celular. No segundo passo, os endossomas carregam a partícula até estruturas vesiculares especializadas, que permite a triagem da carga e finalmente, esta é levada a vários compartimentos intracelulares, reciclada para o meio extracelular ou carregada através das células, num processo denominado transcitose (SAHAY et al., 2010). Sendo assim, esses eventos de internalização dependem de eventos orquestrados que requerem o funcionamento coordenado de lipídios e proteínas da membrana plasmática, de forma que vários aspectos são importantes para determinar a via de internalização de um material, como o tipo de interação que se estabelece com a membrana plasmática, a maquinaria celular associada e o tipo de regulação, podendo-se dividir as vias de endocitose em; endocitose mediada por clatrina, mediada por caveolina e endocitose independente de caveolina e clatrina (SAHAY et al., 2010; SAMAJ et al., 2004). A endocitose mediada por clatrina, é um dos mecanismos de internalização em células eucarióticas mais estudados, sendo observado pela primeira vez por Roth e Porter em 1964, ao investigarem a endocitose de proteínas em gema de oocisto do mosquito *Aedes aegypti* (FERREIRA et al., 2014). Logo depois, Pearse (1976), avaliou a formação de vesículas em membranas sinápticas, observando a presença de estruturas proteicas que revestiam as vesículas em formação, sendo capazes de interagir com outras moléculas e serem transportadas para compartimentos celulares específicos. A endocitose mediada por clatrina é considerada uma rota clássica de internalização e importante por ser responsável pela internalização de vários nutrientes essenciais, bem como complexos de receptores de membrana, citocinas, neurotransmissores, patógenos, antígenos e lipoproteínas (FERREIRA et al., 2014). A endocitose mediada por caveolina é considerada a via fisiológica da transcitose, esta não se encontra presente em algumas células de linhagem tumoral como, por exemplo, células PC3. Caveolinas são proteínas incorporadas na porção citosólica da membrana plasmática e com porções N- e C-terminais voltadas para o citoplasma, são encontradas em invaginações da membrana plasmática em forma de vesículas e têm sido importantes na nanomedicina por ter sido sugerida como via de escape à degradação lisossomal (FERREIRA et al., 2014).

Os primeiros estudos relacionados à endocitose induzida por microrganismos foram realizados utilizando a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*, que também possui a capacidade de invadir células hospedeiras através da interação com E-caderinas, neste caso, o efector bacteriano que reconhece as E-caderinas é uma proteína de superfície denominada

internalina, pertencente à família das internalinas, uma grande família de proteínas que possuem repetições ricas em leucina (BIERNE et al., 2007; MORENO-RUÍZ et al., 2009). Esta via, que mimetiza a via de formação de junções aderentes, envolve o recrutamento de cateninas β e α , ARHGAP10, Arf6 e vezatina, bem como a ativação do complexo Arp2/3, todos estes importantes constituintes do citoesqueleto. Sendo que estudos demonstraram que a invasão de *L. monocytogenes* requer proteínas normalmente envolvidas em várias vias endocíticas incluindo clatrina, dinamina e caveolina. Clatrina e suas proteínas associadas estão de fato envolvidas na internalização de uma grande variedade de patógenos incluindo vírus e bactérias, contudo ainda é previamente desconhecido quão similar são as vias de internalização de fungos, que são grandes quando comparados a vírus e bactérias (MORENO-RUIZ et al., 2009).

De forma interessante, a fenda encontrada na região N-terminal da Als3 de *C. albicans* é estruturalmente similar aos domínios de repetição rica em leucina das internalinas bacterianas, sendo também identificado que tanto as internalinas quanto a Als3 induzem a captura do patógeno mediada pelo rearranjo do citoesqueleto de actina. (MORENO-RUÍZ et al., 2009; PHAN et al., 2007). *C. albicans* é capaz de induzir sua endocitose por várias linhagens celulares, incluindo células HeLa, células esofágicas HET-1, células faríngeas FaDu, células epiteliais orais OKF6/TERT-2, e epitélio humano reconstituído (ZHU, FILLER, 2010). Ela é induzida pela interação da adesina Als3 da parede celular com as E-caderinas presentes na membrana plasmática das células epiteliais. Esta interação estimula o rearranjo de actina na célula hospedeira, indicando que *C. albicans* seqüestra a maquinaria endocítica dependente de clatrina, com o recrutamento de cortactina, para invadir células do hospedeiro (MORENO-RUÍZ et al., 2009).

O aumento de rotas de invasão independentes de actina da célula hospedeira (penetração ativa) é proporcional à diminuição da endocitose induzida (dependente de actina). Assim, sugeriu-se que a endocitose induzida seria a via principal nos estágios precoces de interação fungo hospedeiro, enquanto o mecanismo independente de actina seria a principal via em estágios tardios (DALLE et al., 2010).

Apesar da interação Als3-E-caderinas representar um mecanismo maior da endocitose induzida, outros mecanismos permanecem desconhecidos (WÄCHTLER et al., 2012). Moreno-Ruíz e colaboradores (2009) realizaram RNAsi “knockdown” de componentes da via, incluindo clatrina, dinamina e cortactina, e observaram inibição da endocitose de *C. albicans* em aproximadamente 60%. Este fato sugere a existência de vias sinalizadoras adicionais que também governam este processo (ZHU, FILLER, 2010).

Depois da Als3, a proteína de choque-térmico Ssa1 expressa na parede celular de *C. albicans*, surge como a segunda invasina identificada. Ela mostrou se ligar às caderinas da célula hospedeira, demonstrando ser suficiente para induzir a endocitose e ser essencial para que *C. albicans* possa causar dano máximo às células do hospedeiro e induzir candidíase orofaríngea e disseminada (SUN et al., 2010).

C. albicans, como dito anteriormente, pode invadir as células por um processo ativo que é independente da endocitose denominado de penetração ativa. A penetração ativa requer a formação de hifa e não é inibida quando as células epiteliais são tratadas com um inibidor de microfilamentação como a citocalasina D (DALLE et al., 2010). Desta forma, o microrganismo pode invadir uma célula epitelial sem induzir a formação de pseudópodes pela mesma ou passar através da junção intercelular entre as células. (ZHU, FILLER, 2010). Neste mecanismo pode ocorrer a penetração ativa de uma hifa dentro ou entre as células epiteliais (ZHU, FILLER, 2010), podendo invadir células de diferentes sítios anatômicos. *C. albicans* apresenta mecanismos diferentes conforme o tipo celular, sendo capaz de invadir células epiteliais de linhagem oral através dos dois mecanismos citados ao passo que em células de linhagem gastrointestinal a invasão se dá somente através de penetração ativa (DALLE et al., 2010).

Ainda não se conhece exatamente quais proteínas fúngicas contribuem para a penetração ativa (NAGLIK et al., 2011). Acredita-se que pressões físicas do crescimento da hifa em combinação com enzimas hidrolíticas como proteases, lipases, hidrolases ou fosfolipases são responsáveis para esta forma de invasão (MARTIN et al., 2011). Provavelmente, a adesina Als3 contribui para a penetração ativa através de mecanismos indiretos como ligação ao epitélio. As enzimas Sap (Aspartil proteases) podem contribuir para a facilitação da penetração da hifa entre as junções intercelulares ao invés da penetração no interior das mesmas (NAGLIK et al., 2011).

Após o processo de invasão ocorre a indução do dano tecidual. Esta pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos: necrose e apoptose (NAGLIK et al., 2011). A necrose é caracterizada por uma tumefação mitocondrial e aumento na permeabilidade da membrana plasmática, sendo induzida por fatores externos à célula podendo ser causada diretamente pelos fatores da hifa de *C. albicans* (NAGLIK et al., 2011). Em células animais, a morte por apoptose pode ser desencadeada por diferentes estímulos extracelulares e intracelulares resultando na ativação de vias sinalizadoras, como resultado, a degradação mitocondrial e a fragmentação do genoma nuclear são as maiores respostas celulares características de apoptose sendo conduzidas por múltiplas nucleases ativadas por vias sinalizadoras (SHEPER

et al., 2008). Estudos sobre apoptose em células epiteliais são raros, algumas vezes controversos sendo que muitas evidências da indução da apoptose celular vem novamente dos estudos com bactérias. No entanto, sabe-se que *C. albicans* pode inativar proteínas anti-apoptóticas BC-1 e Bcl-xL em macrófagos e neutrófilos podendo ativar a quebra das caspases (NAGLIK et al., 2011). Observando a grande variedade de atributos de virulência deste fungo, cresce a cada dia a necessidade de busca por antimicrobianos que possam controlar a infecção de forma mais rápida e eficaz, sendo alternativas aparentemente atrativas a utilização de fitoterápicos como o óleo essencial de orégano e também de produtos derivados da nanotecnologia, como as nanopartículas de prata biológica.

1.4 ÓLEO ESSENCIAL DE OREGANO (*Origanum vulgare*)

O gênero *Origanum* possui 60 espécies utilizadas como temperos, sua maioria pertencente às famílias *Lamiaceae* e *Verbaceae*, sendo que destas, *Origanum vulgare* se enquadra entre as de maior importância econômica (BETANCOURT, 2012). *Origanum vulgare* é uma erva aromática que ocorre em toda a Ásia, Europa e norte da África. Na medicina popular, a erva é utilizada em distúrbios respiratórios, dispepsia, dismenorréia, artrite reumatoide e distúrbios urinários. Além de ser utilizada como erva culinária na gastronomia (TEIXEIRA et al., 2013). É uma espécie geneticamente heterogênea devido seu cruzamento natural através da polinização. Esta heterogeneidade resulta em uma grande variação em seu conteúdo fenólico, fato este que faz com que apresentem diferentes padrões de toxicidade (CHUN et al., 2005).

Os óleos essenciais são frações voláteis naturais, extraídas de plantas aromáticas que evaporam a temperatura ambiente. Há milhares de anos estes vem sendo extraídos de plantas e usados nas indústrias de perfumes, cosméticos e fármacos de uso geral (SANTOS et al., 2004). Óleos essenciais derivados de plantas aromáticas são bem conhecidos na medicina tradicional como agentes antimicrobianos e são caracterizados por um amplo espectro de atividade, incluindo propriedades antifúngicas, como preservadores de alimentos, inibidores da produção de micotoxinas e como agentes antimicóticos (POZZATTI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013).

Nos processos de extração do óleo essencial podem ser aplicados diversos métodos, tais como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e micro-ondas. O método de maior aplicação é o de hidrodestilação, que por sua vez pode dividir-se em duas técnicas; arraste a vapor e coação, sendo que a principal

técnica de extração de óleos essenciais é a de arraste a vapor (BIZZO, 2009; SANTOS et al., 2004). Esta consiste numa técnica de extração onde a temperatura de ebulição do sistema está abaixo da ebulição dos componentes puros, conseguindo desta forma volatilizar ainda abaixo da temperatura de ebulição do composto mais volátil, possuindo assim a vantagem de conseguir purificar substâncias orgânicas que são frágeis, devido às condições extraordinariamente suaves (ISENMANN, 2015).

O óleo essencial de orégano (OEO) apresenta como características importantes; elevada estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos, fazendo com que a atividade antimicrobiana e os mecanismos de ação, bem como de seus dois principais constituintes, timol e carvacrol, sejam extensamente documentados nas últimas décadas (BETANCOURT et al., 2012; CLEFF, 2008). Chami e colaboradores (2015) avaliaram atividade antifúngica dos óleos essenciais de orégano e cravo utilizando uma cepa de *Sacharomyces cerevisiae*, sugerindo que estes óleos essenciais afetam a parede celular das células deste fungo. Além deste, muitos outros trabalhos atribuem ao OEO propriedades antibacterianas (BETANCOURT et al., 2012; CHUN et al., 2005; KARAKAYA et al., 2011), antifúngicas (CHAMI et al., 2005; CLEFF et al., 2010; POZZATTI et al., 2010; SRIVATSTAVA et al., 2013) e até mesmo antiparasitárias (EL BABILI, BOUJILA, SOUCHARDJ, 2011), consolidando assim sua importância na utilização como composto antimicrobiano. Apesar de apresentar destacadas propriedades antimicrobianas, a ação citotóxica de diferentes compostos derivados do orégano, como OE e extrato alcoólico sobre células de linhagem epiteliais também vem sendo observada (BEGNINI et al., 2014; BERRINGTON, LALL, 2012; GRONDONA et al., 2014; KOLDAS et al., 2014; LLANA-RUIZ-CABELLO et al. 2014; OZKAN, ERDOGAN, 2011), abrindo um discussão se citotoxicidade observada se deve à sua atividade anticancerígena (HABIBI et al., 2014; HABIBI et al., 2015; MISHARINA et al., 2013) ou por toxicidade em si, já que tiveram sua eficácia comprovada também como inseticida (ABOU-TALEB et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2013; KARPOUHTSIS et al., 1998).

1.5 NANOPARTICULA DE PRATA DE *Fusarium oxysporum*

O conceito de nanotecnologia foi apresentado pela primeira vez por Richard Feynman (1959) o prefixo “nano” em termos de nanotecnologia é derivado da palavra grega nanos, que significa “anão”, este se refere a qualquer matéria modificada que apresenta o tamanho de até um bilionésimo do metro (10^{-9} m) sendo referido na escala comonânômetro (HUKOLTI,

TARANATH, 2014). Nano-objetos são definidos pela organização internacional de padronização (ISO) e Instituto Nacional Americano de Padrões (ANSI) como um material com um, dois ou três dimensões externas com tamanho variado entre 1 a 200 nm (LIN, MONTEIRO-RIVIERE, RIVIERE, 2014). A evolução do uso de NPs na biomedicina tornou-as indispensáveis, desenvolvendo um papel importante na área de diagnósticos, imagenologia, sensoriamento e também distribuição de drogas (QUESTER, 2013). Nanopartículas podem ser sintetizadas por meio de métodos químicos, físicos e biológicos. Contudo, os métodos de redução químicos são os mais comumente utilizados (MORITZ et al., 2013), embora sejam reconhecidamente não ecológicos (ISAAC, SAKTHIVEL, MURTHY, 2013).

A síntese de nanopartículas é baseada usualmente em técnicas de dispersão e condensação que correspondem na nomenclatura recente a métodos “top-down” ou “de cima para baixo”, que consiste na miniaturização de estruturas maiores e métodos “bottom-up” de “baixo para cima”, que empregam processos de agregação e auto-organização (OCWIEJA et al., 2015). Apresentam freqüentemente propriedades diferentes do material bruto, mesmo sendo formadas pelos mesmos átomos (SOLOMON, 2007). Por exemplo, a prata em sua forma iônica apresenta como desvantagem a fácil inativação dos íons por complexação e precipitação, tendo assim seu uso limitado. Por outro lado, as nanopartículas de prata (AgNPs) possuem um tamanho menor, maior proporção de área de superfície por volume e maior área de superfície disponível para contato com os microrganismos (MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2013). Sendo que, tamanho, forma, distribuição de tamanho e superfície das NPs são considerados fatores chave que determinam suas propriedades específicas (MORITZ, GESZHE-MORITZ, 2013).

Nos últimos anos, nanopartículas metálicas, tiveram sua importância reconhecida na química, física e biologia devido suas propriedades fototérmicas, elétricas e ópticas (ISAAC, SAKTHIVEL, MURTHY, 2013). AgNPs apresentam uma grande variedade de aplicações práticas na biologia, medicina, análises química, catalises, eletrônica, cosméticos, indústrias têxtil e farmacêutica (OCWIEJA et al., 2015). Devido sua grande importância e necessidade de busca por técnicas de produção sustentáveis, métodos de produção biológica vêm sendo desenvolvidos pela utilização de microrganismos (BHAINSA, SOUZA, 2006; DURÁN et al., 2005), extratos de plantas (PARK, 2014; RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2013) e até mesmo açúcares (RAVEENDRAN, FU, WALLEN, 2003), estes esforços visam a eliminação total ou pelo menos a minimização dos resíduos gerados pela implementação de processos sustentáveis (RAVEENDRAN, FU, WALLEN, 2003). O mecanismo envolvido na biossíntese das AgNPbio está associado com o potencial redutor de algumas proteínas fúngicas (AHMAD

et al., 2003; VIGNESHWARAN et al., 2007). Sendo que, para este trabalho, a produção biológica de AgNP pelo fungo *Fusarium oysporum*, ocorreu a partir da redução de íons metálicos através de uma redutase dependente de nitrato e um processo de transporte extracelular de quinonas (DURÁN et al., 2015).

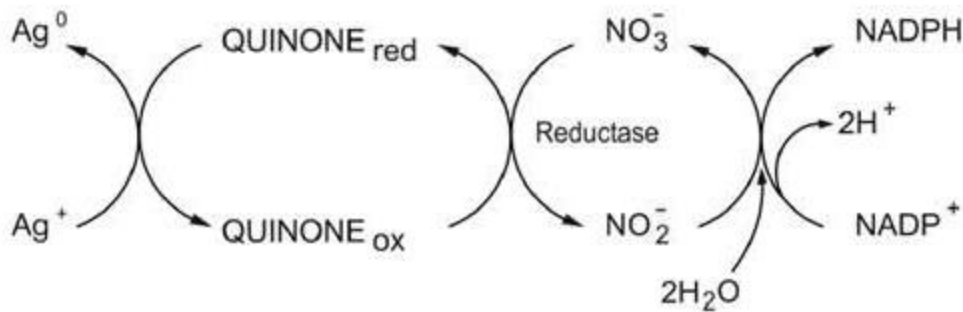


Figura 1- Diagrama da formação de AgNPbio por fungos (DURÁN et al., 2010)

Graças as suas propriedades antibacterianas, fungicidas e virucidas, as AgNPs desenvolvem um importante papel na medicina, onde são utilizadas em produtos para descontaminação e desinfecção, podendo também serem utilizadas para modificar superfícies de vários materiais, em particular fibras ou polímeros empregados em produtos de consumo como roupas, vestimentas laboratoriais e cirúrgicas, bandagens, além de serem aplicáveis em produtos de uso diário como cosméticos, pasta de dentes, sabonetes, detergentes, embalagens de alimentos e descontaminação de água (OCWIEJA et al., 2015).

O tratamento atual para infecções por *C. albicans*, se dá basicamente através da utilização de antifúngicos sintéticos como os Polienos, antimetabólitos, Azóis e Equinocandinas, que em sua maioria apresentam efeitos tóxicos ao paciente (MOUDGAL, SOBEL. 2010). Sendo assim extremamente importante a procura de agentes antimicrobianos que se adequem melhor ao paciente, reduzindo a toxicidade dos tratamentos ou até mesmo que possam ser utilizados como estratégias de prevenção.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-TALEB, H.; *et al.* Insecticidal properties of essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases. **Natural Product Research**, v. 15, p. 1-5, 2015.
- AHMAD, A. *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 28, p. 313–18, 2003.
- ALBY, K.; SCHAEFER, D.; BENNETT, R. F. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. **Nature**, v. 460, p. 890-894, 2009.
- ALMEIDA, R. S. C. **The Exploitation of Host Iron Sources by *Candida albicans* during Oral Infection**. Tese. 104 f. Doutorado - Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena. 2008.
- ALMEIDA, R. S. C.; *et al.* The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. **Plos Pathogens** v. 4, n. 11, p. 1-17, 2009.
- ALVES, C. T.; WEI, XQ.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; WILLIAMS, D. W. *Candida albicans* promotes invasion and colonization of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. **Journal of Infection** v. 69, p. 396-407, 2014.
- AMMER, A. G.; WEED, S. A. Cortactin Branches Out: Roles in Regulating Protrusive Actin Dynamics. **Cell Motil Cytoskeleton** v. 65, n. 9, p. 687-707, 2008.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidemia: Susceptibility and Epidemiology. **Danish Medical Journal** v. 60, p. 1-32, 2013.
- BAKKALI, F. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v. 585, p. 1-13, 2005.
- BEER, C.; *et al.* Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion?. **Toxicology Letters**, v. 208, p. 286-292, 2012.
- BEGNINI, K. R.; *et al.* Composition and Antiproliferative Effect of Essential Oil of *Origanum vulgare* Against Tumor Cell Lines. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 10, p. 1129-1133, 2014.
- BERGAMASCO, M. D.; *et al.* Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, n.56, p.256-263, 2012.
- BERRINGTON, D.; LALL, N. Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (Hela) Cell Line. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

- BETANCOURT, L.; *et al.* Composition and Bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* Genus. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p.21-31, 2012.
- BHAINSA, K. C.; SOUZA, S. F. D.; Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and Surfaces B: Bionterfaces**, v. 47, p. 160-164, 2006.
- BIERNE, H.; *et al.* Internalins: a complex Family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1156-1166, 2007.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 588-594, 2009.
- BLISS, J. M.; *et al.* *Candida* Virulence Properties and Adverse Clinical Outcomes in Neonatal Candidiasis. **The Journal of Pediatrics**, v. 161, p. 441-447, 2012.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701-708, 2013.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BUSSATA, C.; *et al.* Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.
- CATTELAN, M. G.; *et al.* Antibacterial activity of Oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition and Food Science**, v. 43, n. 2, p. 169-174, 2013.
- CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Revista de Odontologia Brasileira Central**, v. 20, n. 52, p. 68-73, 2011.
- CHAFFIN, L. W. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.
- CHAMI, F.; *et al.* Oregano and clove essential oils induce surface Alteration of *Sacharomyces cerevisiae*. **Phytother Res** v. 19, n. 5, p. 19405-408, 2005.
- CHAVES, G. M.; SANTOS, P. F.; COLOMBO, A. L. The persistence of multifocal colonisation by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 198-204, 2012.
- CHEN, L.; WANG, Z.; ZHU, J.; ZHAN, XI. Roles of Cortactin, and actin Polymerization Mediator, in cell Endocytosis. **Acta Bioquímica et Biophysica Sinica**, v. 38, n. 2, p. 95-103, 2006.

CHUN, S. S.; *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

CLEFF, M. B. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. Frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp. 2008. 129 fls. Tese. Programa de pós graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CLEFF, M. B.; *et al.* *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 116-123, 2010.

COLOMBO, A. L.; *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology** v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CORZO-LEON, D. E.; *et al.* Surveillance of *Candida* spp Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1-6, 2014.

COSEN-BINKER, L. I.; KAPUS, A. Cortactin: The Gray Eminence of the Cytoskeleton. **Physiology** v. 21, n. 5, p. 352-361, 2006.

COSTA, K.R.C.; *et al.* Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 97-105, 2012.

DALLE, F.; *et al.* Cellular interaction of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248-271, 2010.

DALY, R. J. Cortactin signaling and dynamic actin networks. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 1, p. 13-25, 2004.

DELIC, D. N.; *et al.* Antifungal activity of essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against three *Candida albicans* strains. **Journal of Natural Science**, n. 124, p. 203-211, 2013.

DE KIMPE, L.; *et al.* Characterization of cortactin as an *in vivo* protein kinase D substrate: Interdependence of sites and potentiation by Src. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 2, p. 253-263, 2009.

DI FIORE, P. P; ZASTROW, M. Endocytosis, Signaling and Beyond. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 8, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085911>>. Acesso em: 11 set. 2015.

DURÁN N, *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180851/>>. Acesso em: 11 set. 2015.

EISELER, T.; *et al.* PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulated cell migration. **FEBS Letters**, v. 581, n. 22, p. 4279-4287, 2007.

EL BABILI, F.; BOUAJILA J.; SOUCHARDJ. P.; et al. Oregano: Chemical Analysis and Evaluation of Its Antimalarial Antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p.512-518, 2011.

EPP, E.; et al. Clathrin- and Arp2/3-Independent Endocytosis in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **mBIO** v. 4, n. 5, p. 1-12, 2013.

ESCRIBANO, P.; et al. Endemic Genotypes of *Candida albicans* Causing Fungemia Are Frequent in the Hospital. **Journal of Clinical Microbiology** v. 51, n.7, p. 2118-2123, 2013.

FERNÁNDEZ-ARENAS, F.; et al. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane in mouse macrophage phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 11, N. 4, p. 560-589, 2009.

FERREIRA, A. V.; et al. *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. **Mycopathologia**, v. 175, v. 3-4, p. 265-272, 2013.

FERREIRA, E. V.; et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 363, p. 1-6, 2012.

FERREIRA, L. A. B.; et al. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149-166, 2014.

FILLER, S. G. Can host receptors for fungi be targeted for treatment of fungal infections? **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 389-396, 2013.

FORCHE, A.; et al. Evolution in *Candida albicans* Population During a Single Passage Through a Mouse Host. **Genetics**, v. 182, n.3, p. 799-811, 2009.

FREIRE, I. C. de M.; et al. Atividade antifúngica do óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 343-346, 2012.

FU, Y.; RUBIN, C. S. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. **EMBO reports**, v. 12, n. 8, p. 785-796, 2011.

FU, Y.; et al. E. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. **Molecular Microbiology**, v. 44, n.1, p. 62-72, 2002.

GALE, C. A.; et al. Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, INT1. **Science**, v. 279, n. 5355, p. 1355-1358, 1998.

GILLUM, A. M.; TSAY, E. Y.; KIRCH, D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. **Molecular Genes Genetic**, v. 198, n. 1, p. 172-182, 1984.

GONZÁLEZ, J. O. W.; *et al.* Lethal and sublethal effects of four essential oils on the egg parasitoids *Trissolcus basalus*. **Chemosphere**, v. 92, p. 608-615, 2013.

GOW, N. A., *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 112-122, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n2/full/nrmicro2711.html>>. Acesso em: 11 set. 2015.

GRONDONA, E.; *et al.* Bio-efficacy of the Essential Oil of Oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. *Ssp. Hirtum*). **Plant Foods Human Nutrition.**, v. 64, n. 4, p. 351-357, 2014.

GROPP, K. *et al.* The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2-3, p. 465-475, 2009.

HABIBI, E.; *et al.* Genoprotective effects of *Origanum vulgare* ethanolic extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p. 92-97, 2015.

HABIBI, E.; *et al.* Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p. 10-15, 2015.

HAN, T.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 747-763, 2011.

HILLER, E.; *et al.* Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host – Focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 384-389, 2011.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 176-180, 2001.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes – A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474-483, 2014.

HUMMERT, S.; *et al.* Game theoretical modelling of survival strategies of *Candida albicans* inside macrophages. **Journal of Theoretical Biology**, v. 264, p. 312-318, 2010.

HWANG, C.; *et al.* Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1029-1043, 2003.

ISAAC, R. S. R.; SAKTHIEL, G.; MURTHY, Ch. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles using *Averrhoa bilimbi* Fruit Extract. **Journal of Nanotechnology**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

ISENMANN, A. F. Destilação, retificação e arraste por vapor. CEFET-MG. Retirado de: http://www.timoteo.cefetmg.br/site/sobre/cursos/quimica/repositorio/artigos/arq/Destilacao_Retificacao_Arraste.pdf. às 12:00 de 06/03//2015.

- KARAKAYA, S.; *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Obtained from Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) by Using Different Extraction Methods. **Journal of Medical Food**, v. 14, n. 6, p. 645-652, 2011.
- KARPOUHTSIS, I.; *et al.* Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. **J. Agriculture Food Chemistry** v., 46, p. 1111-1115, 1998.
- KAUR, J.; TIKOO, K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology** v. 51, p. 1-14, 2013.
- KOLDAS, S.; *et al.* Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *Viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 95, n. 4, p.786-798, 2015.
- KULISIC, T.; *et al.* Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.
- KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1546-1554, 2005.
- LAMBERT, R. J. W.; *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.
- LICINA, B. Z.; *et al.* Biological activities of extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. **Food Control**, v. 33, p. 498-504, 2013.
- LIN, Z.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n.2, p. 189-217, 2015.
- LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **Plos Pathogens**, v. 9, p. 1-5, 2013.
- LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; *et al.* Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 281-290, 2014.
- LÓPEZ-RIBOT, J. L.; *et al.* Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, p. 187-196, 2004.
- LOWMAN, D. W.; *et al.* Glycobiology and Extracellular Matrices: Novel Structural Features in *Candida albicans* Hyphal Glucan Provide a Basis for Differential Innate Immune Recognition of Hyphae Versus Yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 6, p. 3432-3443, 2014.
- MAHMOUD, R.; *et al.* Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN γ on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. **Cellular Immunology**, v. 280, p. 61-67, 2012.

MAISANABA, S.; *et al.* In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. **Mutation Research Genetic Toxicology Environment Mutagenesis**, v. 784-785, p. 37-44, 2015.

MARTIN, R.; *et al.* Host–pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 417-422, 2011.

MARTIN, R.; *et al.* A Core Filamentation Response Network in *Candida albicans* Is Restricted to Eight Genes. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.

MAYER, F. L.; *et al.* Small but Crucial: The Novel Small Heat Shock Protein Hsp21 Mediates Stress Adaptation and Virulence in *Candida albicans*. **Plos One**, v. 7, 2012.

MECH, F. *et al.* Epithelial invasion outcompetes Hypha Development During *Candida albicans* infection is Revealed by an Image-Based Systems Biology Approach. **Cytometry Part A**, v. 85A, p. 126-139, 2014.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; *et al.* Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 384-394, 2005.

MISHARINA, T. A.; *et al.* Effect of Oregano Essential Oil on the Engraftment and Development of Lewis Carcinoma in F1 DBA C57 Black Hybrid Mice. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 432-436, 2013.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in Different Clinical Samples and their Virulence: biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, p. 4-8, 2011.

MONTEIRO, D. R. *et al.* The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 103-110, 2009.

MONTEIRO, D. R. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 672-80, 2013.

MORA-MONTES, H. M. *et al.* Protein glycosylation in *Candida*. **Future Microbiol**, n. 4, v. 9, p. 1167-1183, 2009.

MORENO-RUÍZ, E.; *et al.* *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 1179-1189, 2009.

MORITZ, M.; GESZKE-MORITZ, M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 596-613, 2013.

MOUDGAL, V.; SOBEL, J. Antifungals to treat *Candida albicans*. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 11, n. 12, p. 2037-2048, 2010.

MOYES, D. L.; *et al.* A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. **Cell Host & Microbe**, v.8, p. 225-235, 2010.

NAGLIK, J. R.; *et al.* *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 963-976, 2011.

NOBEL, H.; van den ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall maintenance in fungi. **Trends in Microbiology**, v.8, n.8, p. 344-345.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

OCWIEJA, M.; *et al.* Silver particle monolayers- Formation, stability, applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 222, p. 530-563, 2015.

OLAYIOYE, M. A.; BARISIC, S.; HAUSSER, A. Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. **Cellular Signalling**, v. 25, p. 1739-1747, 2013.

OZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (*Lamiaceae*) and its two major phenolic components. **Turk Journal of Biology**, v. 35, p. 735-742, 2011.

PASTOR-FLORES, D.; *et al.* PIF-Pocket as a Target for *C. albicans* Pkh Selective Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 8, p. 2283-2292, 2013.

PEARSE, B. M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n.4, p.1255–1259, 1976.

PEREZ-GARCIA, L. A.; *et al.* Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. **Glycobiology**, v. 1, n.1, p.1-7, 2011.

PHAN, Q. T.; *et al.* Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. **Plos Biology**, v. 5, n. 3, p. 543-557, 2007.

PHAN, Q. T.; *et al.* Role of Endothelial Cell Septin 7 in the Endocytosis of *Candida albicans*. **mBio**, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2013.

PARK, H.; *et al.* Transcriptional Responses of *Candida albicans* to Epithelial and Endothelial Cells. **Eucaryotic Cell**, v. 8, n. 10, p. 1498-1510, 2009.

PARK, M. V. D. Z.; *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 9810-9817, 2011.

PARK, Y. A new paradigm Shift for the Green Synthesis of antibacterial Silver Nanoparticles Utilizing Plants Extracts. **Toxicological Research**, v. 30, n. 3, p. 169-178, 2014.

POZZATTI, P. *et al.* Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, p. 185-189, 2010.

QUESTER, K.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. **Micron**, v. 54, n. 55, p. 1-27, 2013.

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S. L. Completely “Green” synthesis and stabilization of Metal Nanoparticles. **Journal of American Chemistry Society**, v. 125, p. 13840-13941, 2003.

RODRÍGUEZ-LEÓN, E.; *et al* Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 318, p. 2-9, 2013.

ROLLENHAGEN, C.; *et al.* Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 946-966, 2009.

RUIZ-HERRERA, J. *et al.* Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 14-29, 2006.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D.Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of Nanomedicines. **J Control Release**, v.145, n.3, p. 182-195, 2010.

SAMAJ, J.; *et al.* Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1150-1161, 2004.

SANTOS, A. S.; *et al.* Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Embrapa Comunicado técnico**, v.99, p. 1-6, 2004.

SANTOS, C. A.; *et al.* Silver nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 1931-1944, 2014.

SAUVONNET, N.; *et al.* Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of cytokine receptor. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 1, p. 155-163, 2005.

SHEPER M. A.; *et al* Farnesol, a Fungal quorum-Sensing Molecule Triggers Apoptosis in Human Oral Squamous Carcinoma Cells. **Neoplasia**, v. 10, n. 9, p.954-963, 2008.

SILVA-ROCHA, W. P.; *et al.* *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC Oral Health**, v.14, n.20, p. 2-9, 2014.

SIVROPOULOU, A.; *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

- SOHN, K.; *et al.* An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 1085-1093, 2006.
- SOHN, K.; *et al.* EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 89-102, 2003.
- SOLL, D. R. Why does *Candida albicans* switch?. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 973-989, 2009.
- SOLOMON, S. D.; *et al.* Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322-325, 2007.
- SRIVATSTAVA, A. *et al.* Evaluation of properties of a tissue conditioner containing origanum oil as an antifungal additive. **Journal Prosthetic Dentistry**, v. 110, n. 4, p. 313-319, 2013.
- STEFANAKIS, M. K. *et al.* Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. **Food Control**, v.34, p. 539-546, 2013.
- SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews**, v. 9, p. 737-748, 2011.
- SUN, J. N.; *et al.* Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2010.
- SUNDBORGER, A. C.; HINSHAW, J. E. regulating dynamics during endocytosis. **F100 Prime Reports**, v. 6, n. 85, p. 1-9, 2014.
- SUNDSTROM, P. Adhesins in *Candida albicans*. **Elsevier Science: Host- microbe interactions**, v. 2, p. 353-357, 1999.
- TEIXEIRA, B.; *et al.* Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **J Sci. Food Agric**, v. 93, p. 2707-2714, 2013.
- THAKKAR, K. N.; *et al.* Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 257-262, 2010.
- URBAN, C.; *et al.* The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1318-1341, 2005.
- VAN LINT, J.; *et al.* Protein kinase D: An intracellular traffic regulator on the move. **TRENDS In Cell Biology**, v. 12, n. 4, p. 193-200, 2002.
- VIGNESHWARAN, N. *et al.* Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Mater Lett**, v. 61, p. 1413-18, Mar 2007.

WÄCHTLER, B.; *et al.* Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN γ on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

VAZQUEZ-MUÑOS, R.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver nanoparticles. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.

WÄCHTLER, B.; *et al.* *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. **Plos One**, v. 7, maio, 2012. Retirado de: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036952>> . Acesso em: 11 set. 2015.

WANG, P.; SHEN, G. The endocytic adaptor proteins of pathogenic fungi: charting new and familiar pathways. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 449-457, 2011.

WEED, A. S.; PARSONS, J. T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. **Oncogene**, v. 20, p. 6418-6434, 2001.

WHILEY, R. A.; *et al.* *Candida albicans* strain-dependent modulation of pro-inflammatory cytokine release by in vitro oral and vaginal mucosal models. **Cytokine**, v. 57, p. 80-87, 2012.

WILLE, M. P.; *et al.* Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-years period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

YANG, Y. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol, Immunol. Infect.**, v. 36, p. 223-228, 2003

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 273-282, 2010.

ZIPFEL, P. F.; *et al.* Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: The many faces of the *Candida* Pra1 protein. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 423-430, 2011.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor da combinação dos agentes antimicrobianos óleo essencial de orégano OEO e nanopartículas de prata biológicas AgNPbio sobre células epiteliais de linhagem oral FaDu, frente à infecção pela levedura *Candida albicans* (cepa SC5314).

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as ações do OEO e das AgNPbio sobre os processos de invasão e dano causados por *C. albicans*;
- Estabelecer o perfil de sensibilidade da cepa SC5314 para OEO e AgNPbio;
- Avaliar os resultados da associação de AgNPs com OEO na atividade antifúngica;
- Estabelecer IC50 do OEO e AgNPs sobre células epiteliais de linhagem FaDu, bem como avaliar sua citotoxicidade conjuntamente.

4- ARTIGO

O artigo apresentado segue as normas da revista “*Nanomedicine*”:

“ARTIGOS ORIGINAIS: Artigos originais descrevem todo o conteúdo sobre hipóteses baseadas em experimentos ou teoria em nanomedicina. Seu conteúdo não deve exceder 5000 palavras (incluindo corpo de texto e legendas), e o artigo deve conter não mais que 8 figuras. No máximo 60 referências podem ser citadas. Incluindo um Resumo de 150 palavras ou menos com subtemas e citações. O corpo de texto deve incluir quatro sub-títulos separados: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. O uso de materiais suplementares é recomendado para detalhar descrições.”

Atividade antifúngica de óleo essencial de orégano com nanopartículas de prata biológica contra *Candida albicans* (cepa SC5314)

Lilian Maria Damas Ramos^a; Renata Katsuko Takayama Kobayashi^a; Sara Scandoreiro^a; Gerson Nakazato^a; Luciano Aparecido Panagio^a; Ricardo Sérgio Couto Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil.

*Autor correspondente

Resumo

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de novos antimicrobianos, investigamos os efeitos das AgNPbio e OEO sobre os processos de dano às células epiteliais FaDu por *C. albicans* SC5314. As sensibilidades da cepa para AgNPbio e OEO foram avaliadas pelo teste de microdiluição em caldo, resultando em 15.6 µM (CIM) e 31.2 µM (CFM) para AgNPbio, e 0.12 % (CIM e CFM) para OEO. O tipo de interação entre AgNPbio/OEO na atividade antifúngica foi determinado pelo método de “checkerboard” e cálculo do ICIF, resultando em sinergismo. Em ensaios de filamentação utilizando OEO, observou-se que este na concentração de 0.007 % reduziu em 70 % a formação de hifas pelo fungo. Nos testes de invasão e endocitose através de coloração diferencial, observou-se redução estatisticamente significativa na endocitose com a utilização das AgNPbio na concentração de 3.9 µM. Através da técnica de LDH, observamos que a combinação de AgNPbio/OEO apresentou proteção de aproximadamente 100%. Assim, os compostos interferem na patogenicidade do fungo, sugerindo a utilização destes compostos como uma interessante alternativa para o controle da candidíase.

Palavras chaves: Nanopartículas de prata, *Candida albicans*, óleo essencial de orégano, células epiteliais.

Introdução

A evolução do uso de nanopartículas na biomedicina tornou-as indispensáveis, desenvolvendo um papel importante na área de diagnósticos, imagenologia, sensoriamento e também distribuição de drogas[1].

Nanopartículas de Prata AgNP apresentam uma grande variedade de aplicações práticas na biologia, medicina, análises química, catalises, eletrônica, cosméticos, indústrias têxtil e farmacêutica, graças as suas propriedades antibacterianas, fungicidas e virucidas [1]. Sendo que tamanho, forma, distribuição de tamanho e superfície das nanopartículas são considerados fatores chave que determinam suas propriedades específicas [2].

A produção biológica de AgNP pelo fungo *Fusarium oysporum*, ocorre a partir da redução de íons metálicos através de uma redutase dependente de nitrato e um processo de transporte extracelular de quinonas [3]. E dentre outros métodos, configura-se como uma forma sustentável de produção de nanopartículas, minimizando prejuízos ao meio ambiente[3].

Óleos essenciais derivados de plantas aromáticas são bem conhecidos na medicina tradicional como agentes antimicrobianos e são caracterizados por um amplo espectro de atividade, incluindo propriedades antifúngicas, como preservadores de alimentos, inibidores da produção de micotoxinas e como agentes antimicóticos [4,5].

O OEO apresenta como características importantes; elevada estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos. Fazendo com que a atividade antimicrobiana e os mecanismos de ação, bem como de seus dois principais constituintes, timol e carvacrol, sejam documentados nas últimas décadas [6].

Candida albicans, pode viver tanto como um comensal inofensivo sobre a pele humana e superfícies mucosas quanto como um patógeno agressivo que causa uma variedade de doenças, desde candidíase orofaríngea até disseminada [7].

Os principais fatores de virulência de *C. albicans* compreendem adesão, formação de hifas, capacidade de responder a mudanças de pH, secreção de hidrolases, formação de biofilme, switching fenotípico, bem como fatores específicos associados com a invasão, dano celular e indução ou evasão da resposta imune. Estes fatores podem contribuir para sua sobrevivência, atividade e persistência no hospedeiro [8, 9, 10]. Podendo variar de acordo com o tipo de ambiente, levando a crer que diferentes determinantes e vias regulatórias permitem *C. albicans* iniciar e manter uma infecção [11].

O tratamento atual para infecções por *C. albicans*, se dá basicamente através da utilização de antifúngicos sintéticos como os Polienos, antimetabólitos, Azóis e Equinocandinas, que em sua maioria apresentam efeitos tóxicos ao paciente [26]. Tendo em vista seu elevado poder de virulência e prevalência entre os patógenos fúngicos de maior mortalidade, a busca de novas estratégias antimicrobianas faz-se necessária, sendo que neste cenário, a utilização de AgNPbio e OEO apresentam figura inovadora ao apresentarem atividades antimicrobianas distintas sobre microrganismos.

Metodologia

Linhagem fúngica

Foi utilizada para os experimentos uma cepa padrão, *C. albicans* SC5314, isolada de um paciente com candidíase disseminada [11]. O fungo foi mantido em meio YPD sólido sob refrigeração, e também foi estocada em caldo YPD com 40 % de glicerol a uma temperatura de – 80 °C. Para os experimentos, o fungo foi cultivado em caldo YPD a uma temperatura de 30 °C durante 16 horas.

Células epiteliais de linhagem

Foram utilizadas células epiteliais da linhagem FaDu (células epiteliais bucais). Estas foram cultivadas na presença de RPMI (Invitrogen®) com 10 % de SFB (Invitrogen®) e mantidas a uma temperatura de 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂.

Óleo essencial de orégano

O OEO (Ferquima®), utilizado neste estudo foi mantido sob refrigeração e protegido da luz, para os experimentos foi diluído 1:1 em DMSO (Sigma®).

Nanopartículas de Prata

AgNPbio foi obtida seguindo o método de Durán e colaboradores [3]. Para isso, 10g de biomassa de *F. oxysporum* foi adicionada em um frasco contendo 100 mL de água

destilada esterilizada, e incubada durante 72 horas a uma temperatura de 28°C. Em seguida, os componentes da solução aquosa foram separados por filtração, seguido da adição de nitrato de prata AgNO₃ (Sigma[®]) na concentração de 10⁻³ M, e incubado a uma temperatura de 28 °C. As AgNPbio foram caracterizadas (tamanho e potencial zeta) através do equipamento Zeta Sizer (Malvern).

Teste de citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, 10⁴ células FaDu foram incubadas em meio RPMI 1640 contendo 10 % de SFB em microplaca de 96 poços durante 24 horas. Para os testes de citotoxicidade com OEO, estas foram submetidas ao tratamento com concentrações variando de 0.0025 a 1 %. Todos os poços foram vedados com papel adesivo a fim de evitar a volatilização do OEO. Para os testes de citotoxicidade com AgNPbio, estas foram diluídas em meio RPMI contendo 5 % de SFB nas seguintes concentrações variando de 0.98 a 125 µM. As células FaDu foram cultivadas em meio RPMI durante 48 horas a uma temperatura de 37 °C sob atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após incubação, as monocamadas foram lavadas com meio RPMI 1640 contendo 10 % de SFB e novamente incubadas durante 4 horas com 100 µL da solução de MTT (Invitrogen[®]). Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente de forma a preservar os cristais de formazan, e adicionado 100 µL de SDS (Merck[®]). As microplacas foram incubadas durante 18 horas, a temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. Os valores da leitura foram analisados através de regressão linear, a fim de obter o IC₅₀. Os experimentos foram realizados em quintuplicata em três momentos diferentes.

Testes de sensibilidade fúngica

As CIMs do OEO e das AgNPbio foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, como descrito por CLSI [12] com adaptações, de forma que os testes com OEO foram realizados em microtubos afim de evitar interferências devido volatilização. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano com a ausência de crescimento visível quando comparada ao controle positivo. Para estabelecer a CFM, 100 µL dos poços ou microtubos foram plaqueados em meio YPD 100, e incubadas por 48 horas a uma temperatura de 30 °C. De forma que a CFM foi definida como a menor concentração que reduziu 99,9 % do número de UFC quando comparada ao controle positivo.

A CIF foi determinada utilizando a técnica de checkerboard [12]. O tipo de interação entre AgNPbio/OEO na atividade antifúngica foi determinado utilizando o ICIF (sinergismo para $FIC \leq 0.5$, aditismo para $ICIF > 0.5$ e < 1.0 , indiferente para $ICIF > 1.0$ e ≤ 2.0 e antagonismo para $ICIF > 2$).

Invasão de Células Epiteliais

Para os ensaios de invasão foi utilizada a metodologia descrita por Almeida e colaboradores [13]. As células humanas FaDu foram incubadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB sobre lamínulas tratadas com ácido acético até formarem monocamadas confluentes (80% a 100% de confluência). Após lavagem com PBS (0.01 M, pH 7.4), as monocamadas foram co-incubadas com 10^5 blastósporos de *C. albicans* em meio RPMI 1640 com 10 % de SFB, e concentrações de AgNPbio variando de 1.95 a 15.6 μM durante 2 horas, a uma temperatura de 37 °C, com 5 % CO_2 . Posteriormente, as amostras foram lavadas e fixadas para realização de coloração diferencial utilizando dois fluoróforos diferentes. Este método permite a diferenciação, em microscópio de fluorescência, entre as hifas do fungo que estão localizadas no meio externo e as hifas que invadiram a célula hospedeira. As lamínulas com o material foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica), e as hifas que não invadiram, juntamente com as hifas que penetraram as células epiteliais, foram contadas para estimar a porcentagem de invasão.

Endocitose de hifas inativadas com timerosal

Para os ensaios de endocitose, a cepa padrão SC5314, após lavagem com PBS (0.01M, pH 7.4), foi incubada em meio RPMI 1640 com 10 % de SFB, numa concentração de 5×10^6 células/mL a 37 °C por 2 horas, com agitação constante (1500 rpm), afim de estimular a formação de tubo germinativo. Após a observação das hifas formadas, as mesmas foram lavadas 2 vezes por centrifugação e para fixação submetidas a incubação em solução de 0,2% de timerosal (Sigma®), por 2 horas a uma temperatura de 37 °C, com agitação constante (1500 rpm). As células de *C. albicans* inativadas foram lavadas 3 vezes com PBS (0.01M, pH 7.4), para retirada completa do timerosal, e 100 μL de cada suspensão foram plaqueados em meio YPD 100, afim de confirmar a ausência de crescimento. A linhagem de células humanas FaDu foram incubadas em meio RPMI 1640 contendo 10 % de SFB sobre lamínulas tratadas

com ácido acético, até a formação de monocamadas confluentes (80 a 100 % de confluência). Após lavagem com PBS (0.01M, pH 7.4), as monocamadas foram incubadas com 10^7 blastósporos de *C. albicans* inativadas, em meio RPMI 1640 com 10 % de SFB e concentrações de AgNPbio variado de 1.95 a 15.6 μ M durante 2 horas, a uma temperatura de 37 °C, com 5 % CO₂. Posteriormente, as amostras foram lavadas e fixadas para realização de coloração diferencial descrita por Almeida e colaboradores [13]. As lamínulas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica), e as hifas que não foram endocitadas, juntamente com as hifas que penetraram as células epiteliais foram contadas para estimar a porcentagem de endocitose. Não foram realizados testes de invasão e endocitose para o óleo de orégano devido a dificuldades técnicas encontradas em virtude de sua elevada citotoxicidade sobre as células de linhagem estudadas e inibição de tubo germinativo das células fúngicas.

Experimento de Dano com LDH

Para os ensaios de dano, a linhagem de células humanas FaDu foram incubadas em meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 10 % de SFB (Gibco), até a formação de monocamadas confluentes (80 a 100% de confluência) em poços de placas de 24 poços, contendo lamínulas circulares (13 mm de diâmetro) tratadas com ácido acético. Após lavagem com PBS (0.01M, pH 7.4), as monocamadas foram co-incubadas com 10^6 blastósporos de *C. albicans*, em meio RPMI 1640 sem SFB, com as concentrações: 0.007 a 0.01% de OEO; e 0.98 a 15.6 μ M de AgNPbio. Os poços foram vedados para evitar volatilização, e em seguida incubados por 8 horas protegidos da luz, a uma temperatura de 37°C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Para quantificar o dano causado às células epiteliais, o sobrenadante foi removido e a quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio foi quantificada utilizando o Kit LDH Cytotoxicity Assay (Cayman), seguindo instruções do fabricante. Poços contendo somente células epiteliais foram utilizados como controles, assim como poços contendo apenas células epiteliais que após a incubação foram lisadas com Triton 0.2 % (Merck®). A citotoxicidade relativa foi calculada através da seguinte fórmula: $100 \cdot (A-B)/(C-B)$, onde A= poço teste; B= poço controle contendo somente células e C = poço de lise total, de forma que os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de citotoxicidade relativa.

Formação de Tubo Germinativo e Filamentação

Após lavagem com PBS (0.01M, pH 7.4), 2×10^7 células de *C. albicans*, foram adicionadas a tubos cônicos de 50 mL contendo 4 mL de meio RPMI 1640 com 10 % de SFB, e concentrações de OEO variando de 0.007 a 0.03 %, e incubadas a uma temperatura de 37 °C durante 8 horas, sendo que a cada 2 horas, cada amostra foi homogeneizada, e 10 µL do material foi observado em microscopia de luz a fresco. Tubos controles contendo apenas *C. albicans* e meio RPMI com 10 % de SFB foram utilizadas no experimento. Os resultados foram apresentados em porcentagem de células filamentosas, discriminando entre hifas e pseudo-hifas. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA One Way usando o programa GRAPHPAD PRISM version 5.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Resultados

Caracterização das nanopartículas

As AgNPbio apresentaram tamanhos variando de 90 a 150 nm, com potencial zeta de -33.2 +/- 6.31 mM.

Teste de citotoxicidade dos compostos em células de linhagens FaDu

A concentração do OEO a 0.01% apresentou 46 % de viabilidade celular, sendo que em concentrações menores os valores aproximaram-se do controle (Figura1). Para as AgNPbio, a concentração de 31.2 e 61.2 µM apresentou uma viabilidade celular de 47 e 84% (Figura 2), respectivamente.

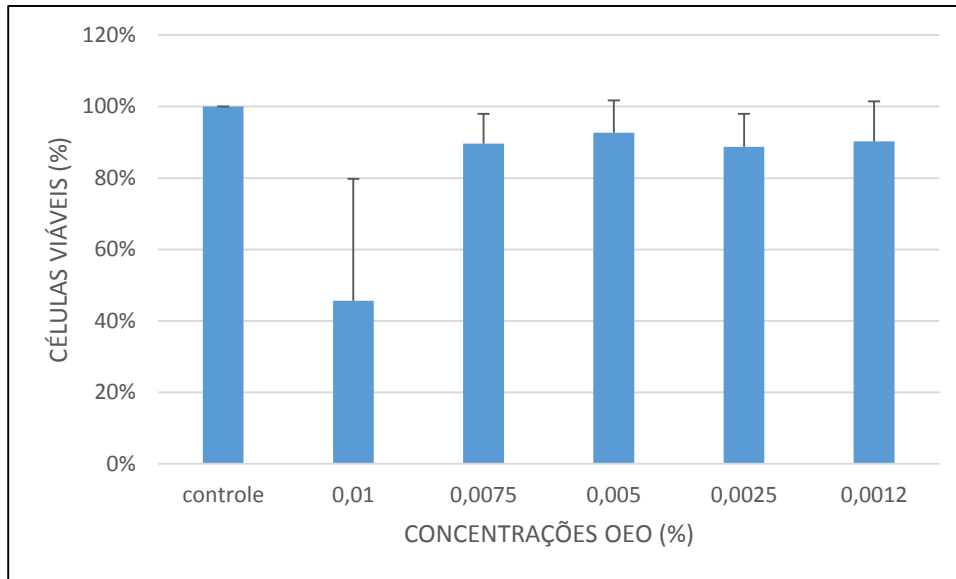


Figura 1- Concentração citotóxica do OEO em células de linhagens FaDu.

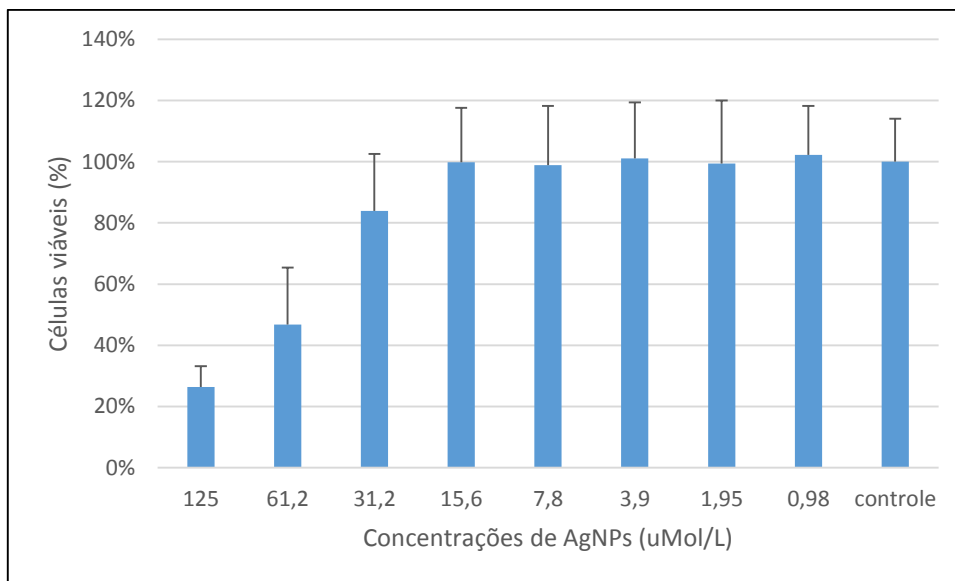


Figura 2- Concentração citotóxica das AgNPbio em células de linhagens FaDu.

Determinação da CIM e tipo de interação na atividade antifúngica

As CIMs do OEO e AgNPbio contra *C. albicans* SC5314 foram 0.12 % e 15.6 μ M, respectivamente. Quando combinado os compostos, os valores reduziram para 0.03 % (OEO) e 3.9 μ M (AgNPbio). Baseado nestes dados, a FIC apresentou um valor de 0.5, correspondendo a uma interação sinérgica dos compostos na atividade antifúngica.

Invasão de células epiteliais

Sobre a invasão do fungo em células FaDu, verificamos que as AgNPbio não diminuíram significativamente ($p > 0.05$) a quantidade de células invadidas quando comparadas ao controle, até a concentração de $3.9 \mu\text{M}$ (Figura 3). O OEO não foi utilizado nestes testes, pois inibia a filamentação de *C. albicans*, inviabilizando assim, a observação da invasão pela hifa.

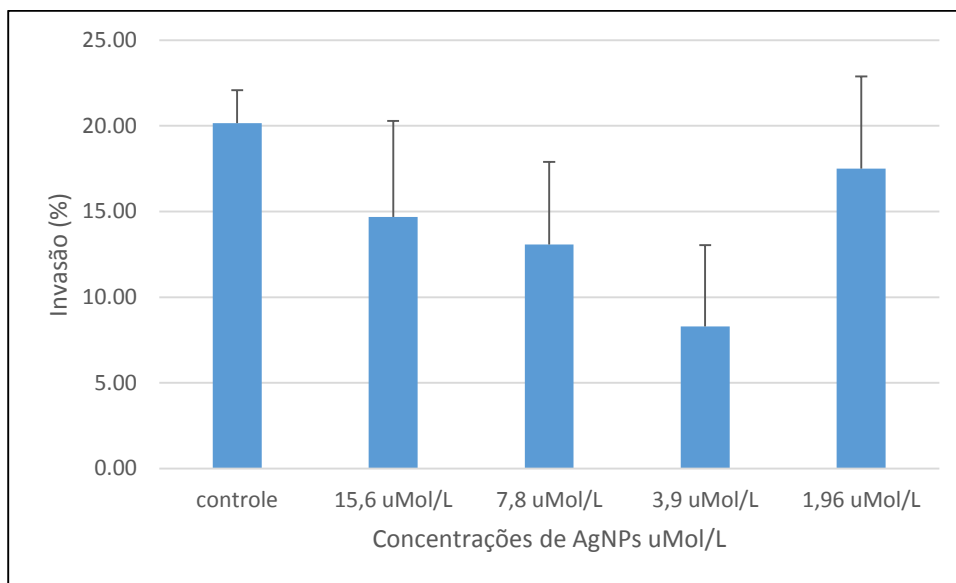


Figura 3- Resultados da invasão de *C. albicans* em células FaDu em diferentes concentrações de AgNPbio.

Endocitose de hifas

O mesmo fenômeno da invasão ocorreu na endocitose de hifas. Em concentrações maiores de AgNPbio a percentagem de endocitose foi maior do que na concentração de $3.9 \mu\text{M}$. Porém, nesse caso, as AgNPbio diminuíram significativamente ($p < 0.05$) a endocitose.

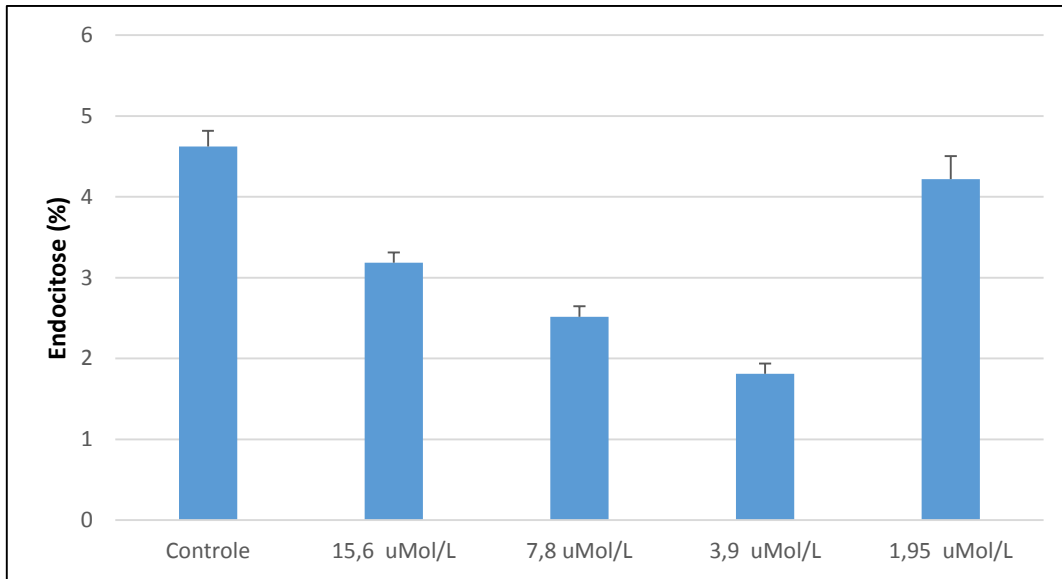


Figura 4- Resultados da endocitose de *C. albicans* em células FaDu em diferentes concentrações de AgNPbio.

Formação de Tubo Germinativo e Filamentação

Neste ensaio foi observada uma redução de 80 % de formação de hifas, sob ação de OEO 0.007 % em apenas 6 horas de incubação. Após 8 horas de incubação, com a mesma concentração do OEO, houve um aumento na percentagem de hifas (Figura 5). Já, em relação à formação de pseudo-hifas foi observado um comportamento similar, porém com uma percentagem bem menor do que para as hifas (Figura 5).

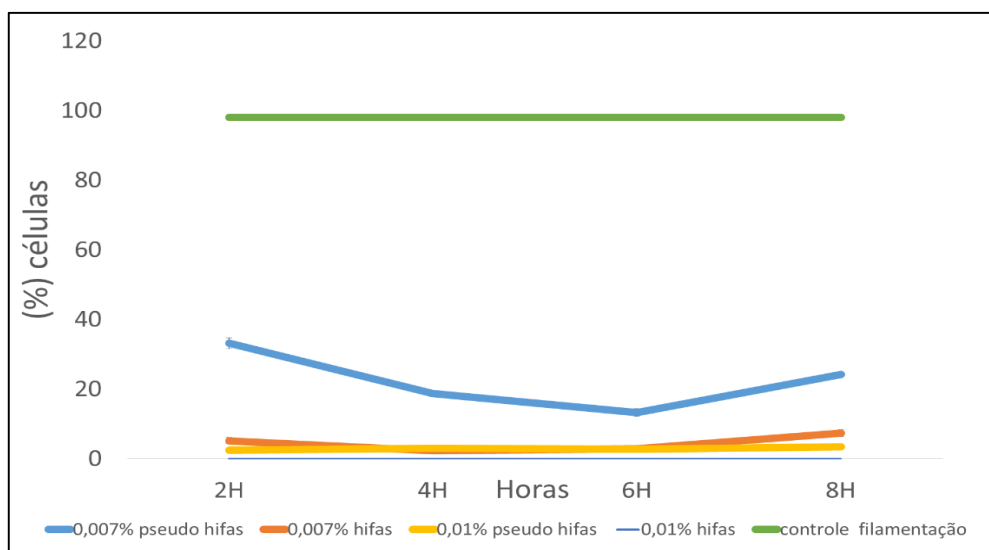


Figura 5- Curva de formação de hifas sob ação de diferentes concentrações do OEO em diferentes tempos de incubação.

Experimento de Dano com LDH

Como demonstrado na figura 6, 0,007% de OEO apresentou uma baixa toxicidade à monocamada de células ($5,6 \% \pm 0,9$). A adição de 0,007% de OEO à monocamada infectada aboliu o dano causado pelo fungo, pois não houve diferença entre as monocamadas infectadas ou não na presença do OEO. Além disso, a associação de $3,9 \mu\text{M}$ de AgNPs não incrementou a redução no dano celular causada pelo OEO (Figura 6).

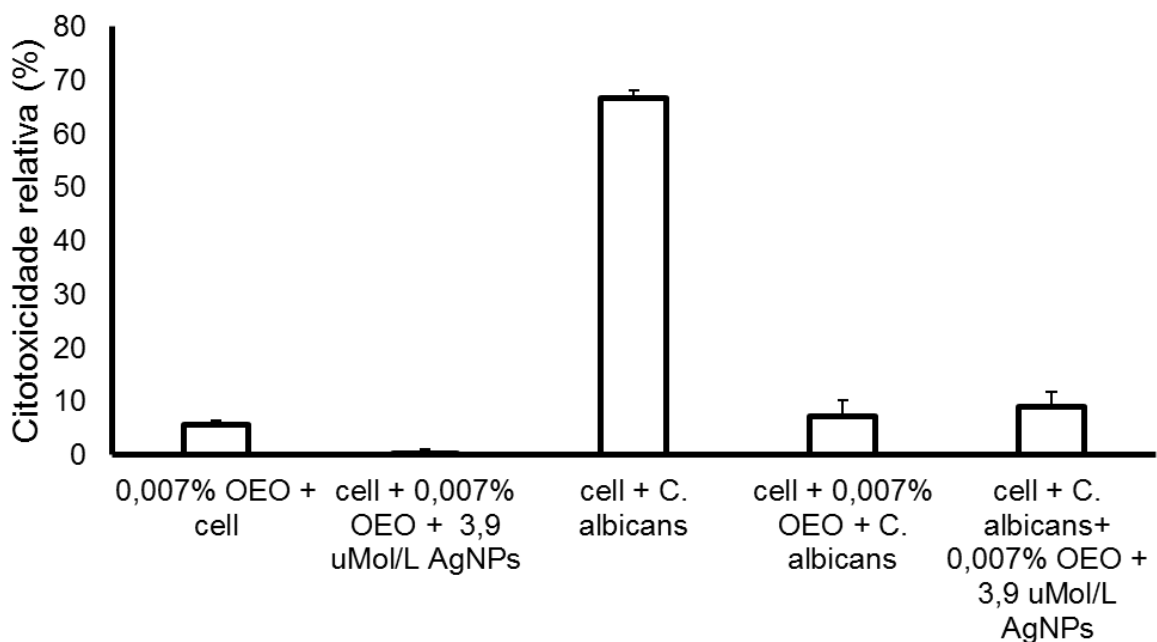


Figura 6- Resultados do ensaio de dano com LDH, proteção observada através de citotoxicidade relativa utilizando OEO 0.007% e AgNPbio/OEO ($3,9\mu\text{M} / 0.007\%$).

Discussão

Nos últimos anos, diversos antimicrobianos vêm sendo desenvolvidos no controle de fungos de interesse médico. Para isso, diferentes estratégias na formulação de produtos antifúngicos vêm sendo utilizadas para tal finalidade. Neste estudo, foi utilizada uma combinação do OEO com AgNPbio obtidas a partir do fungo *F. oxysporum*, contra uma cepa padrão de *C. albicans* SC5314. Apesar de utilizar apenas uma cepa, os resultados obtidos mostraram alguns princípios da atividade antimicrobiana e correlações interessantes desta atividade com a patogenicidade do fungo, como a invasão por endocitose, e sua filamentação.

A atividade antimicrobiana do OEO e AgNP já foram reportadas na literatura [4,5,6, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20], porém não quando combinadas. Verificamos que a combinação reduziu consideravelmente as concentrações de ambos compostos, resultando numa interação sinérgica. Este tipo de interação na atividade antimicrobiana é extremamente interessante sob vários aspectos. A eficiência na atividade antimicrobiana em baixíssimas concentrações viabiliza a produção de fármacos e diminui as chances dos efeitos adversos ao hospedeiro. Em algumas situações, também ajuda a dar indícios de mecanismos de ação antimicrobiana através das análises e comparação dos efeitos mostrados pelos compostos em combinação.

A citotoxicidade das nanopartículas de prata também tem sido reportada na literatura [21,22,23], e é uma das grandes preocupações no uso da nanotecnologia para tal finalidade. Porém, neste estudo a CIM das AgNPbio (15.6 μ M) e combinada (3.9 μ M) ficaram abaixo das concentrações citotóxicas de nosso trabalho, o que é uma característica desejável de um antimicrobiano. Também, neste estudo verificamos que o OEO apresentou efeito citotóxico, e neste caso 10x superior aos valores de CIM, mas quando combinada com as nanopartículas de prata, esta teve sua citotoxicidade reduzida, demonstrando a vantagem e importância da associação destas substâncias. Assim, a combinação foi extremamente importante em relação a citotoxicidade, principalmente para o OEO, que reduziu sua citotoxicidade na combinação. A CIM encontrada com OEO (0.12 %) foi próxima a CIM encontrada por CLEFF e colaboradores (2010), que testaram 12 cepas de *C. albicans*, dentre as quais 9 apresentaram CIM entre 0.25 e 0.12 %. Vale lembrar, que a CIM da combinação (3.9 μ M para AgNPbio e 0.03 % para o OEO) é a melhor combinação, mas outras concentrações combinadas foram obtidas (dados não mostrados), variando a CIM de ambos compostos. Com isso, podemos reduzir ainda mais a concentração de um composto (OEO ou AgNPbio), ao aumentar a concentração do outro, obtendo concentrações mais desejadas em relação à citotoxicidade, sem alterar a atividade antifúngica. Essa flexibilidade nas concentrações de ambos é uma das grandes vantagens de utilizarmos combinações de fármacos. Além disso, em caso de resistência para algum desses compostos [20], a combinação seria uma viável alternativa pela efetiva ação antifúngica do outro composto.

Verificamos que AgNPbio não interferem de forma estatisticamente significativa na invasão do fungo em células epiteliais. Mas, vale lembrar que neste caso, novos ensaios utilizando mais amostras devem ser realizados, uma vez que apenas uma amostra e o resultado obtido foram insuficientes para analisarmos estatisticamente este fenômeno.

Já em relação ao processo de endocitose em células epiteliais FaDu, mesmo utilizando apenas uma amostra, a redução da endocitose na presença de AgNPbio foi significativa ($p <$

0.05). Tendo em vista que a parede celular constitui o primeiro ponto de interação entre patógenos fúngicos e o hospedeiro e onde contém uma variedade de proteínas e polissacarídeos requeridos para a adesão, evasão da resposta imune e integridade celular, podemos sugerir que as AgNPs biológicas podem atuar sobre os processos de endocitose do fungo, através de interações com componentes da parede celular de *C. albicans* ou da membrana celular das células epiteliais, bloqueando a endocitose através de ligações não específicas, quando em baixas concentrações, desde que é sabido que alguns aspectos comportamentais das AgNPs, dentre estas atividade antibacteriana e toxicidade eucariótica podem ser influenciados pela atividade iônica da suspensão. Flory [24] cita três mecanismos para a atividade antimicrobiana das AgNP sobre procariotos: (1) adesão das nanopartículas à superfície celular, alterando propriedades de membrana e tendo como resultado um aumento da permeabilidade da membrana; (2) penetração das nanopartículas dentro da célula bacteriana, resultando em dano ao DNA; (3) dissolução de AgNPs, com liberação de prata iônica (radicais livres) com atividade em importantes enzimas.

Em eucariotos, mais precisamente *C. albicans*, podemos citar o estudo de Vazques-Muñoz e colaboradores [16], que realizaram análise ultra estrutural de *C. albicans* expostas à AgNPs, através de microscopia eletrônica de transmissão, observando que as células fúngicas expostas a AgNPs bem como as células de controle não apresentaram danos graves, como formação de caroços ou ruptura de parede celular, desta forma os dados corroboraram com nossos resultados, onde as AgNPs não levaram a nenhuma mudança morfológica observável à microscopia de luz ou de fluorescência. Este fato somado ao de que no mesmo trabalho citado, as AgNPs foram encontradas em sua maioria circundando as células examinadas, fortalece nossa ideia de interação das AgNPs com componentes da parede celular da *C. albicans*. No mesmo trabalho ainda podemos citar, a presença de cristais de prata intracelulares, e a observação de acumulação de partículas muito pequenas na parede da célula e parte do citoplasma próximo a acumulação extracelular de AgNPs (6-12nm), inferindo possivelmente que as AgNPs possam perturbar as estruturas de parede celular podendo causar danos graves em tempos de exposição mais prolongados.

Testes preliminares neste estudo apontaram interferência na formação de filamentação do fungo apenas em presença do OEO. Assim, os ensaios de formação de tubo germinativo e filamentação foram realizados apenas para o OEO. Os resultados mostraram que o OEO na concentração de 0.007 % interfere na filamentação do fungo reduzindo a formação de hifas em até 97 %. Um fato observado ao longo do tempo de incubação, é que após 8 horas de incubação a percentagem de filamentação de hifas e pseudo-hifas voltou a aumentar.

Acreditamos que neste caso, o OEO diminui sua ação sobre a filamentação do fungo em períodos prolongados de incubação, havendo talvez a necessidade de uma nova “dose” para a manutenção da atividade antifúngica. Enquanto na concentração de 0.01 %, a inibição da formação de tubo germinativo foi de praticamente 100 % durante 8 horas de incubação.

A grande problemática deste trabalho foi a elevada citotoxicidade do OEO diante às linhagens de células epiteliais, onde mesmo a concentração 10 vezes menor que a encontrada para CIM, apresentou uma citotoxicidade elevada. Observamos também, que a combinação do OEO com a AgNPs, proporcionou redução importante da citotoxicidade do OEO, tornando interessante sua utilização devido sua importante ação sobre o processo de filamentação do fungo. A ação do óleo essencial de orégano sobre a parede celular fúngica e formação de tubo germinativo já foi demonstrada. Chami e colaboradores [17] observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão que o óleo essencial de orégano, causava rachaduras superficiais na parede celular de *Sacharomyces cerevisiae*. Pozzatti e colaboradores [25] realizaram estudo avaliando a inibição de tubo germinativo de *C. albicans* e *C. dubliniensis* pelos óleos essenciais de orégano e alecrim, observando que *C. albicans* apresentou maior susceptibilidade que *C. dubliniensis*.

Ao final do estudo, realizamos experimentos de dano com LDH, observando que a concentração do OEO que reduzia a formação de hifa, e que apresentava baixa citotoxicidade para as células epiteliais, aboliu o dano celular causado pelo fungo. Quando esta concentração foi associada às AgNPs, não incrementou a redução no dano celular causada pelo OEO. Estes resultados sugerem que a eficácia do composto se deva à inibição de filamentação do fungo pelo OEO, tornando possível obter atividade protetora ótima mesmo diante de baixíssimas concentrações do composto.

Referências

- 1- Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering J.* 2013; 228: 596-613.
- 2- Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron.* 2013; 54-55: 1-27.
- 3- Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI de, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol.* 2005; 3: 8.
- 4- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes M L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric.* 2013; 93: 2707-2714.
- 5- Cleff MB. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Programa de pós graduação em ciências veterinárias; 2008.
- 6- Betancourt L, Phandanauvong V, Patiño R, Ariza-nieto C, Afanador-Téllez G. Composition and Bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* Genus. *Rev Med Vet Zoot.* 2012; 59: 21-31.
- 7- Hummert S, Hummert C, Schröter A, Hube B, Schuster S. Game theoretical modelling of survival strategies of *Candida albicans* inside macrophages. *J Theoretical Biol.* 2010; 264: 312-318.
- 8- Mohanadas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in Different Clinical Samples and their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. *J Global Infect Dis.* 2011; 3: 4-8.
- 9- Yang Y. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; 36: 223-228.
- 10- Naglik JR, Moyes DL, Wächeler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microb Infect.* 2011; 13: 963-976.
- 11- Park H, Liu Y, Solis N, Spotkov J, Hamaker J, Blankenship JR, Yeaman MR, Mitchell AP, Liu H, Filler SG. Transcriptional Responses of *Candida albicans* to Epithelial and Endothelial Cells. *Eucaryotic Cell.* 2009; 10: 1498-1510.

- 12- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard: In: CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2), 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 13- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Jr E, Filler SG, Hube B. The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. *Plos Pathog.* 2009; 4: 1-17.
- 14- Srivastava A, Gijupalli K, Perampali NU, Bhat N, Ballal M. Evaluation of the properties of a tissue conditioner containing origanum oil as an antifungal additive. *J Prosthetic Dentist.* 2013; 110:313-319.
- 15- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 2005; 40: 809-816.
- 16- Vazquez-Nuñez R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *Plos One.* 2014; 10:1-10.
- 17- Chami F, Chami N, Bouchikhi T, Remmal A. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Sacharomyces cerevisiae*. *Phytother Res.* 2005; 19: 405-408.
- 18- El Babili F, Bouajila J, Souchard JP, Bertrand C, Bellvert F, Fouraste I, Moulis C, Valentin A. Oregano: Chemical Analysis and Evaluation of Its Antimalarial Antioxidant, and cytotoxic activities. *J Food Sci.* 2011; 76: 3512-3518.
- 19- Karakaya S, El SN, Karagözü N, Sahin S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Obtained from Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) by Using Different Extraction Methods. *J Med Food.* 2011; 14: 645-652.
- 20- Losasso C, Belluco S, Cibir V, Zavagnin P, Mičetić I, Gallochio F, Zanella M, Bregoli L, Biancotto G, Ricci A. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol.* 2014; 5: 227.
- 21- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett.* 2012; 208: 286-292.
- 22- Kaur J, Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51: 1-14.
- 23- Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2011; 32: 9810-9817.

- 24- Flory JR. Influence of Ph on the transport of Silver Nanoparticles in saturated porous media: Laboratory experiments and modeling. [Tese]. Ohio: Air Force Institute of Technology. Department of the air force air university; 2012.
- 25- Pozzatti P, Loreto ÉS, Nunes MDA, Rossato L, Santurio JM, Alves SH. Activies of essencial oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *J Mycologie Médicale*. 2010; 20: 185-189.
- 26- Moudgal V, Sobel J. Antifungals to treat *Candida albicans*. *Expert Opin. Pharmacother*, 2010; 11(12): 2037-2048.

Conclusão

Apesar da combinação do OEO com nanopartículas de prata ser eficiente na atividade antifúngica contra *C. albicans*, ao avaliar concentrações menores que MIC e não fungicidas observou-se proteção contra o fungo na utilização de concentrações extremamente baixas, tornando possível controlar a infecção pelo fungo, e reduzindo os prejuízos para a microbiota do hospedeiro. Além disso, os compostos interferem em etapas importantes na patogenicidade do fungo, como a invasão e filamentação. Essa atividade diferenciada poderia explicar a interação sinérgica dos compostos na atividade fungicida. Assim, o nosso estudo mostrou que a combinação de compostos sintéticos (nanopartículas) e naturais (óleos essenciais de plantas) é uma interessante alternativa no desenvolvimento de novos antimicrobianos.