

# Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas

## Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on yeasts isolated from HIV positive pregnant women with oral candidiasis

RIALA6/1306

Anna Carolina Borges Pereira da COSTA<sup>1\*</sup>, Guilherme Rodrigues TEODORO<sup>1</sup>, Tatiane Morais FERREIRA<sup>2</sup>, Fernando de Sá SILVA<sup>3</sup>, Aguida MARIA<sup>4</sup>, Sônia KHOURI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP- Univ. Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. E-mail: carol\_biológ@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia- Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) – Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-00. São José dos Campos, São Paulo, Brasil. Tel: (12) 39471000. E-mail: soniak@univa.br

<sup>3</sup>Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup>Seção de Biologia Médica- Instituto Adolfo Lutz (IAL- Taubaté), São Paulo, Brasil

Recebido: 02.06.2009 – Aceito para publicação: 28.08.2010

### RESUMO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em portadores de HIV e, com episódios recorrentes em pacientes com Aids. Com o objetivo de pesquisar novos e eficazes agentes antifúngicos contra cepas resistentes, foi investigada a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em diferentes concentrações, em leveduras isoladas de candidíase oral. O experimento foi realizado por meio da técnica de difusão em ágar. Foram avaliadas cepas padrão de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 157, *Candida glabrata* ATCC 30070, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida dubliniensis* ATCC 778157 e os isolados da cavidade bucal de gestantes HIV positivas, sendo sete *C. albicans*, um *C. tropicalis*, um *C. glabrata* e um *C. krusei*. O óleo essencial foi analisado nas quantidades de 20 e 50 µL, nas concentrações de 10 a 100%, variando de 10 em 10%. Todas as cepas analisadas foram suscetíveis ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações de 70% e 50%, respectivamente, nos volumes de 20 µL e 50 µL. O potencial antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia* desperta interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. **Palavras-chave.** *Candida* spp, *Melaleuca alternifolia*, atividade antifúngica, óleo essencial.

### ABSTRACT

Oral candidiasis is a fungal infection mostly common in people infected with HIV and the recurrent episodes occur in patients with AIDS. Aiming at searching, a new and efficacious drug against resistant strains, the antifungal activity of essential oil from *Melaleuca alternifolia* at different concentrations was assessed on yeasts isolated from oral candidiasis. The experiment was performed by using agar diffusion technique; and the antifungal effect was evaluated on the standard strains of *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 157, *Candida glabrata* ATCC 30070, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida dubliniensis* ATCC 778 157, and on the isolated from the oral cavity of HIV positive pregnant women, being seven *C. albicans*, one *C. tropicalis*, one *C. glabrata* and one *C. krusei*. The essential oil was analyzed in quantities of 20 and 50 µL at 10-100% concentrations, ranging from 10 to 10%. All of the tested strains were susceptible to the *M. alternifolia* essential oil at concentrations of 70% and 50% in volumes of 20 µL and 50 µL, respectively. The antifungal activity of essential oil from *M. alternifolia* holds one's attention in manufacturing new and effective drugs.

**Key words.** *Candida* spp, *Melaleuca alternifolia*, antifungal activity, essential oil.

## INTRODUÇÃO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em pacientes portadores do vírus HIV, podendo ocorrer em mais de 90% dos pacientes com Aids e, muitas vezes, com episódios recorrentes<sup>1,2</sup>.

A espécie mais isolada é a *Candida albicans*, presente em 90% dos casos, seguida pelas espécies *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*<sup>3,4</sup>. A espécie *C. dubliniensis* tem sido associada à candidose bucal em portadores do HIV, porém com baixa prevalência<sup>5,6</sup>.

A resistência do gênero *Candida* ao tratamento com antifúngicos tem sido atribuída a episódios recorrentes da infecção e exposição intermitente e contínua aos antifúngicos, sendo que as espécies não-*albicans* apresentam maior resistência à terapêutica, como observado com *C. krusei*, que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol<sup>4</sup>. Em estudo realizado por Wingeter et al<sup>3</sup>, encontra-se 17% de resistência ou sensibilidade dose dependente aos azóis e à anfotericina B, em isolados de lesão na boca de pacientes HIV positivos, demonstrando que pode haver falha terapêutica no tratamento empírico.

Desta maneira, a qualidade de vida do paciente fica prejudicada, devido à dificuldade de deglutir os alimentos e pela necessidade de tratamento constante com drogas tóxicas. Assim, devido à diminuição da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos convencionais, observou-se um aumento no interesse em utilizar produtos de origem natural com vistas a reduzir o tempo de tratamento e os efeitos colaterais.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) tem sido apontado como uma opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, apresentando efeito antifúngico significativo<sup>7,8</sup>. Constituído principalmente por terpenoides, é utilizado na Austrália por tribos aborígenes há mais de 80 anos e tem sido investigado quanto às suas propriedades farmacológicas. Apresenta ação antifúngica em leveduras do gênero *Candida* por alteração da permeabilidade da membrana, ocorrência de acidificação do meio devido à expulsão de prótons, sugerindo provável dano a membrana mitocondrial e comprometimento da produção de energia<sup>9,10</sup>.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar a ação antifúngica de diferentes concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, frente a leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 157, *C. glabrata* ATCC 30070 e *C. dubliniensis* ATCC 778157 e cepas isoladas de 8 gestantes com HIV que apresentavam candidose bucal, sendo 7 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. glabrata* e 1 *C. krusei*. Estas cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté-SP.

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi obtido comercialmente pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda. As concentrações utilizadas foram de 10 a 100%, variando de 10 em 10%, diluídas em óleo vegetal de amêndoas (Amêndoas leclerc- Leclerc Industrial Ltda) e armazenadas em tubos cônicos estéreis.

Como controle negativo, foi utilizado o nitrato de miconazol na concentração de 2% (20mg/mL) (Vodol®).

As leveduras foram semeadas em placas contendo agar Sabouraud-dextrose (Difco, Detroit, EUA) e mantidas a 37°C por 48h. A seguir, foram transferidas para tubos contendo 3 mL de solução fisiológica estéril a 0,9% e a concentração de leveduras ajustada à escala 0,5 de Mac Farland.

Para a técnica de Pour Plate, em placas de antibiograma pipetou-se 1 mL do inóculo homogeneizado pelo Vortex em 70mL de ágar Sabouraud-dextrose (Difco, Detroit, EUA) à 45-50°C na placa. Esta mistura foi homogeneizada e, após a solidificação do meio de cultura, foram perfurados poços de 5 mm de diâmetro, sendo um poço central e outros ao redor em posições equidistantes.

Para as cepas padrão, a ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* e do óleo vegetal de amêndoas foi avaliada somente no volume de 20 µL.

Para as amostras isoladas da mucosa bucal, foram utilizadas placas distintas nas diluições 20µL ou 50µL do óleo essencial de *M. alternifolia* e óleo de amêndoas puro nos orifícios laterais e no orifício central 10µL do controle negativo (nitrato de miconazol a 2%). As placas foram mantidas por aproximadamente 5 horas à temperatura ambiente em cabine de fluxo laminar, para que as diluições do óleo essencial de *M. alternifolia*, óleo de amêndoas e controle negativo difundissem no meio de cultura. Após o período de pré-difusão, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Decorrido o período de incubação, realizou-se a leitura dos halos de inibição em milímetros.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios realizados com as cepas padrão e cepas isoladas da mucosa bucal no volume de 20 µL são apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2, constam os resultados do volume de 50 µL. Não foi observada atividade antifúngica do óleo vegetal de amêndoas e todas as cepas estudadas apresentaram sensibilidade ao nitrato de miconazol, com halos de inibição que variaram de 25 a 44 mm. (Tabela 1)

As cepas avaliadas apresentaram sensibilidade frente às concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, com destaque para cepa padrão de *C. dubliniensis*, que apresentou halos de inibição (>40 mm), a partir da concentração de 70% (Tabela 1). Esta cepa emergente em lesões bucais em paciente HIV positivos, é capaz de desenvolver resistência ao fluconazol *in vitro* mais rápido que a *C. albicans*<sup>10</sup>.

Todas as cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal no volume de 20 µL, apresentaram halos de inibição a partir

**Tabela 1.** Halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *M. alternifolia* (TTO) (20 µL) e nitrato de miconazol (10 µL) frente às cepas de *Candida* spp isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas e cepas padrão

Cepas	Óleo essencial de <i>Melaleuca. alternifolia</i> (%) e nitrato de miconazol (2%)									
	10-20	30	40	50	60	70	80	90	100	NM*
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	0	0	0	8 ± 0	10 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	15 ± 1	16 ± 2	40 ± 2
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	9	9 ± 2	12 ± 1	13	14 ± 1	16 ± 2	31 ± 3
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	15 ± 1	15 ± 2	15	16	37 ± 2
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	11	12 ± 3	13	14 ± 1	16	25 ± 3
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	8 ± 1	9	14 ± 2	15	16 ± 1	17 ± 1	21 ± 1	35 ± 2
<i>C. tropicalis</i> ATCC 157	0	0	0	8 ± 1	10 ± 2	15 ± 1	17	19	23 ± 2	28
<i>C. glabrata</i> ATCC 30070	0	0	0	0	8 ± 1	10 ± 2	11	12	13 ± 2	29 ± 1
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0	0	0	0	9	10	11 ± 1	11 ± 1	13 ± 2	23 ± 2
<i>C. dubliniensis</i> ATCC 778157	0	10 ± 1	11 ± 1	18 ± 1	39 ± 2	>40	>40	>40	>40	40 ± 3

<sup>1</sup>valores das médias e desvios padrões dos halos de inibição (mm) formados pelas 7 cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal

\*NM: nitrato de miconazol

Resultados numéricos em mm

**Tabela 2.** Halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *M. alternifolia* (50 µL) frente às 10 cepas de *Candida* spp isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas

Cepas	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (%)									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	0	0	4 ± 4	8 ± 3	10 ± 1	11 ± 1	13 ± 1	14 ± 1	16 ± 1	17 ± 3
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	14 ± 2	15 ± 2
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	9 ± 1	11	11	14 ± 1	15 ± 2	16 ± 1	17 ± 2
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	9 ± 1	11	12 ± 1	14	15 ± 1	16 ± 1

<sup>1</sup>valores das médias e desvios padrões dos halos de inibição (mm) formados pelas 7 cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal

Resultados numéricos em mm

da concentração de 50%, com variação dos halos de 8 a 16 mm (Tabela 1). Para o volume de 50 µL, 3 cepas de *C. albicans* apresentaram halos de inibição a partir da concentração de 30%; as outras 4 cepas, a partir da concentração de 40%, com variação de diâmetro de 4 a 17 mm. (Tabela 2)

O diâmetro dos halos de inibição formados pelas concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia* foi menor do que o observado no nitrato de miconazol a 2% (20mg/mL). É possível que a inibição do óleo essencial de *M. alternifolia* não tenha sido maior pelo fato dos componentes de maior atividade antimicrobiana, como os terpenoides, possuírem baixa solubilidade em meios aquosos, impedindo o contato físico com o microrganismo em teste<sup>11</sup>. Porém, foi observada sensibilidade de todas as cepas testadas, no volume de 20 µL, a partir da concentração de 70% (Tabela 1), e no volume de 50 µL, a partir da concentração de 50% (Tabela 2). Corroborando as considerações de Costa et al<sup>11</sup>, é difícil comparar os resultados encontrados no presente estudo com os obtidos por outros trabalhos, pois são empregadas metodologias diferentes, e a composição do óleo essencial pode variar, dependendo do local de plantio, condições de cultivo e época de colheita.

As cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram-se mais sensíveis em relação às cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*. O mesmo foi demonstrado por Mondello et al<sup>12</sup>, que testaram o óleo essencial de *M. alternifolia* em várias cepas do gênero *Candida*, isoladas de pacientes HIV-positivos, e obtiveram Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) menores para cepas de *C. tropicalis*, e maiores para as cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*. Hammer et al<sup>13</sup> observaram um CIM maior para as cepas de *C. glabrata* do que para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Vazquez et al<sup>14</sup> testaram cepas de pacientes com candidemia, candidose de orofaringe sintomática, candidose de esofaringe e colonização assintomática, observando menor atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* em *C. glabrata* e menores CIMs contra *C. albicans*. Neste estudo, a menor sensibilidade foi observada em *C. krusei*, levedura de resistência conhecida ao fluconazol<sup>15</sup>.

Estudos *in vivo* têm sido realizados para avaliar o efeito do óleo essencial de *M. alternifolia* no tratamento de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*<sup>16,17</sup>. Jandourek et al<sup>16</sup> realizaram um estudo clínico em que avaliaram o efeito de uma solução de óleo essencial de *M. alternifolia* em pacientes HIV-positivos com candidose bucal e obtiveram significativa resposta contra as leveduras do gênero *Candida in vivo*.

Para o tratamento de estomatite protética, foram avaliados 27 pacientes por 12 dias de tratamento com uma

mistura de óleo essencial de *M. alternifolia* e Coe-Comfort, um condicionador de tecidos. A partir do terceiro dia, ocorreu diminuição da colonização por leveduras do gênero *Candida* e diminuição da inflamação do palato. Os autores sugeriram usar esta associação como terapia alternativa contra a estomatite protética resistente às terapias convencionais<sup>17</sup>.

Wingeter et al<sup>3</sup> discutiram a alta taxa de resistência dessas leveduras aos antifúngicos convencionais, ressaltando que estes fatos poderiam estimular as indústrias farmacêuticas a diversificar o arsenal terapêutico para a candidose bucal e oferecer novas opções de drogas antifúngicas para o uso tópico em mucosas, tendo em vista a grande ingestão de medicamentos por via oral pelos portadores do HIV.

## CONCLUSÃO

As cepas de candidose bucal mostraram sensibilidade frente às diversas concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, com 100% sensibilidade das leveduras do gênero *Candida*, a partir das concentrações de 70% e 50% nos volumes de 20 µL e 50 µL, respectivamente. Os resultados demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia*, despertando o interesse para o desenvolvimento de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS

1. Souza LB, Pinto LP, Medeiros AMC, Araújo Junior RF, Mesquita OJX. Manifestações orais em pacientes com AIDS em uma população brasileira. *Pesqui Odontol Bras*. 2000; 14 (1): 79-85.
2. Shmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichart PA, Samaranayake LP. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*. 2004; 47: 435-1.
3. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobre CS, Takaki I, Svidizinski IE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40 (3): 272-6.
4. Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97 (2): 253-7.
5. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006; 48 (1): 21-6.

6. Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AA. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 2003; 98 (4): 533-8.
7. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*. 2001; 6: 87-91.
8. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000; 88: 170-5.
9. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: 1081-5.
10. Silva CJ, Barbosa LCA, Maltha CRA, Pinheiro AL, Ismail FMD. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Frag J*. 2007; 22: 474-8.
11. Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. *Rev Odontol UNESP*. 2009; 38 (2): 111-6.
12. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassoni A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and- resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 1223-9.
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 591-5.
14. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Vaishampayan JK, Akins RA. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17: 60-3.
15. Silva JO, Franceschinf AS, Candido RC. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. *Rev Ins Adolfo Lutz*. 2002; 61(2): 113-20.
16. Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*. 1998; 12: 1022-37.
17. Catalán A, Pacheco JG, Martínéz A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105: 327-32.