

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO CANDIDICIDA MÍNIMA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* (TEA TREE OIL) PARA CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA

*Minimum Inhibitory Concentration And Minimum Candidicidal Concentration Of **Melaleuca Alternifolia** (Tea Tree Oil) For Strains Of **Candida albicans** Isolated From Patients With Prosthetic Stomatitis*

Diego Rodrigo Villanueva Macedo¹

Aline Mendes²

Aline Ulbrich Mores³

Magna Menezes de Carvalho Thiele⁴

Rosimeire Takaki Rosa⁵

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa⁶

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato total de *Melaleuca alternifolia*. O extrato foi comparado com o digluconato de clorexidina em diferentes concentrações. Os testes foram realizados utilizando 46 cepas de *Candida albicans* colhidas de pacientes que usavam próteses totais e apresentavam ou não estomatite protética. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de *Melaleuca* foi de 1,25g/l (0,125%) para todas as cepas. A concentração candidicida mínima (CCM) foi de 0,125-0,25g/l (0,125-0,250%). Em comparação o digluconato de clorexidina apresentou uma CIM de 16mg/l para todas as cepas e a CCM foi de 16-32mg/l.

Palavras-chave: *Melaleuca alternifolia*; Tea tree oil; Candidose.

¹ Acadêmico de Biologia – PUCPR.

² Acadêmica de Biologia – PUCPR.

³ Acadêmica de Odontologia – PUCPR.

⁴ M.Sc., Doutoranda em Odontologia (Estomatologia) – PUCPR

⁵ M. Sc., Microbiologista – UNICAMP.

⁶ Professor Adjunto de Microbiologia – PUCPR; edvaldo.rosa@pucpr.br.

Abstract

The present study was conducted in order to evaluate the activity of the total *Melaleuca alternifolia* extract. The extract was compared with chlorhexidine digluconate in different concentrations. Forty-six different strains of *Candida albicans* collected from denture wearing patients with and without prosthetic stomatitis were enrolled in this study. The minimum inhibitory concentration (MIC) value for the Tea Tree Oil was 1.25g/l (0.125%) for all strains. The minimum candidicidal concentration (MCC) obtained was 0.125-0.25g/l (0.125-0.250%). When compared, the chlorhexidine digluconate presented MIC value of 16mg/l for all yeast strains. The MCCs was 16-32mg/l.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*; Tea tree oil; Candidosis.

Introdução

Do arsenal etnofarmacológico australiano, a *Melaleuca alternifolia*, um arbusto de folhas pontiagudas, pertencente à família *Myrtaceae* e conhecida como *tea tree*, é uma planta da qual se extrai um óleo cujas propriedades medicinais são amplamente conhecidas pelas populações aborígenes locais. Outras espécies do gênero ocorrem também na Indonésia, Malásia e Brasil (1).

Os componentes do *tea tree oil* (TTO) são em sua maioria monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois relacionados (2) e estudos recentes confirmaram que esses componentes possuem propriedades farmacológicas diversas, sobretudo antiinflamatórias (3,4) e antimicrobianas (5,6). Contudo, a eficácia do TTO como agente candidicida ou candidostático ainda foram pouco exploradas.

O presente estudo foi conduzido a fim de se comparar o potencial candidicida do TTO com o do digluconato de clorexidina (CHX) pela determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações candidicidas mínimas (CCM) sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com e sem estomatite protética.

Material e Métodos

O óleo total de *Melaleuca alternifolia* (lote SS/ES01) foi gentilmente fornecido pela Australian Plantations Pty Ltd., Wyrallah, Austrália, por intercessão do Dr. T.V. Riley da University of Western Austrália. A composição do óleo foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, como descrito anteriormente (7). Níveis de 1,8-cineol (1,9%) e o terpinen-4-ol (41,3%) estavam em concordância com a International Standard 4730 (8). A análise

quantitativa dos componentes foi conduzida na NSW Agriculture, Environmental Laboratory, Wollongbar, Austrália.

Foram preparadas diluições de TTO 10⁵ de forma a se obter concentrações finais variando entre 20g/l e 0,156g/l em caldo Mueller-Hinton pH7 com Tween 80[®] 0,01% (v/v) (9).

Foram preparadas diluições de CHX 10⁵ de forma a se obter concentrações finais variando entre 256mg/l e 8mg/l em caldo Mueller-Hinton pH7 com Tween 80[®] 0,01% (v/v) (9).

As cepas de *Candida albicans* empregadas neste estudo são provenientes de outro estudo e foram isoladas de pacientes usuários de prótese total com e sem estomatite protética. Foram empregadas 46 cepas que tiveram distinção genotípica determinada pelo método de RAPD-PCR com o *primer* OPA-05 e que se encontram disponíveis na Micoteca do Laboratório de Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LE-PUCPR). As cepas foram divididas em dois grupos, o de pacientes com estomatite protética (CC; n = 21) e o de pacientes sem estomatite (SC; n = 25).

As diferentes cepas foram crescidas em Agar Sabouraud Dextrose a 35°C (+/-2°C). Após 24 horas, foram tomadas algumas colônias, com no mínimo 1mm de diâmetro, que foram diluídas em 2ml de NaCl 0,145M, de modo a se obter suspensões celulares com 1-5x10⁶ células/ml (tubo 0,5 de MacFarland).

Concentração inibitória mínima (CIM)

Foram transferidos volumes de 890 µl de caldo Muller-Hinton pH 7 para tubos estéreis. A esses tubos, foram acrescentados 100µl das diluições de TTO e CHX. Em intervalos de tempo inferiores a 15 minutos, foram acrescentados 10 µl das

suspensões celulares ajustadas. Os tubos foram incubados a 35°C (+/-2°C) por 46-50 horas, em aerobiose e sem agitação. Os testes foram realizados em triplicata. Os controles negativos foram tubos com 990µl de caldo Muller-Hinton pH7 acrescidos de 10 µl das suspensões celulares, sem quaisquer das drogas-teste.

Os crescimentos fúngicos foram verificados visualmente e comparados com os crescimentos observados nos tubos-controle. O crescimento fúngico foi determinado pela turvação do meio de cultura. As menores concentrações de TTO e CHX que inibissem o crescimento (*end points*) foram consideradas como sendo as concentrações inibitórias mínimas (10).

Concentração candidicida mínima (CCM)

As concentrações candidicidas mínimas foram determinadas repicando as células dos tubos *end points* de CIM e dos dois tubos com concentrações imediatamente superiores. As repicagens foram feitas em Agar Sabouraud Dextrose que foi incubado a 35°C (+/-2°C), por 24 horas.

TABELA 1. Concentrações* inibitórias mínimas e candidicidas mínimas de óleo de *Melaleuca alternifolia* e digluconato de clorexidina frente a cepas de *Candida albicans*

| | Tea tree oil | | Digluconato de clorexidina | |
|---------------|---------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | CIM | n cepas (%) | CIM | n cepas (%) |
| Com candidose | 1,25 g/l | 21 (100%) | 8 mg/l | 10 (47,6%) |
| | - | - | 16 mg/l | 11(52,4%) |
| | CCM | n cepas (%) | CCM | n cepas (%) |
| | 1,25 g/l | 21 (100%) | 16 mg/l | 13 (61,9%) |
| | - | - | 32 mg/l | 8 (38,1%) |
| | Sem candidose | CIM | n cepas (%) | CIM |
| 1,25 g/l | | 25 (100%) | 8 mg/l | 8 (32%) |
| | - | - | 16 mg/l | 17 (68%) |
| | | CCM | n cepas (%) | CCM |
| 2,50 g/l | | 7 (28%) | 16 mg/l | 17 (68%) |
| | 1,25 g/l | 18 (72%) | 32 mg/l | 8 (32%) |

* = média de três tubos/cepa; CIM = concentração inibitória mínima; CCM = concentração candidicida mínima

Estatística

Para se destacar a hipótese de que as diferenças de eficiência dos antimicrobianos sobre as cepas de *C. albicans* era devido ao acaso, foi empregado o teste analítico *t* de *Student*, com limite de confiança de 95%.

Resultados

Os resultados das CIMs para o TTO mostraram ocorrer inibição do crescimento fúngico em concentrações iguais e maiores que 1,25 g/l (Tabela 1). Quanto as CCMs, 7 (28%) cepas oriundas de pacientes sem estomatite mostraram-se viáveis mesmo após exposição à concentração de 1,25 g/l de TTO. Todas as cepas isoladas de pacientes com estomatite mostraram-se susceptíveis às concentrações iguais ou maiores que 1,25 g/l. As CIMs não diferiram entre os grupos de *C. albicans* isoladas de pacientes com e sem estomatite ($p > 0.05$). Por outro lado, as cepas isoladas de pacientes com estomatite protética foram mais susceptíveis ao TTO ($p < 0.05$) quando a CCM foi avaliada.

Os resultados das CIMs para CHX se mostraram mais diversificados, com valores variando entre 8mg/l e 16mg/l. Contudo não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0.05$) entre a atividade inibitória da CHX sobre cepas de leveduras isoladas de pacientes com e sem estomatite protética. O mesmo fenômeno se repete no teste de CCM, com valores oscilando entre 16mg/l e 32mg/l ($p > 0.05$).

Quando comparados, os valores CIM e CCM obtidos da ação do CHX mostraram-se mais baixos que aqueles obtidos pela ação do TTO ($p < 0.05$).

Discussão

A estomatite protética é uma patologia comumente encontrada em pacientes portadores de próteses dentais totais e é responsável por grande desconforto nestes. Essa doença decorre do fato dessas próteses apresentarem-se colonizadas por grande número de células de *Candida* sp. Algumas manobras podem ser usadas a fim de se reduzir os níveis de colonização fúngica; contudo, as leveduras têm se tornado cada vez mais hábeis em escapar da ação das drogas anti-sépticas/desinfetantes. A contínua busca por moléculas que possam limitar o desenvolvimento dessas leveduras é uma realidade cada vez mais justificada.

A susceptibilidade das cepas de *C. albicans* ao *tea tree oil*, aqui obtida, foi maior que aquela reportada recentemente em outro estudo (11). Esses autores obtiveram uma atividade inibitória compreendida entre 2,50 e 5,00 g/l, ao passo que todas as cepas aqui avaliadas foram inibidas com 2,50 g/l. A concentração candidicida mínima aqui observada foi quatro vezes menor que a concentração reportada pelo grupo australiano para trinta e nove cepas (84,78%) e duas vezes menor para sete cepas (15,21%). Cabe aqui o adendo de que existe uma discrepância em relação ao tamanho amostral dos dois estudos; enquanto neste estudo foram arroladas quarenta e seis cepas, no outro estudo, os autores avaliaram a eficácia do TTO em apenas duas cepas. Digno de nota é o fato de que as concentrações de 1,8-cineol e terpinen-4-ol nas amostras de TTO dos dois estudos foram muito próximas, o que impede quaisquer inferências em função das concentrações de terpenóides. Em outra publicação (12), o mesmo

grupo reportou que uma amostra de TTO fornecida por outro fabricante e com maior concentração percentual de 1,8-cineol (3,2%) forneceu valores CIM e CCM de 2,50g/l; ainda assim maiores que os aqui reportados. Talvez, a atividade antimicrobiana do TTO seja produto do sinergismo de outros componentes, além desses terpenóides principais.

Contudo, a simples determinação dos valores CIM e CCM não são suficientes para a predição do efeito antifúngico, se estes valores não forem comparados com substâncias de comprovada eficácia; nesse caso, um anti-séptico. Para se estabelecer uma comparação de eficiência, concentrações decrescentes de digluconato de clorexidina foram adicionadas a tubos contendo meio de cultura onde as cepas cresciam, em paralelo. Os resultados deste estudo mostraram que as cepas de *C. albicans*, frente ao digluconato de clorexidina, tiveram seus crescimentos inibidos com $16 \text{ mg/l} \geq \text{CIM} \geq 8 \text{ mg/l}$ e o efeito candidicida foi obtido com $32 \text{ mg/l} \geq \text{CCM} > 16 \text{ mg/l}$, sendo que estes valores estão em conformidade com outros estudos (13,14). Então, quando comparada, a menor concentração inibitória do TTO seria equivalente àquela obtida pelo CHX a 16mg/l e, a menor concentração fungicida do óleo seria equivalente àquela conseguida com 16-32 mg/l de CHX. Contudo, cabe ressaltar que tanto para CIM quanto para CCM, as células fúngicas permaneceram desafiadas pelos anti-sépticos por 24-48 horas sob concentração constante, o que certamente não representa a realidade para a terapêutica com uma forma farmacêutica para bochechos. Ainda, neste estudo, é possível que a eficácia antifúngica do TTO tenha sido subestimada, pois a concentração do surfactante Tween 80® foi menor que a sugerida por outros (15,16), o que pode ter levado a uma dissolução incompleta dos componentes hidrofóbicos do óleo.

O uso de uma concentração de 1,2 g/l de CHX é suficiente para reduzir significativamente a viabilidade de bactérias aderidas às mucosas (17). Essa mesma concentração se mostra eficaz na redução de *Candida* spp. na saliva de pacientes (18,19). Posto isso, é razoável supor que o TTO, mesmo em concentrações relativamente baixas, deve ter uma boa ação terapêutica em pacientes com sinais clínicos de estomatite protética, ou mesmo em outras formas de candidose bucal.

A despeito da equivalência do TTO e do CHX, ainda é necessário que sejam estabelecidos

alguns pontos de interesse, como os níveis de substantividade dos terpenóides, que se fazem necessários para o pronto estabelecimento de esquemas posológicos, além da determinação dos níveis de segurança e dos efeitos colaterais. O TTO pode provocar menor casuística de alteração do paladar e halitose que o CHX (20); em contraposição, o mesmo estudo mostra que o TTO foi responsável por uma maior proporção no número de casos de ardência nas mucosas e náuseas. Alguns outros efeitos adversos provocados pelo TTO e relatados incluem dermatite alérgica por contato e eritema multiforme (21) e ataxia pós-ingestão de pequenas doses (22).

O emprego empírico de preparações à base de TTO tem fornecido resultados promissores no tratamento da candidose orofaríngea em doentes de AIDS não responsivos ao tratamento padrão com fluconazol (23,24).

O potencial alergênico de pequenas concentrações de TTO é tido como baixo (25), quando aplicado sobre a pele saudável. Como existe uma tendência de diferentes grupos em desenvolver produtos para uso intra-oral, sobretudo no tratamento ou na profilaxia das candidoses, é imprescindível que seja avaliado o potencial tóxico/alergênico do TTO sobre mucosas inflamadas.

Nos pacientes usuários de próteses totais, as diferentes espécies de *Candida* podem se aderir tanto à mucosa quanto ao acrílico, que servirá como repositório. Nesse caso, formulações de anti-sépticos incorporados a géis inertes que seriam aplicadas nas superfícies voltadas às mucosas poderiam levar a uma redução no número de células fúngicas. Entretanto, uma confirmação dessa hipótese, levada a termo em um estudo com gel de clorexidina não foi conseguida (26). Uma substituição do agente antimicrobiano, bem como a formulação de um produto de liberação lenta e contínua podem se mostrar úteis na remissão dos quadros de estomatite protética. Além disso, já foi reportado que concentrações de TTO muito aquém da MIC (1/128 MIC) podem inibir a formação de tubo germinativo em *C. albicans*, condição *sine qua non* para a formação de hifas e conseqüente tigmotropismo sobre superfícies de acrílico de dentaduras (27).

Em suma, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* demonstra ser um agente com potencial valor terapêutico na redução do número de células de *Candida albicans* em pacientes usuários de dentaduras e com estomatite protética.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Australian Plantations Pty Ltd. e ao Dr. Thomas Rilley pelo fornecimento da amostra de *tea tree oil*.

Referências

1. Altman PM. Australian Tea Tree Oil. *Austr J Pharm* 1988; 69:276-278.
2. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian Tea Tree). *J Agric Food Chem* 1989; 37:1330-1335.
3. Brand C, Grimbaldston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea Tree Oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflam Res* 2002; 51:236-244.
4. Koh KJ, Marshman G, Hart PH. Tea Tree Oil reduces histamine-induced skin inflammation. **Br J Dermatol** 2002; 147:1212-1217.
5. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lyses leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46:1914-1920.
6. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:195-199.
7. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *J Appl Microbiol* 1999; 86(3):446-452.
8. International Organisation for Standardisation. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil) (ISO 4730:1996). Geneva: Switzerland. International Organisation for Standardisation; 1996.

9. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
10. Espinel-Ingroff A, Steele-Moore L, Galgiani JN. Evaluation of 80% inhibition standards for the determination of fluconazole minimum inhibitory concentrations in three laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; *20*(2): 81-86.
11. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 2003; *95*(4):853-860.
12. 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*(5):591-595.
13. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; *46*(6):1773-1780.
14. Imbert C, Lassy E, Daniault G, Jacquemin JL, Rodier MH. Treatment of plastic and extracellular matrix components with chlorhexidine or benzalkonium chloride: effect on *Candida albicans* adherence capacity in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2003; *51*(2):281-287.
15. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol* 2000; *38*:355–362.
16. Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol* 2003; *37*(2):185-187.
17. Rosin M, Welk A, Bernhardt O, Ruhnau M, Pitten F, Kocher T, Kramer A. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J Clin Periodontol* 2001; *28*(12):1121-1126.
18. Ferretti GA, Ash RC, Brown AT, Largent BM, Kaplan A, Lillich TT. Chlorhexidine for prophylaxis against oral infections and associated complications in patients receiving bone marrow transplants. *J Am Dent Assoc* 1987; *114*(4):461-467.
19. Persson RE, Truelove EL, Leresche L, Robinovitch MR. Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; *72*(2):184-191.
20. Groppo FC, Ramacciato JC, Simoes RP, Florio FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J* 2002; *52*(6):433-437.
21. Crawford GH, Sciacca JR, James WD. Tea tree oil: cutaneous effects of the extracted oil of *Melaleuca alternifolia*. *Dermatitis* 2004; *15*(2):59-66.
22. Morris MC, Donoghue A, Markowitz JA, Osterhoudt KC. Ingestion of tea tree oil (*Melaleuca* oil) by a 4-year-old boy. *Pediatr Emerg Care* 2003; *19*(3):169-171.
23. 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*(9):1033-1037.
24. Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in patients with AIDS. *AIDS* 2002; *12*:1033–1037.
25. Fritz TM, Burg G, Krasovec M. Allergic contact dermatitis to cosmetics containing *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Ann Dermatol Venereol* 2001; *128*(2):123-126.
26. Budtz-Jorgensen E, Knudsen A. Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol Scand* 1978; *36*(2):83-87.
27. Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Makihira S, Samaranayake LP. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. *Mycopathologia* 1998; *144*(3):125-129.

Recebido em / Received: November 4, 2005.

Aceito em / Accepted: march 3, 2006.