

# Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*

## Antifungal Activity of Three Essential Oils on *Candida* Strains

Yuri W. CAVALCANTI<sup>1</sup>, Leopoldina F. D. ALMEIDA<sup>2</sup>, Wilton W. N. PADILHA<sup>3</sup>

1 - Graduando em Odontologia. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/UFPB/CNPq) – Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba, DCOS-UFPB, 58051-900, João Pessoa-PB, Brasil.

2 - Pós-Graduanda em Odontologia (Odontologia Preventiva Infantil) – Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba, DCOS-UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

3 - Professor Doutor Titular de Clínica Integrada – Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba, DCOS-UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre *Candida albicans* (ATCC289065), *C. albicans* (ATCC40227), *C. krusei* (ATCC40147), *C. tropicalis* (ATCC40042) e *C. tropicalis* (ATCC13803). Determinou-se a atividade antifúngica pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), obtidas através das técnicas de microdiluição e de esgotamento, respectivamente. Em microplacas de 96 poços foram inseridos 100µL de caldo *Sabouraud-Dextrose* duplamente concentrado, 100µL da diluição dos óleos essenciais e 10µL do inóculo fúngico (1,5x10<sup>6</sup> microrganismos/mL). Realizou-se diluição seriada dos produtos partindo-se da concentração inicial de 8% até 0,0625%. A CIM correspondeu a menor diluição na qual se verificou ausência de crescimento fúngico visível. Realizou-se a semeadura, em Ágar *Sabouraud-Dextrose*, de 10µL

das diluições correspondentes a CIM e duas imediatamente anteriores. Os testes foram realizados em triplicata e a Nistatina (100.000UI/mL) serviu de controle. Procedeu-se análise estatística pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn. Para *R. officinalis*, observou-se melhor desempenho frente *C. albicans* (ATCC289065) e *C. tropicalis* (ATCC40042), com CIM e CFM iguais a 0,5626mg/mL. *M. alternifolia* e *C. winterianus* apresentaram melhor desempenho frente *C. tropicalis* (ATCC40042), com CIM e CFM iguais a 0,5626mg/mL. O óleo essencial de *R. officinalis* apresentou atividade antifúngica estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ), com menores valores de CIM e CFM. Não se observou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para a ação de *M. alternifolia* e *C. winterianus*. Concluiu-se que os produtos avaliados exerceram atividade antifúngica sobre *Candida*, destacando-se o óleo essencial de *R. officinalis*, com menores CIM e CFM.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleos essenciais, produtos naturais, candidíase bucal, produtos com ação antimicrobiana.

### INTRODUÇÃO

A candidíase bucal é uma das infecções humanas de natureza fúngica mais comum; sendo descrita como uma infecção oportunista, frequentemente envolvida com a alteração da microbiota bucal, doenças sistêmicas e redução da imunidade do hospedeiro<sup>1,2</sup>.

A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente e de maior patogenicidade entre as cepas envolvidas com o desenvolvimento da candidíase bucal<sup>1,3</sup>. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* também fazem parte do curso da doença e, junto a *C. albicans*, chegam a representar mais de 80% dos isolados clínicos<sup>1,3,4</sup>.

Segundo Rex *et al.*<sup>5</sup> (2000) e Khan *et al.*<sup>6</sup> (2009), as espécies de *Candida* têm se mostrado resistentes diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos sintéticos. Com o objetivo de identificar substâncias alternativas ao uso de medicamentos tradicionais, foram desenvolvidos estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais<sup>7-11</sup>. Desta forma, a busca de produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente

frente a microrganismos resistentes se mostra uma alternativa necessária para o controle da candidíase bucal<sup>5,7,9,11</sup>.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre espécies de *Candida* foi descrita por Lima *et al.*<sup>9</sup> (2006), Fontenelle *et al.*<sup>8</sup> (2007), Pozzatti *et al.*<sup>11</sup> (2009) e Packer e Luz<sup>12</sup> (2007). Os estudos de Lima *et al.*<sup>9</sup> (2006) e Packer e Luz<sup>12</sup> (2007) utilizaram a técnica de difusão em ágar, considerada inadequada para verificação da concentração inibitória mínima e fungicida de óleos essenciais. Os estudos de Fontenelle *et al.*<sup>8</sup> (2007) e Pozzatti *et al.*<sup>11</sup> (2009) utilizaram a técnica da microdiluição, porém apresentaram resultados divergentes entre si.

Para o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela), foi verificada atividade antifúngica sobre espécies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium*<sup>13</sup>, verificando-se a ausência de estudos sobre a atividade antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida*. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) teve atividade antifúngica relatada por vários estudos<sup>12-16</sup>, os quais utilizaram diferentes parâmetros e diferentes

constituintes do produto natural.

A utilização dos óleos essenciais como substância antimicrobiana se justifica pelo menor custo e menor resistência microbiana, sendo possível o emprego na constituição de produtos odontológicos. Os relatos da literatura ainda são escassos quanto às concentrações inibitórias e fungicida desses produtos, de modo que se verifica a necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica, com o objetivo de justificar e validar o uso clínico dos óleos essenciais.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre cepas de *Candida*.

## MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se um estudo de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório<sup>17</sup>.

As cepas de referência utilizadas no estudo foram *Candida albicans* (ATCC 289065), *C. albicans* (ATCC 40227), *C. krusei* (ATCC40147), *C. tropicalis* (ATCC 40042) e *C. tropicalis* (ATCC 13803). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ, Brasil). As cepas foram reativadas em Caldo *Sabouraud-Dextrose* (DIFCO®, Detroit, Michigan, EUA), a 37°C e estocadas em Ágar *Sabouraud-Dextrose* 4% (DIFCO®, Detroit, Michigan, EUA) no Laboratório de Microbiologia Oral – Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Para condução do estudo, suspensões fúngicas dos microrganismos foram preparadas em solução salina, sob a concentração  $1,5 \times 10^6$  microrganismos/mL, equivalente ao tubo 10<sup>6</sup> da Escala de MacFarland.

Para avaliação antifúngica *in vitro* foram utilizados óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Esses produtos foram obtidos da empresa Ferquima® (Ind. e Com. Ltda), a qual cedeu Laudo Técnico com especificações, conforme apresentado na Tabela 01.

**Tabela 01.** Especificações técnicas dos óleos essenciais utilizados no estudo, segundo laudo técnico expedido pela empresa Ferquima® (Ind. e Com. Ltda)

Óleos essenciais	Lote	Impurezas	Densidade (g/mL, 20°C)	Origem	Principais componentes
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Melaleuca)	179	Isento	0,896	Austrália	Terpinen-4-ol γ-terpineno α-terpineno Cineol
<i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela)	121	Isento	0,891	China	Citronelal Geraniol Citronelol
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	141	Isento	0,912	Tunísia	1,8 Cineol + limoneno + para-cimeno α-pineno Cânfora

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram inicialmente diluídos em água destilada estéril, obtendo-se a concentração 16%, considerada a solução-padrão inicial para todos os produtos avaliados. Para obtenção dessas diluições, considerou-se a densidade das substâncias igual a 0,9 g/mL, conforme especificações do fornecedor. Utilizou-se o método de diluição descrito por Aligiannis *et al.*<sup>18</sup> (2001) e Lima *et al.*<sup>9</sup> (2006), no qual foram adicionados em tubos de vidro estéril: 0,8 mL do óleo essencial; 0,05 mL de Tween 80; e 4,2 mL de água destilada estéril. O conjunto foi agitado durante 5 minutos em aparelho agitador de soluções tipo Vortex (Mod. AP56, Phoenix) e a concentração final obtida foi de 16%, equivalente a 144 mg/mL. Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), os óleos essenciais foram diluídos de forma seriada, mediante emprego da técnica da microdiluição<sup>7,18</sup>.

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Cada uma dessas placas destinou-se a análise de um microrganismo. As colunas 1, 2 e 3 foram destinadas a análise antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; as colunas 4, 5, e 6 ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*; e as colunas 7, 8 e 9, ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. A coluna 10 foi destinada ao Controle de Crescimento; a coluna 11 ao Controle de Esterilidade; e a coluna 12 ao Controle Positivo (Nistatina - suspensão comercial - 100.000 UI/mL).

Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100µL de caldo *Sabouraud-Dextrose* duplamente concentrado. Em seguida, inseriu-se 100µL das emulsões dos óleos essenciais para obtenção da concentração inicial de 8% (72,0 mg/mL) na primeira linha da placa de microdiluição<sup>7,18</sup>. As concentrações subsequentes dos óleos essenciais foram obtidas após diluição seriada dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 8% (Linha A) até 0,0625% (Linha H), pela transferência de 100µL do conteúdo ao poço subsequente<sup>18</sup>. Para os poços da linha H, foram dispensados 100µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. As concentrações (em porcentagem e em mg/mL) dos produtos analisados após a diluição seriada são apresentadas na Tabela 02.

**Tabela 02.** Diluições Seriadadas dos Óleos Essenciais obtidas pela técnica de avaliação antimicrobiana por microdiluição<sup>2,12</sup>

Linhas	Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
A	8	72,0
B	4	36,0
C	2	18,0
D	1	9,0
E	0,5	4,5
F	0,25	2,25
G	0,125	1,125
H	0,0625	0,5625

Posteriormente, foram inseridos 10µL da suspensão fúngica (1,5x10<sup>6</sup> microrganismos/mL) em todos os poços, exceto à coluna correspondente ao controle de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37<sup>o</sup>, por 48h. A CIM correspondeu à última diluição dos óleos essenciais na qual não foi verificada a presença de precipitado fúngico ou turvação no meio de cultura após o período de incubação<sup>11,18</sup>.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi obtida por meio da semeadura, em Ágar *Sabouraud-Dextrose*, de alíquotas de 10µL das diluições correspondentes a CIM e duas imediatamente anteriores (2CIM e 4CIM)<sup>7,11</sup>. Após a semeadura dos conteúdos dos poços das placas de microdiluição, as placas de petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37<sup>o</sup>, por 24h. A CFM foi considerada a menor concentração substância que impediu o crescimento visível do subcultivo ou a formação de até três Unidades Formadoras de Colônia (UFC)<sup>11</sup>. Assim, as concentrações em que se verificou a formação de mais de três UFC foram consideradas inibitórias ao crescimento fúngico (CIM); enquanto as concentrações na qual se observou nulidade de crescimento, ou menos de 3 UFC, foram consideradas fungicidas (CFM).

Todos os testes foram realizados em triplicata. As unidades de comparação estatística foram as diluições seriadas nas quais se observou CIM e/ou CFM. Os dados foram tabulados no programa GraphPad Prism 5.0 (Programa PraphPad for Windows, San Diego, CA - USA), pelo qual se procedeu a análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn<sup>8</sup>, sendo adotado nível de significância de 95%.

## RESULTADOS

A metodologia empregada neste estudo foi validada pela ausência de crescimento fúngico para o controle de esterilidade e controle positivo (Nistatina - suspensão comercial - 100.000 UI/mL), bem como pela presença de crescimento fúngico para o controle de crescimento.

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos testados, sobre as cepas de *Candida*, são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 03 e 04.

O óleo essencial de *R. officinalis* apresentou menores valores de CIM e CFM, o que representa maior atividade antifúngica diante dos demais produtos, sendo esta diferença estatística-

mente significativa (p<0,05). Não foi observada diferença estatisticamente significativa (p>0,05) para atividade antifúngica dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. winterianus*.

## DISCUSSÃO

As técnicas para determinação da CIM e CFM empregadas neste estudo foram baseadas nos protocolos descritos por Ali-giannis *et al.*<sup>18</sup> (2001) e Castro e Lima<sup>7</sup> (2010), os quais representam modificação das normas estabelecidas por NCCLS<sup>19</sup> (2002). O método de referência para técnica de microdiluição e determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica (M7-A2), descrita por NCCLS<sup>19</sup> (2002), considera a avaliação de antifúngicos sintéticos, a utilização do meio de cultura RPMI-1640 e a padronização da concentração inicial das substâncias testadas em 64µg/mL ou 16 µg/mL.

O presente estudo foi desenvolvido em condições diferentes das estabelecidas por NCCLS<sup>19</sup> (2002). Segundo Nascimento *et al.*<sup>10</sup> (2007), a normatização M7-A2 proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca quando da avaliação antimicrobiana de óleos essenciais. Considera-se que as propriedades químicas desses produtos naturais diferem daquelas apresentadas pelas substâncias para qual a norma foi padronizada, ou seja, a normatização do NCCLS não atende às especificidades dos óleos essenciais<sup>10</sup>. Dessa forma, foi reproduzido o protocolo descrito por Ali-giannis *et al.*<sup>18</sup> (2001) e por Castro e Lima<sup>7</sup> (2010), no qual foi empregado o meio de cultura Caldo *Sabouraud-Dextrose*, a Nistatina como controle positivo, a diluição seriada dos produtos testados e a incorporação de emulsificante (Tween 80) na preparação dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, que apresentam insolubilidade em água e complexidade química, o que dificulta a padronização de técnicas confiáveis, que possam ser reproduzidas e validadas, de modo a alcançar resultados seguros<sup>7,10,20</sup>. Dessa forma, para minimizar a inconsistência dos resultados obtidos, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de proporcionar maior contato entre os produtos testados e as células fúngicas. Utilizou-se também um agente emulsificante (Tween 80) para permitir a diluição dos óleos essenciais em meio aquoso. Essas medidas contribuem para redução de viés metodológico e comparação entre os produtos naturais testados<sup>7,20</sup>. Ao comparar as técnicas de disco-difusão

**Tabela 03.** Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos óleos essenciais testados, sobre as cepas de *Candida*.

Cepas	Produtos	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Melaleuca)	<i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)
<i>C. albicans</i> ATCC 289065		2,25 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	0,5625 <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 40277		9,0 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	2,25 <sup>b</sup>
<i>C. krusei</i> ATCC 40147		4,5 <sup>a</sup>	9,0 <sup>a</sup>	1,125 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 40042		0,5625 <sup>a</sup>	0,5625 <sup>a</sup>	0,5625 <sup>a</sup>
<i>C. tropicali</i> ATCC 13803		2,25 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	1,125 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significante (p <0,05 - Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

**Tabela 04.** Concentração Fungicida Mínima (mg/mL) dos óleos essenciais testados, sobre as cepas de *Candida*.

Cepas	Produtos	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Melaleuca)	<i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)
<i>C. albicans</i> ATCC 289065		2,25 mg/mL <sup>a</sup>	4,5 mg/mL <sup>a</sup>	0,5625 mg/mL <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 40277		9 mg/mL <sup>a</sup>	18 mg/mL <sup>a</sup>	2,25 mg/mL <sup>b</sup>
<i>C. krusei</i> ATCC 40147		4,5 mg/mL <sup>a</sup>	9 mg/mL <sup>a</sup>	2,25 mg/mL <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 40042		0,5625 mg/mL <sup>a</sup>	0,5625 mg/mL <sup>a</sup>	0,5625 mg/mL <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803		2,25 mg/mL <sup>a</sup>	2,25 mg/mL <sup>a</sup>	1,125 mg/mL <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significante (p <0,05 - Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

e microdiluição para avaliação da atividade antifúngica de produtos naturais, Scorzoni *et al.*<sup>20</sup> (2007) identificaram que a microdiluição foi mais sensível para determinação da CIM.

O Controle Positivo (Nistatina - suspensão comercial - 100.000 UI/mL), o Controle de Esterilidade e o Controle de Crescimento foram empregados de modo a validar a técnica utilizada neste estudo. A ausência de crescimento fúngico diante da Nistatina (100.000 UI/mL) demonstra a susceptibilidade das amostras frente a um antifúngico sintético. Dessa forma, ao considerar as diferenças entre a natureza química dos óleos essenciais e do Controle Positivo, não foi possível comparar os resultados obtidos por essas substâncias<sup>10</sup>. O Controle de Esterilidade e de Crescimento comprovaram, respectivamente, a ausência de contaminação do meio de cultura e a viabilidade das cepas testadas.

A composição informada dos produtos testados nesta investigação está de acordo com os relatos da literatura. Segundo Souza *et al.*<sup>13</sup> (2005) e Mondello *et al.*<sup>15</sup> (2006), a atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente dos principais componentes químicos como terpinenol, citronelal, cineol, limoneno e cimeno. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas e antimicrobianas dos óleos essenciais e devem ter suas propriedades físico-químicas e biológicas estudadas<sup>13,15</sup>.

A natureza lipossolúvel dos óleos essenciais e de seus constituintes permite a interação com estruturas celulares que tem constituição lipídica, resultando no aumento da permeabilidade das membranas, o que pode provocar desequilíbrio eletrolítico e morte celular<sup>7,10,21</sup>. Ao avaliar os efeitos da ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, Hammer *et al.*<sup>21</sup> (2004) verificaram que o óleo essencial de *M. alternifolia* alterou a permeabilidade e a fluidez da membrana entre as concentrações 0,25% e 1,0%, o que sugere a ação antifúngica pelo comprometimento das funções e alteração das propriedades da membrana. Ao analisar a morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura, Phongpaichit *et al.*<sup>22</sup> (2004) demonstraram que culturas fúngicas apresentaram colapso e desnaturação celular após exposição a extratos de produtos naturais. Dessa forma, os relatos da literatura apontam que o mecanismo de ação dos óleos essenciais está envolvido com alteração da permeabilidade da membrana celular.

Ao determinar a CIM do óleo essencial de *M. alternifolia* frente cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, Oliva *et al.*<sup>23</sup> (2003), Mondello *et al.*<sup>16</sup> (2003) e Hammer *et al.*<sup>24</sup> (2003) identificaram ação inibitória entre as concentrações 0,06% e 0,5%. Segundo os mesmos autores, a CFM do óleo essencial de *M. alternifolia* frente cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* variou entre as concentrações 0,125% e 0,5%. Verificou-se atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* em concentrações inferiores a 1%, o que indica forte potencial antimicrobiano<sup>24</sup>. Dessa forma, os resultados deste estudo foram semelhantes e corroboram os achados da literatura.

Entre os produtos avaliados, o óleo essencial de *C. winterianus* apresentou atividade antifúngica estatisticamente semelhante óleo essencial de *M. alternifolia*. No entanto, não foram identificados na literatura estudos sobre a atividade antifúngica desse produto sobre *Candida sp.* Vargas *et al.*<sup>25</sup> (2010) avaliaram o efeito antimicrobiana e citotóxico do óleo essencial de *Cymbo-*

*pogon citratus* pertencente ao mesmo gênero de *C. winterianus*. Os mesmos autores identificaram atividade antimicrobiana e discreto efeito citotóxico na concentração de 0,1% do produto natural<sup>25</sup>. No presente estudo, a concentração do óleo essencial de *C. winterianus* necessária para inibição da cepas de *Candida* variou de 0,0625% até 2% (Tabelas 3 e 4). A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus* sobre fungos filamentosos das espécies *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi investigada por Souza *et al.*<sup>13</sup> (2005), sendo verificada a ação antifúngica apenas na concentração pura. Sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas, o óleo essencial de *C. winterianus* apresentou CIM entre as concentrações de 20% e 5%<sup>26</sup>. Para ambos os estudos, o óleo essencial de *C. winterianus* apresentou atividade antimicrobiana. No entanto, os resultados desta investigação demonstraram atividade antifúngica em menores concentrações quando comparados aos escassos relatos da literatura sobre a atividade antimicrobiana de *C. winterianus*.

A atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* foi demonstrada por Lima *et al.*<sup>9</sup> (2006) e Packer e Luz<sup>12</sup> (2007), os quais utilizaram a técnica de difusão em agar e identificaram ação fungistática em concentrações superiores a 8%. Semelhante ao presente estudo, Fontenelle *et al.*<sup>8</sup> (2007) e Pozzatti *et al.*<sup>11</sup> (2009) empregaram a técnica de microdiluição para avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* sobre *Candida*.

Segundo Fontenelle *et al.*<sup>8</sup> (2007), o óleo essencial de *R. officinalis* frente *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentou CIM entre 0,62 mg/mL e 2,5 mg/mL, e CFM entre 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL. Diferentemente, o estudo de Pozzatti *et al.*<sup>11</sup> (2009) verificou a ausência de ação fungistática e fungicida do óleo essencial de *R. officinalis* sob a concentração de 3,2 mg/mL. Os resultados deste estudo corroboram os achados de Fontenelle *et al.*<sup>8</sup> (2007), os quais traduzem adequada atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* em baixas concentrações.

A metodologia empregada neste estudo demonstrou a existência de atividade antifúngica dos produtos testados, e o melhor desempenho do óleo essencial de *R. officinalis* quando comparado a *M. alternifolia* e *C. winterianus*. Verifica-se a necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica desses produtos, com o objetivo de justificar e validar o uso clínico dos óleos essenciais. Estudos subsequentes devem considerar a avaliação da atividade antifúngica diante de cepas clínicas e outras linhagens padronizadas empregando técnicas que considerem o isolamento de fitoconstituintes, a aderência celular, a formação de biofilme *in vitro*, a influência da saliva humana e a toxicologia desses produtos.

## CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, concluiu-se que os produtos avaliados exerceram atividade antifúngica contra cepas de *Candida*, destacando-se o óleo essencial de *R. officinalis*, com menores CIM e CFM.

## REFERÊNCIAS

01. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78(2):455-9.

02. Corrêa EM, Andrade ED. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. *Rev Odonto Ciênc.* 2006;20(49):281-9.
03. Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Yamashiro H, Samaranyake LP. Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses.* 1999;42(1):37-40.
04. Crocco E, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An Bras Dermatol.* 2004;79(6):689-97.
05. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE *et al.* Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis.* 2000;30(4):662-78.
06. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM *et al.* Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Mol Cells.* 2009; 14(2): 586-97.
07. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* *Rev Odontol UNESP.* 2010;39(3):179-184.
08. Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Kerntopf MR, Brillhante RSN, Cordeiro RA *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J Antimicrob chemother.* 2007;59(3):934-40.
09. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(2):197-201.
10. Nascimento PFC, Nascimento ALC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007;17(1):108-13.
11. Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses.* 2009;53(1):12-5.
12. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17(1):102-7.
13. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. *Braz Arch Biol Technol.* 2005;48(2):245-50.
14. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):50-62.
15. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida species*. *BMC Infect Dis.* 2006;6(11):158-65.
16. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J. Antimicrob Chemother.* 2003;51(3):1223-9.
17. Lakatos EM, Marconi MA. Fundamentos da Metodologia Científica. São Paulo: Atlas; 2009. 379p.
18. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou JB. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. *J Agric Food Chem.* 2001;49(9):4168-70.
19. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Norma M27-A2 do NCCLS. Pensilvânia: NCCLS; 2002. 51p.
20. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp.* *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):25-34.
21. 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(5):1081-5.
22. Phongpaichit S, Pujenjob N, Rukachaisirikul V, Ongsakul M. Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2004;26(5):741-8.
23. 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):185-7.
24. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003;95(8):853-60.
25. Vargas FS, Oliveira CF, Giro EMA, Sacramento LVS, Spolidorio DMP, Costa CAS. Efeito Antimicrobiano e Citotóxico do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* sobre células Odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central.* 2010;19(49):101-7.
26. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 2006;39(11):486-94.

## ABSTRACT

The aim was to evaluate the antifungal activity of essential oils from *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Cymbopogon winterianus* (citronella), and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) on *Candida albicans* (ATCC289065), *C. albicans* (ATCC40227), *C. krusei* (ATCC40147), *C. tropicalis* (ATCC40042) and *C. tropicalis* (ATCC13803). The antifungal activity was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC), obtained through the microdilution and exhaustion techniques, respectively. In 96-well microplates were inserted 100µL of Sabouraud-Dextrose broth doubly concentrated, 100µL of the dilution of essential oils and 10µL of

fungal inoculums (1.5x10<sup>6</sup> microorganisms/mL). The products were diluted from initial concentration of 8% until 0.0625%. The MIC corresponded to the lowest dilution at which there was no visible fungal growth. Aliquots of 10µL of dilutions corresponding to the MIC and two immediately preceding were sown on Sabouraud-Dextrose agar. The tests were performed in triplicate and nystatin (100,000UI/mL) served as control. Statistical analysis was conducted by Kruskal-Wallis and Dunn tests. For *R. officinalis*, better performance was observed on *C. albicans* (ATCC289065) and on *C. tropicalis* (ATCC40042), with MIC and MFC at 0.5625mg/mL. *M. alternifolia* and *C. winterianus* presented better performance on *C. tropicalis* (ATCC40042), with MIC and MFC at 0.5625mg/mL. The essential oil from *R. offici-*

*nal* presented antifungal activity statistically different ( $p < 0.05$ ), with lower MIC and MFC. No statistical difference ( $p > 0.05$ ) was observed for the antifungal activity of *M. alternifolia* and *C. winterianus*. It was concluded that the evaluated products exerted

antifungal activity against *Candida*, highlighting the essential oil from *R. officinalis*, with lower MIC and MFC.

**KEYWORDS:** Essential oils, natural products, oral candidiasis, products with antimicrobial action.

---

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:**

Yuri Wanderley Cavalcanti  
Av. Des. Hilton Souto Maior, 6701. Qd. 765,  
Lt. 117, Portal do Sol, CEP: 58046-600  
João Pessoa – Paraíba, Brasil  
Tel: (83) 8855-0405  
yuri.wanderley@yahoo.com.br