

## AVALIAÇÃO CURATIVA DO ÓLEO DE MEMALEUCA ALTERNIFOLIA NA CANDIDÍASE ORAL EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS

 <https://doi.org/10.56238/arev6n3-300>

**Data de submissão:** 22/10/2024

**Data de publicação:** 22/11/2024

### **Wagner Alex de Medeiros Silva**

Formação: Mestrado em Gestão e Sistemas Agroindustriais  
Instituição: Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)  
E-mail: wagalms@icloud.com  
Orcid: 0000-0002-1373-2986  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1122179078603005>

### **Andréa Maria Brandão Mendes de Oliveira**

Formação: Doutoramento em Química  
Instituição: Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)  
E-mail: andrea.maría@professor.ufcg.edu.br  
Orcid: 0000-0003-2313-1508  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7363025139137477>

### **Luiz Fernando de Oliveira Coelho**

Formação: Mestrado em Gestão e Sistemas Agroindustriais  
Instituição: Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)  
E-mail: luiz.fernando@tecnico.ufcg.edu.br  
Orcid: 0000-0002-4680-1634  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1745613417742413>

### **RESUMO**

A presente pesquisa tem como objetivo verificar, medir e testar a eficácia microbicida do óleo essencial de Melaleuca *in vitro* contra o patógeno *Candida albicans*. O estudo é uma pesquisa experimental, desenvolvida no MicroLAB/UFCG e BM-Biolam, avaliando o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) contra patógenos *in vitro* em ágar Saboraud dextrose - TEA, submetendo-os a fatores de variação, incubados em uma incubadora do tipo BOD a 36,1 $\pm$ °C, de acordo com o inóculo quantitativo do microrganismo. Para a *Candida albicans*, a CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 16  $\mu\text{L g}^{-1}$  (EC50%) em CA-I até 128  $\mu\text{L g}^{-1}$  (EC100%) em CA-II do TTO isolado demonstrou atividade equivalente à *Cet*, atingindo sua eficácia máxima na EC100% de 240  $\mu\text{L g}^{-1}$  em CA-III quando associado. Em relação ao efeito remissivo (ERD), a probabilidade de sobrevida - PS em 50% (IC50) em CA-I foi de 19,1% (A), em CA-II com o índice de 35,7% (C) e em CA-III no valor próximo a 44,4% (E). Nesse contexto, ao avaliar os antibiogramas contra os táxons, é possível sugerir o uso de OTT no preparo de enxaguatórios bucais com valor de  $[\sigma_{ca}] \leq 128 \mu\text{L g}^{-1}$  e  $D \geq 16 \text{ mm}$ , atestando a viabilidade da inclusão do óleo essencial como fitoterápico como via alternativa complementar em tratamentos odontológicos clínicos causados por *Candida albicans* que desencadeiam candidíase oral, sendo eficazes contra o patógeno descrito, eliminando-o em um intervalo de tempo de  $T \leq 8$  dias quando associado.

**Palavras-chave:** Candida albicans. Melaleuca Alternifolia. Candidíase. Eficácia. Concentração inibitória 50.

## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase, produzida por leveduras de várias espécies, pertence ao gênero *Candida* e apresenta uma grande variedade de condições clínicas. Naturalmente, esses fungos fazem parte da microbiota da boca, sistema gastrointestinal, pele e vagina, e só produzem infecções na mucosa na presença de fatores predisponentes, por fungos oportunistas. Em geral, a candidíase tem sua origem endogena e pode ser atribuída a uma de duas causas: desequilíbrio da microbiota acompanhante ou doenças e processos que influenciam a resposta imune, como tratamento prolongado com corticoides, doenças extremas, síndrome da imunodeficiência adquirida, entre outras<sup>1</sup>.

A candidíase se manifesta como doenças das camadas mucosas oral e genital, pele e unhas, podendo ocorrer infecções recorrentes e, menos frequentemente, apresentar-se como candidíase invasiva em indivíduos imunocomprometidos, com morbidade e mortalidade muito elevadas<sup>1</sup>. O gênero *Candida* é o principal grupo de leveduras causadoras de infecções oportunistas em humanos e compreende aproximadamente 200 espécies distintas, das quais aproximadamente 10% estão associadas a infecções. Em indivíduos saudáveis, a *Candida* coloniza principalmente as superfícies mucosas do trato gastrointestinal e urogenital, sem apresentar sintomas da doença<sup>2</sup>.

As leveduras do gênero *Candida* são parte integrante da microbiota normal de humanos saudáveis. No entanto, por serem microrganismos oportunistas, fatores como a diminuição da imunidade podem facilitar sua invasão e disseminação no hospedeiro humano. *Candida albicans* é a espécie mais comumente isolada, no entanto, outras espécies não albicans de *Candida*, como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, foram isoladas de pacientes, e algumas dessas espécies têm chamado a atenção devido à sua frequente resistência a alguns antifúngicos<sup>3</sup>.

Microrganismos do gênero *Candida* estão presentes na microbiota da mucosa reprodutiva e gastrointestinal, vivendo harmoniosamente em cerca de 50-70% dos indivíduos saudáveis. No entanto, esse gênero é formado por microrganismos oportunistas, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos ou em tratamento com antimicrobianos de amplo espectro. Tais condições tornam esses microrganismos importantes agentes de infecção, como a Candidíase, que pode ser superficial ou invasiva<sup>4</sup>.

A candidíase é uma infecção cuja origem é intrinsecamente endógena e ocorre como consequência da perturbação do equilíbrio parasito-hospedeiro, desencadeada por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone ou pelo comprometimento das defesas naturais e imunológicas. Alguns fatores correlacionados ao hospedeiro têm sido relacionados à facilitação do

desenvolvimento de infecções fúngicas na cavidade oral, incluindo diabetes mellitus, *síndrome de Cushing*, neoplasias malignas, condições imunossupressoras, tabagismo e uso de próteses dentárias<sup>5</sup>.

A candidíase oral, como se apresenta clinicamente, pode ser tratada com antifúngicos tópicos e sistêmicos. O tratamento da candidíase oral utiliza a suspensão de nistatina como droga de escolha, enquanto outros antifúngicos, como fluconazol e itraconazol, são indicados quando o tratamento tópico é ineficaz. Em casos graves de candidíase orofaríngea, são usados voriconazol, anfotericina B ou equinocandinas – caspofungina, micafungina e anidulafungina<sup>5</sup>.

O estudo se concentrou na clara intenção de verificar, bem como testar e medir com precisão a eficácia microbicida do óleo essencial de Melaleuca *in vitro*, sozinho ou associado a um medicamento eletivo, contra o patógeno *Candida albicans*, que causa formas dolorosas e muito desconfortáveis de candidíase oral, como aftas orais.

## 2 METODOLOGIA

O estudo é uma pesquisa experimental, desenvolvida inicialmente no MicroLAB/UFCG e complementada no laboratório BM-Biolam, de caráter eminentemente avaliativo do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) 100% puro frente ao patógeno já descrito *in vitro* em ágar Sabouraud Dextrose – TEA respectivamente, submetendo as médias de agentes de culturas bacterianas com ação antibiótica comprovada, observou-se efeito remissivo como medida do halo, da probabilidade de sobrevivência do patógeno (PS) e morte in loco nas placas estritamente controladas por fatores de variação, incubadas em incubadora do tipo BOD a 36±1°C, conforme o caso.

### 2.1 MEIO SELETIVO E CULTURA ESPECÍFICA

Antes de serem coletadas e inoculadas, as amostras de microrganismos fúngicos foram picadas em placa de Petri com o meio de cultura previamente preparado em estoque com rigoroso controle monoclonal das espécies estudadas, sendo o ágar-ágár Sabouraud Dextrose o meio nutricional de escolha para *Candida albicans* preparado de acordo com a concentração do inóculo.

Antes da execução dos testes acima, foram definidos três esquemas sistemáticos para medir as concentrações aplicadas a cada microrganismo, determinando tanto a concentração molar mínima quanto a máxima, bem como aspectos da cultura, como sua aparência microscópica e macroscópica, além do odor e crescimento com formação de hifas característicos da espécie, a fim de fazer a determinação precisa das concentrações inibitórias [ $\sigma_{ca}$ ], conforme mostrado na Tabela 1 abaixo para *C. albicans* e seus subgrupos denominados CA-I, CA-II e CA-III.

Tabela 1: Esquema analítico descrevendo a metodologia adotada para análise em amostras com 50% (IC50) e 100% (IC100) contendo cetoconazol e sua distribuição em grupos.

<i>Candida albicans</i> – ATCC 64124				
		IC50%	IC100%	
<i>Cet</i>	<i>Cet</i>	24*	48	CA-I
TTO	TTO	16	32	
<i>Cet+TTO</i>	<i>Cet+TTO</i>	30	60	
TTO	TTO	64	128	CA-II
<i>Cet+TTO</i>	<i>Cet+TTO</i>	120	240	
<i>Cet</i>	<i>Cet</i>	256	512**	CA-III

\*:  $[\sigma_{ca}]$  Concentração molar mínima; \*\*:  $[\sigma_{ca}]$  Concentração molar máxima.

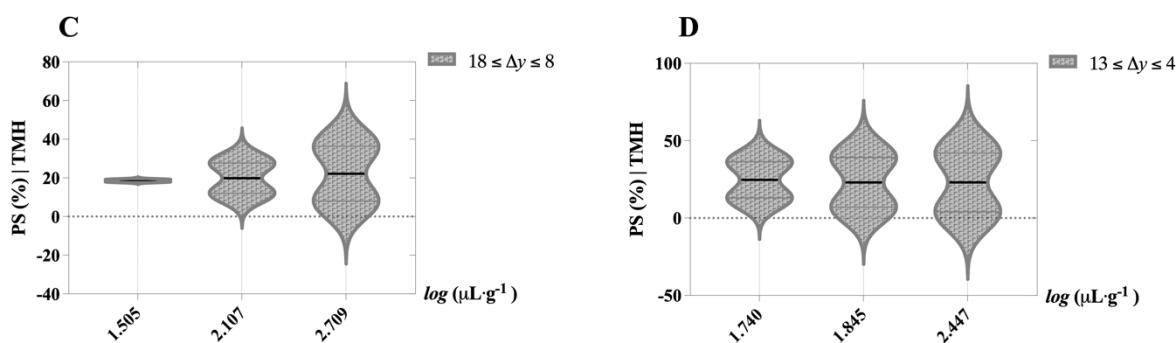
O uso do ágar Sabouraud foi justificado pelo fato de ser um meio de cultura seletivo para fungos, anulando assim a possibilidade de crescimento de outro microrganismo adicional. Portanto, quando as colônias de *C. albicans* são cultivadas em meio de ágar Sabouraud a  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}C$ , observando-se um crescimento considerável em 24 a 48 horas, e de forma macroscópica, é possível notar colônias com aparência opaca ou brilhante com textura cremosa e cor variando do branco ao cremoso, com bordas regulares ou irregulares e odor de fermento<sup>7</sup>.

O ágar Sabouraud é um meio destinado ao cultivo qualitativo de fungos (filamentos e leveduras), patogênicos e não patogênicos. A adição de cetoconazol torna este meio mais seletivo, inibindo o crescimento da maioria das bactérias e de alguns fungos saprófitos. Seu potencial de hidrogênio – pH favorece o crescimento de dermatófitos e inibe certas espécies de bactérias de interesse clínico. As peptonas existentes no meio de cultura são fontes de excelentes compostos nitrogenados para o desenvolvimento de fungos, sendo relevantes nesses casos.

A dextrose fornece uma fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos. A alta concentração de dextrose oferece uma vantagem para o desenvolvimento de fungos (estável por osmose), enquanto a maioria das bactérias não tolera a alta concentração de açúcar. O Meio Tríplice Açúcar Ágar Ferro (TSI) determina a capacidade de um microrganismo de hidrolisar glicose, sacarose e lactose incorporadas a um "meio base" com produção de ácido com ou sem gás<sup>8</sup>.

Portanto, a Figura 1C ilustra a análise das mesmas variáveis aplicadas aos grupos CA-I, CA-II e CA-III, porém, nas concentrações de  $32 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (TTO),  $128 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (TTO) e  $512 \cdot \text{L} \text{ g}^{-1}$  (*Cet*) quanto ao aspecto da concentração inibitória efetiva (IC100) e, na Figura 1D, nas concentrações de  $48 \cdot \text{L} \text{ g}^{-1}$  (*Cet*),  $60 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (*Cet+TTO*) e  $240 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (*Cet+TTO*) dos mesmos grupos, cada um deles é parametrizado pelo valor numérico de sua incógnita ( $\Delta y$ ) medido na regressão diurna, semelhante ao gráfico anterior, conforme mostrado na Figura 1 abaixo.

Figura 1: Razão de PS (%) por TMH nas cepas de *Candida albicans* (CA-I), (CA-II) e (CA-III) por  $\log$  das concentrações de inibidores em (C) e (D), nas amostras (IC100), com expressão do intervalo regressivo em dias ( $\Delta y$ ).



Fonte: Laboratório de Microbiologia, MicroLAB (UAO/CSTR/UFCG, 2021), adaptado pelo autor via GraphPad.

Ao longo dos anos, tem-se observado a utilidade de um meio seletivo e diferencial para o isolamento primário de espécies de *Candida* spp. Em 1953, por exemplo, Nickerson desenvolveu um meio após um estudo de redução de sulfito por espécies de *Candida*. Em 1958, Pagano adicionou cloreto de trifentetrazólio ao ágar Sabouraud Dextrose para diferenciar *C. albicans* de outras leveduras. A partir da adição de substratos cromogênicos ao meio de cultura, identificou-se que as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* produzem cores diferentes, facilitando a detecção direta dessas espécies de leveduras na placa de isolamento<sup>9</sup>.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Assim, a média de cada coluna contendo dados sobre OTT (óleo essencial) e *Cet* (cetoconazol), ambos aplicados separadamente, foi comparada com a média da coluna (*Cet*+OTT – associado) com manutenção dos grupos controle para os subgrupos teste em CA-I, CA-II e CA-III. Em relação à finalidade do controle de qualidade, é possível verificar se os materiais utilizados na técnica proporcionam e apresentam desempenho compatível com o esperado. Assim, os resultados que apresentam qualquer desvio devem ser analisados criteriosamente e, enquanto a verificação é realizada, indica-se que o meio não deve ser utilizado até a validação final do produto<sup>8</sup>.

Tais análises estatísticas foram necessárias porque, em determinado contexto, o microrganismo era um fungo, no qual a droga de escolha clínica (ECP) adotada era o cetoconazol, e em outro, uma bactéria, para a qual a droga de escolha clínica apropriada era a penicilina. Diferentes microrganismos requerem diferentes tratamentos do ponto de vista clínico dos tratamentos terapêuticos. Com base nesse pressuposto, o estudo de microrganismos (fungos e bactérias) depende da obtenção de um grande número de microrganismos idênticos (cultura pura), que são obtidos em laboratório por meio do isolamento de uma população mista.

A este respeito, os meios de cultura estéreis devem ser preparados e conservados em condições estéreis. Quando introduzido no ambiente estéril como inóculo, é necessário adotar cuidados técnicos para que não haja contaminação externa (ambiental)<sup>7</sup>. Os testes também foram corrigidos por meio da realização de comparações múltiplas por meio de testes estatísticos hipotéticos de acordo com o método de Dunnet, com 95% do intervalo de confidencialidade ( $p < 0,05$ ).

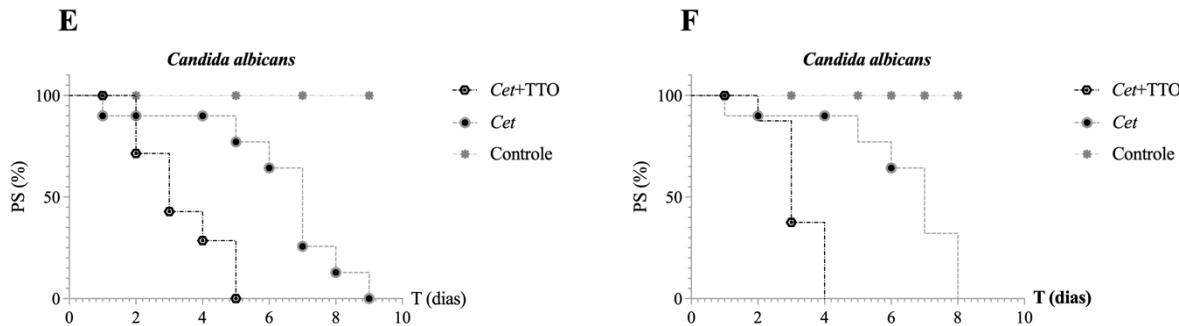
Os dados estatísticos relacionados ao teste do grupo CA-I mostraram-se estatisticamente significativos, com  $p < 0,0001$  para um conjunto  $n$  de 18 amostras e frequência ( $f$ ) igual a 5,667 sem suposição de esfericidade. A suposição de esfericidade não foi demonstrada nesse grupo, o que é relevante, uma vez que as amostras das populações analisadas não mantiveram desvios-padrão idênticos entre si, conforme descrição já apresentada.

Foram obtidos dados estatísticos relacionados ao teste do grupo CA-II, assim como no subgrupo CA-I, e também foram estatisticamente significativos com  $p < 0,0001$  para um conjunto  $n$  de 18 amostras e frequência ( $f$ ) igual a 6,999 sem suposição de esfericidade. Essa reprodução de dados semelhantes corrobora a rigidez técnica dos testes realizados e os padrões de qualidade seguidos pelos protocolos internacionais, e essa reprodução estatística de aspectos da fisiologia do fungo converge para outro subgrupo CA-III, uma vez que as amostras das populações analisadas não mantiveram desvios-padrão semelhantes entre si.

A partir dos métodos investigativos anteriores, e após exposição a níveis mais elevados de concentração, correspondendo a 50% mais F em relação ao E (CA-III), fica evidente a redução significativa do efeito regressivo em dias (ERD) nas unidades coloniais, na ordem de 3 dias (*Cet+TTO*) e 5 dias (*Cet*), corroborando a expectativa de que o aumento da dose sinérgica resultaria mais rapidamente em morte celular, demonstrando uma tendência recorrente nas avaliações subsequentes.

Quando ocorreram interações farmacológicas resultantes do sinergismo positivo entre o fitoterápico e o fármaco clínico, foi demonstrada interatividade estável entre ambos, boa solubilidade lipídica do óleo TTO em cetoconazol com complemento de água destilada e homogeneização prévia e posterior uso antes dos *albicans* reduzindo o número de dias de exposição em cerca de 31%. Isso se reflete no tempo de tratamento dos pacientes, sendo desejável minimizar os gastos com saúde e reduzir os episódios desconfortáveis causados pelas "aftas" nos pacientes, cuja remissão está ilustrada na Figura 2 abaixo.

Figura 2: Análise do efeito de referência cruzada pela ação de *Cet+TTO* e TTO contra o táxon *Candida albicans* com expressão do percentual de sobrevivência (SP) em amostras avaliadas *in vitro* sob os efeitos de CI50 e CI100.

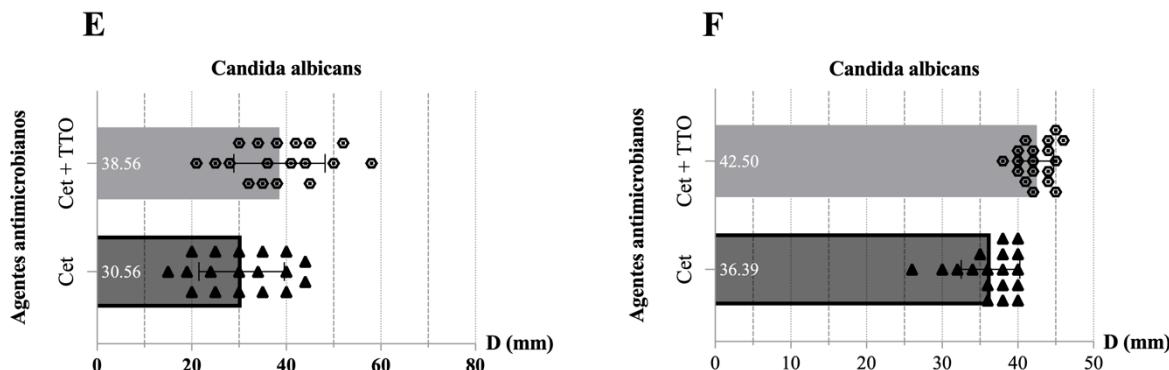


Fonte: Laboratório de Microbiologia, MicroLAB (UAO/CSTR/UFCG, 2021), adaptado pelo autor via GraphPad.

Os dados estatísticos relacionados ao ensaio do grupo CA-III mostraram-se estatisticamente significativos com  $p < 0,0001$  para um conjunto  $n$  de 18 amostras e frequência ( $f$ ) igual a 1,617 sem suposição de esfericidade. A suposição de esfericidade, como em CA-I e CA-II, não foi demonstrada neste grupo, uma vez que as amostras das populações analisadas também não mantiveram desvios-padrão idênticos, o que é desejável, pois, se as concentrações tiradas nas culturas foram diferentes, resultados diferentes são esperados em relação às variáveis tempo (T), velocidade de crescimento (CV) e probabilidade de sobrevivência (PS%).

Semelhante aos testes da hipótese anterior, outro grupo de cepas (E e F) do subgrupo CA-III foi preparado e as leituras foram feitas em placas de Petri, expostas ao cetoconazol (*Cet*) associado ao TTO e, em outro conjunto de amostras, apenas ao cetoconazol, nas concentrações de  $120 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $256 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  respectivamente, equivalente ao IC 50%, de acordo com a cultura CA-III (Figura 3E) e em outro grupo, nas concentrações de  $240 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $512 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalente ao IC 100% evidente na cultura CA-II (Figura 3F). Isso foi providencial para o efeito comparativo entre o cetoconazol aplicado isoladamente e, em outras amostras, associado à OTT, para medir seu potencial antifúngico, ilustrado na Figura 3.

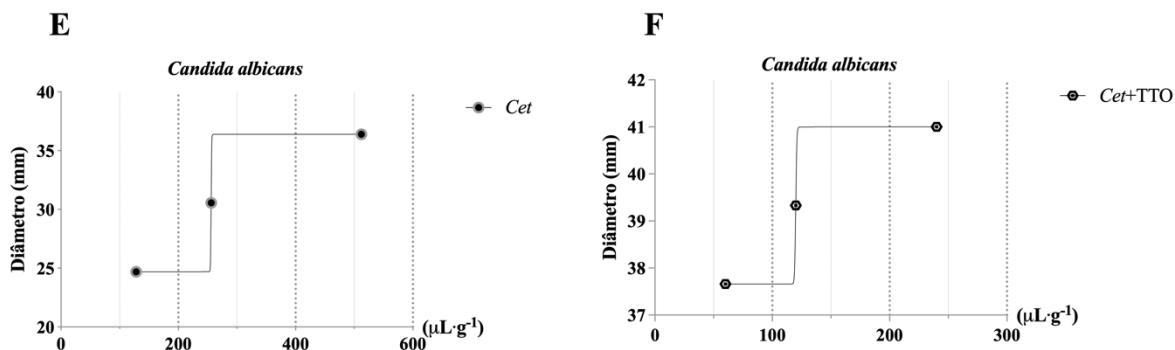
Figura 3: Médias para o tamanho médio do halo (TMH) versus o táxon *Candida albicans* em amostras randomizadas para 36 (E) e 36 (F) unidades, respectivamente, em relação à leitura com 50% (IC50) e 100% (IC100) do agente inibitório.



Fonte: Laboratório de Microbiologia, MicroLAB (UAO/CSTR/UFCG, 2021), adaptado pelo autor via GraphPad.

Nas ações de continuidade, à semelhança das análises criteriosas anteriores, designou-se a exposição apenas ao Cet, que continha *como exemplo* *Candida albicans*, no chamado grupo CA-III, e neles foi adicionada metade da concentração máxima do fitofármaco, ou seja,  $256 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  com diâmetro de halo próximo a 24,7 mm e, na concentração máxima, o valor aproximado de 36,39 mm, ou seja,  $512 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (Figura 4E). Por outro lado, em relação ao fármaco *Cet+TTO*, foram obtidos resultados mais intensos, em comparação com os anteriores, ressaltando que a supressão das colônias proporcionou halos com diâmetro médio próximo a 39,5 mm na metade da concentração máxima de  $120 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e diâmetro médio do halo maior que 41 mm, na concentração de  $240 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (Figura 4F). Os diâmetros verificados macroscopicamente são exemplificados na Figura 4 abaixo.

Figura 4: Análise do efeito inibitório pela ação de Cet e *Cet+TTO*, respectivamente, contra o táxon *Candida albicans* com expressão de IC 50% e IC 100% em (E) e (F), em cada caso, em amostras avaliadas *in vitro*.



Fonte: Laboratório de Microbiologia, MicroLAB (UAO/CSTR/UFCG, 2021), adaptado pelo autor via GraphPad.

### 3.2 CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS

Portanto, na dose a 50% da concentração molar a mais em B em relação a A, já é notório que há uma redução significativa do efeito regressivo em dias (ERD) nas unidades coloniais avaliadas, na ordem de 4 dias (Cet) e 3 dias (TTO), corroborando a expectativa de que o aumento da dose resultaria mais rapidamente na morte dos organismos. Isso confirma a ação deletéfica do fitoterápico semelhante ao medicamento-clínico utilizado como parâmetro contra o patógeno, mas percebe-se uma estabilização da ação inibitória em percentuais excessivamente altos (subgrupo CA-I).

Reproduzindo no subgrupo CA-II em níveis de concentração mais elevados, correspondendo a 50% a mais em D em relação a C (Figura 2), observa-se uma redução significativa do efeito regressivo em dias (ERD) nas unidades coloniais, na ordem de 3 dias (*Cet+TTO*) e 4 dias (TTO), corroborando a expectativa de que o aumento da dose resultaria mais rapidamente na morte dos organismos. Isso

ratifica sua ação fungicida com intensidade no subgrupo CA-II, uma vez que este grupo apresenta concentrações molares  $[\sigma_{ca}] \geq 16 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e halo com diâmetro  $\geq$  de 15 mm.

Os exemplos anteriores devem expor o subgrupo CA-III a níveis de concentração mais elevados, correspondendo a 50% a mais em F em relação a E (CA-III), demonstrando a evidente redução significativa do efeito regressivo em dias (ERD) nas unidades coloniais, na ordem de 1 dia (Cet+TTO) e 1 dia (Cet), corroborando as expectativas anteriores, sem qualquer desvio dos parâmetros, na lógica do raciocínio matemático, demonstrando uma tendência recorrente nas avaliações subsequentes ainda mais evidente no subgrupo CA-III.

Quando ocorreram interações farmacológicas resultantes do sinergismo positivo entre o fitoterápico e o farmacoclínico, foi demonstrada interatividade físico-química estável, solubilidade relativa pelo coeficiente de solubilidade de partição entre o fitofármaco e o cetoconazol, para o espécime albicans (CA), reduzindo o número de dias em cerca de 28%. Vê-se que isso é desejável, pois quanto mais rápido o agente etiológico da candidíase oral for eliminado, menos desconforto estará, determinado pela dor local ou durante a mastigação.

### 3.3 ANÁLISE DO ANTIBIOGRAMA

Após o tempo necessário para o crescimento da cultura fúngica, foram realizadas leituras nas placas de Petri (E e F) do subgrupo CA-I (Figura 2) para mensuração do diâmetro médio dos halos inibitórios, uma vez que foram expostos ao cetoconazol (Cet) e ao TTO, nas concentrações de  $24 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $16 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalentes ao IC 50%, submetidas às culturas CA-I e cetoconazol (Cet) e OTT, nas concentrações de  $48 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $32 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalentes ao IC 100% evidente na cultura CA-II. O efeito potencial desejado na relação dose-resposta nos resultados foi comprovado, como evidenciado pelo aumento do diâmetro médio dos halos.

Após as evidências anteriores, também foram realizadas leituras em outro grupo de placas de Petri (E e F) do subgrupo CA-II (Figura 3) para mensuração do diâmetro médio dos halos inibitórios, desta vez expostos ao cetoconazol (Cet) associado à OTT e, em outros, apenas à OTT, nas concentrações de  $30 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $64 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalente a 50% de IC, de acordo com a cultura CA-I e em outro grupo, nas concentrações de  $60 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $128 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalente ao IC de 100% evidente na cultura CA-II. Essa metodologia foi fundamental para estabelecer uma comparação entre a eficácia microbicida do OTT aplicado isoladamente e, em outras amostras, associado ao cetoconazol, ambos na condição de antagonistas do crescimento micelial fúngico.

Semelhante aos testes da hipótese anterior, a concentração tanto do cetoconazol quanto da farmacologicamente associada ao OTT foi aumentada para avaliar se haveria otimização no aumento dos halos. Assim, outro grupo de cepas (E e F) do subgrupo CA-III (Figura 4) foi preparado e as leituras foram feitas em placas de Petri, expostas ao cetoconazol (Cet) associado ao OTT e, em outro conjunto de amostras, apenas ao cetoconazol. Nas concentrações de  $120 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $256 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalentes a 50% de IC, de acordo com a cultura CA-III e em outro grupo, nas concentrações de  $240 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $512 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, equivalentes ao IC de 100% evidente na cultura CA-II. Isso foi providencial para um efeito comparativo entre o cetoconazol aplicado isoladamente e, em outras amostras, associado ao OTT, para medir seu potencial antifúngico.

A concentração  $f(x)$  em função do diâmetro do halo  $f(y)$ , com exposição apenas ao OTT sob o táxon *Candida albicans*, no chamado grupo CA-I, no qual foi adicionada metade da concentração máxima do fitofármaco, ou seja,  $16 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  com diâmetro mínimo do halo de 12,49 mm e, na concentração máxima, o valor aproximado de 19,17 mm, ou seja,  $32 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ . Por outro lado, em relação ao fármaco Cet, resultados mais intensos foram obtidos, ressaltando-se que a supressão das colônias proporcionou halos com diâmetro médio próximo a 24 mm na metade da concentração máxima de  $24 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  e diâmetro de halo maior em torno de 36,39 mm, na concentração de  $48 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  (Figura 4).

#### 4 DISCUSSÃO

Nas análises clínicas diárias, é comum que os agentes prescritores comumente encontrem obstáculos para estabelecer uma relação razoável entre a dose do medicamento e a intensidade da resposta terapêutica desejada. Sem contar que efeitos colaterais ou reações adversas que possam agravar o quadro clínico do paciente precisam ser evitados, mas que, nesse contexto, quaisquer efeitos indesejáveis nesse sentido foram descartados com sucesso devido aos protocolos adotados.

À medida que os microrganismos resistentes a medicamentos surgem, tratamentos alternativos têm sido escolhidos, dentre eles, o uso de óleos essenciais e extratos vegetais acabam surgindo como fontes de medicamentos naturais. Os extratos vegetais têm se mostrado antimicrobianos e antifúngicos eficientes, inclusive contra a formação de *biofilme de Candida albicans*. Em relação aos enxaguatórios bucais, observou-se que estes são ferramentas importantes no controle da microbiota, complementando os resultados obtidos por meio de medidas de higiene mecânica e permitindo a coleta, em suas formulações, de diversos agentes antimicrobianos eficazes para minimizar ou eliminar o biofilme dentário. Os extratos vegetais, por exemplo, têm seus potenciais efeitos curativos, especialmente antimicrobianos e antifúngicos<sup>10</sup>.

Com base no estudo desenvolvido por<sup>11</sup>, o tratamento da candidíase oral pode ser baseado em antifúngicos sistêmicos como fluconazol, itraconazol, cetoconazol, posoconazol, anfotericina B. No caso do tratamento tópico, a alternativa de tratamento mais viável é a nistatina, solução oral (100.000 UI), miconazol, clorimazol, cada um com sua dosagem específica dependendo do grau de infecção. Cada um desses tratamentos pode ter vários efeitos adversos específicos, como: náuseas, vômitos, danos ao fígado, após longos períodos de uso. A presença de outras espécies de *Candida* na candidose oral, como *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. Krusei*, pode estar parcialmente associada à resistência ao tratamento com antifúngicos convencionais em alguns pacientes. Além disso, observam-se altas taxas de recorrência da infecção, resultando em resistência ao antifúngico ou não adesão do paciente ao tratamento.

Ambas as formas são indesejáveis aos pacientes e, quando emergem, trazem consigo consequências maiores do que o benefício farmacológico e, nessa expectativa, buscou-se quantificar valores no limiar de ação com a observância de ações potencialmente prejudiciais ao indivíduo. Todos os gráficos abaixo foram construídos utilizando a fórmula  $\hat{Y} = \alpha_{Bottom} + (\beta_{Top} - \alpha_{Bottom})/(1+10^{(x \cdot Log IC50)})$ , adaptada ao método competitivo de Binding, calculado pelo One Site – Fit log IC50 do tipo regressivo não linearizado auxiliado pelo software GraphPad Prism.

Essa etapa foi conduzida pela pesquisadora para conjecturar, por meio de evidências científicas robustas, a forma como deve ser proposto o preparo de uma amostra de enxaguatório bucal (bochecho oral), em uma escala que não resulte em lesão escamosa da mucosa oral, não prejudique o esmalte e não atinja a dentina dos dentes. Portanto, isso exigiu durante a análise do farmacologista medidas de precaução em todas as manipulações da farmacopeia utilizadas e dosagem adequada do óleo essencial, sendo esses parâmetros determinantes para evitar toxicidade celular indesejada.

Os componentes comumente presentes nos enxaguatórios bucais são agentes líquidos, fluidos ou viscosos com aglutinantes, surfactantes e umectantes e, portanto, têm potencial ação descamativa da mucosa epidérmica do trato oral. A principal função do uso do enxaguatório bucal é ajudar a remover detritos e fungos aderidos à epiderme do tecido gengival oral ou presentes nas cavidades laterais dentro da boca. No entanto, ainda é possível observar funções secundárias importantes nos enxaguatórios bucais, como promover o refrescamento do hálito e o clareamento dental<sup>12</sup>.

Os enxaguatórios bucais, por outro lado, consistem em uma mistura dos constituintes em água ou álcool, são estáveis e têm um sabor aceitável, requerem a adição de aromatizantes, corantes, conservantes e surfactantes (detergentes aniônicos não podem ser formulados com anti-séptico catiônico, como cloreto de cetilperidina ou clorexidina). Os enxaguatórios bucais com álcool são utilizados para estabilizar alguns componentes para conferir maior longevidade aos produtos, e os

enxaguatórios bucais com alta concentração de álcool são comercializados pelas empresas fabricantes, chegando a uma concentração de 26% em alguns casos<sup>13</sup>.

Os enxaguatórios bucais orais como antissépticos são necessários como compostos químicos, podendo ser naturais ou modificados, originados com o objetivo de inibir microrganismos causadores de afecções orais e sistêmicas. Esses antissépticos devem ser de ação rápida, pois sua importância está presente em seu fácil acesso direcionado e são de difícil limpeza, ou seja, áreas que não são cobertas pelas cerdas de escovação, devem ser prescritas por um profissional de odontologia<sup>14</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

Por meio de análises rigorosas, verificou-se a eficácia *in vitro* do óleo essencial de Melaleuca contra o espécime *Candida albicans*, atestando a eficácia terapêutica bioativa do óleo essencial sobre o patógeno expressivamente demonstrado, atuou como um potente agente inibidor antifúngico inibindo seu crescimento biológico, quando submetido a exposições crescentes do óleo, seja em estado isolado ou quando associado ao cetoconazol, inibindo efetivamente o crescimento micelial. A cada incremento aditivo do óleo essencial, a resposta inibitória tornou-se maior, evidenciada pelo aumento do halo inibitório, bem como pela regressão significativa na velocidade de crescimento (CV) dos microrganismos *in vitro* e pelo número de dias (T), respectivamente.

Assim, conclui-se que a inclusão do óleo essencial em cremes dentais possibilita o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas promissoras, como aconteceu com os enxaguatórios bucais derivados do mesmo óleo essencial, uma vez que possui propriedades fungicidas de interesse clínico e pela indústria que fatura milhões de reais anualmente com esses produtos. A única ressalva é que essa formulação farmacêutica é indicada para jovens com mais de 12 anos e para adultos e idosos que gozam de saúde plena e cuja formulação é usada por até 60 dias (validade) e é agitada antes do uso, boceja na boca e borrifada ao ar livre.

Portanto, este trabalho não inviabiliza a relevância dos enxaguatórios bucais bucais no mercado, mas fornece uma rota fitoterápica complementar alternativa nos tratamentos clínicos odontológicos, facilitada pelo acesso ao óleo, pela aplicação do fitofármaco pelo próprio paciente (usuário) e baixo custo financeiro para a execução do projeto. Assim, pode-se sugerir o uso do TTO na elaboração de enxaguatórios bucais com valores máximos de  $[\sigma_{ca}] \leq 128 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , obtendo-se diâmetros superiores a  $D \geq 16 \text{ mm}$ , atestando a viabilidade da inclusão do óleo essencial como agente fitoterápico eficaz até a remissão total do patógeno com menos de  $T \leq 8$  dias de tratamento.

## REFERÊNCIAS

- BULACIO, L.; RAMADÁN, S.; DALMASO, H.; LUQUE, A.; SORTINO, M. Optimización de variables en ensayos de actividad antifúngica fotodinámica frente a especies de *Candida*. Revista Argentina de Microbiología, Buenos Aires, v. 53, n. 4, p. 287-291, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754121000134>>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- SOARES, D. M.; LIMA, E. O.; SOARES, D. M. M.; SILVA, N. F.; COSTA, N. G. M.; FARIA, F. S. E. D. V.; RODRIGUEZ, A. F. R. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. Revista Brasileira de Cirurgia e Pesquisa Clínica - BJSCR, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 28-34, 2019. Disponível em: <[https://www.mastereditora.com.br/periodico/20181204\\_202650.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20181204_202650.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- PAZ, C. B. Resistência de espécies de *Candida* não-albicans aos antifúngicos azólicos: uma revisão narrativa. 2021. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <[https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/228328/resistencia\\_especie\\_Cleo\\_Bona\\_Paz\\_UFSC\\_final%20%283%29%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/228328/resistencia_especie_Cleo_Bona_Paz_UFSC_final%20%283%29%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- ROCHA, W. R. V. Gênero *Candida*: Fatores de virulência, epidemiologia, candidíase e mecanismos de resistência. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, [S.l.], v. 10, n. 4, 2021. Disponível em: <<https://rsdjurnal.org/index.php/rsd/article/view/14283/12866>>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- FERRÃO, S. K. Prospecção antifúngica de óleos essenciais de plantas medicinais frente a isolados clínicos de *Candida* spp. diagnosticados em pacientes do Hospital de Odontologia da UFRGS. 2020. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/219157>>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- MATUSCHEK, E.; BROWN, D. F.; KAHLMETER, G. Desenvolvimento do método de teste de suscetibilidade antimicrobiana por difusão em disco EUCAST e sua implementação em laboratórios de microbiologia de rotina. Microbiologia Clínica e Infecção, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 255-266, 2014.
- SANTOS, Y. R.; SANTOS, R. S.; ROCHA, J. L. C.; SANTANA, A. C. O. S. Avaliação da atividade antifúngica do extrato de *Cnidoscolus aconitifolius* (MILL.) I.M. Johnst. frente a *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout. Revista SaúdeUNIFAN, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 83-88, 2022. Disponível em: <<https://saudeunifan.com.br/wp-content/uploads/2022/08/Artigo-9-AVALIACAO-DA-ATIVIDADE-ANTIFUNGICA-DO-EXTRATO-DE-CNIDOSCOLUS-ACONITIFOLIUS-MILL.-I.M.-JOHNST.-FRENTE-A-CANDIDA-ALBICANS-C.P.-ROBIN-BERKHOUT.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- DINIZ, C. G. Roteiro de aulas práticas. [S.l.]: [s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/ROTEIRO-PARA-AULAS-PRATICAS-bacteriologia-2018-versao-02-2018.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.

LABORCLIN PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. Agar Candida Cromogênico. Pinhais: Laborclin, 2022. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/172115.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.

CHAGAS, C. F. Uso de um enxaguatório bucal com extratos fitoterápicos de *Mentha piperita*, *Pimpinella anisum* e *Citrus limon* no tratamento de candidíase oral: uma avaliação in vivo. 2021. Monografia (Graduação) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.unisc.br/jspui/bitstream/11624/2650/1/Caroline%20Furrati%20Chagas.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.

MEDEIROS, M. R. S. Uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de candidose oral: ensaio clínico, controlado e randomizado. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020. Disponível em: <[https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/29288/1/Usoterapiafotodinamica\\_Medeiros\\_2020.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/29288/1/Usoterapiafotodinamica_Medeiros_2020.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2025.

MASO, D. C.; MASO, P. C.; BORGES, R. S.; GIACOMINI, L. A.; CORRALO, D. J. Ação inibitória de dentifrícios sobre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*: estudo in vitro. RFO UPF, Passo Fundo, v. 25, n. 2, p. 232-240, 2020. Disponível em: <<http://seer.upf.br/index.php/rfo/article/view/10634/114115949>>. Acesso em: 2 jun. 2025.

MAURÍCIO, M. Colutório bucal: há conhecimento sobre seu uso? 2018. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/39289/1/Colutório%20bucal,%20há%20conhecimento%20sobre%20seu%20uso.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.

DANIEL, N. M. J. Nivel de conocimientos de estudiantes de odontología, sobre la utilidad de colutorios orales previo a la atención odontológica en la UAO UNIANDES. 2022. Monografia (Graduação) – Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ambato, 2022. Disponível em: <<https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/14948/1/UA-ODO-PDI-001-2022.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2025.