

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Solubilización *in vitro* del aceite de árbol de té y primeros resultados de su efecto antifúngico en onicomicosis



Felix Marcos-Tejedor^{a,c}, Pablo González-García^{b,c} y Raquel Mayordomo^{b,c,*}

^a Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Castilla la Mancha, Talavera de la Reina, Toledo, España

^b Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura, Plasencia, Cáceres, España

^c Grupo de Investigación DEDAP de la Universidad de Extremadura

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de marzo de 2020

Aceptado el 19 de junio de 2020

On-line el 8 de septiembre de 2020

Palabras clave:

Onicomicosis

Trichophyton rubrum

Trichophyton mentagrophytes

Árbol de té

Melaleuca alternifolia

RESUMEN

Introducción: La onicomicosis por dermatofitos son la principal causa de alteración ungueal. Su abordaje terapéutico farmacológico tiene asociado bajas tasas de éxito, hepatotoxicidad, interferencia y baja adherencia al tratamiento. Por ello, nuestro objetivo fue valorar la efectividad *in vitro* del aceite esencial de árbol de té, para aportar alternativas menos nocivas en el abordaje terapéutico frente a los principales agentes causantes de estas infecciones.

Material y métodos: Se aisló de fragmentos de uña con infección fúngica el *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Posteriormente, se inocularon a una concentración de 3×10^5 UFC/mL en agar patata con dextroza y aceite esencial de árbol de té a diferentes concentraciones para evaluar su efecto mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) y el crecimiento radial (CR).

Resultados: Se obtuvo compromiso en el crecimiento de *Trichophyton rubrum* a concentraciones a partir de 0,04% del aceite esencial de árbol de té ($p = 0,004$). En el caso del *Trichophyton mentagrophytes* se obtuvo inhibición a partir de 0,02% ($p = 0,017$), e incluso la inhibición completa a una concentración final del aceite a 0,07%.

Conclusiones: El aceite esencial de árbol de té inhibe el crecimiento *in vitro* de los hongos estudiados, pudiéndose considerar una alternativa menos nociva para el abordaje terapéutico de las onicomicosis.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Solubilization *in vitro* of tea tree oil and first results of antifungal effect in onychomycosis

ABSTRACT

Keywords:

Onychomycosis

Trichophyton rubrum

Trichophyton mentagrophytes

Tea tree

Melaleuca alternifolia

Introduction: Onychomycosis is the main cause of nail alteration. Hepatotoxicity, interference and low adherence to pharmacological treatment are associated. Therefore, our objective was to assess the *in vitro* effectiveness of tea tree essential oil (less harmful) against main causative agents of these infections.

Material and methods: *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* were isolated and inoculated at a concentration of 3×10^5 CFU / mL in potato agar dextrose and tea tree essential oil at different concentrations to assess its effect by counting colony forming units and radial growth.

Results: *Trichophyton rubrum* growth inhibition was obtained at concentrations higher than 0.04% of the essential tea tree oil ($p = 0.004$). In the case of *Trichophyton mentagrophytes*, inhibition was obtained at 0.02% ($p = 0.017$), and even complete inhibition at a final concentration of the oil at 0.07%.

Conclusions: Tea tree essential oil inhibits the *in vitro* growth of the fungus and may be a less harmful alternative to the onychomycosis treatment.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rmayordo@unex.es (R. Mayordomo).

Introducción

Los dermatofitos son los principales agentes causantes de las onicomicosis de mayor severidad, principalmente el *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Se estima una incidencia para la onicomicosis entre el 2 y el 8% de la población mundial, afectando principalmente a la uña del dedo gordo del pie. La oscilación en la incidencia depende de la población a estudio, los estilos de vida y los altos niveles de estados de inmunodepresión actuales (HIV, trasplantados, diabetes, corticoides)^{1,2}.

La onicomicosis es la causa que produce aproximadamente el 50% de las alteraciones ungueales, y se le asocia un elevado componente psicológico negativo debido a que las uñas son consideradas un símbolo estético. Este aspecto hace que las personas que las sufren expresen ansiedad, autorechazo y aislamiento social, y como consecuencia, demanden tratamientos rápidos y eficaces^{3,4}.

Los tratamientos de elección para infecciones superficiales por hongos son los fármacos sistémicos y tópicos, que suponen un coste mundial en torno a 5 millones de dólares^{5,6}. Son terapias de larga duración (6-12 meses) y describen multitud de interacciones farmacológicas que pueden provocar hepatotoxicidad. Además, estos tratamientos experimentan una tasa cuestionable de curación y altas tasas de abandono, debido a la farmacocinética y a la adherencia de los sujetos; dando como resultado tratamientos frustrados^{6,7}.

Para minimizar estos inconvenientes se están estudiando los efectos de multitud de extractos naturales con el fin de disminuir los efectos tóxicos de los fármacos^{8–10}. Entre ellos, cabe destacar el aceite esencial de árbol de té con efecto antibacteriano contra un amplio número de bacterias, antifúngico en las infecciones por *Candida*, y antivírico contra el virus del herpes simple¹¹.

A pesar del potencial uso de multitud de aceites esenciales para el tratamiento de infecciones dermatológicas¹¹, el aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) requiere de estudios que evalúen su eficacia y efectividad frente a la onicomicosis. Por ello, y con el fin de aportar alternativas menos nocivas, este trabajo estudia *in vitro* el efecto del aceite esencial de árbol de té frente al *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, principales agentes causantes de las infecciones ungueales^{1,2}.

Material y métodos

Aislamiento de las especies

Los hongos fueron aislados a partir de una uña infectada por *Trichophyton rubrum* y otra por *Trichophyton mentagrophytes*, para ello, las uñas se cultivaron en agar Sabouraud con cloranfenicol y posteriormente en agar patata con dextrosa (APD). Se extrajo el ADN del hongo y se amplificó mediante PCR¹². Por último, se llevó a cabo la confirmación genética mediante secuenciación.

Solubilización del aceite e incorporación al medio

Se utilizó el aceite esencial del árbol de té de Naissance. Para poder incorporarlo al medio APD se realizó la solubilización de este con dimetil sulfóxido (DMSO) de PanReac AppliChem al 10% inicialmente. Para conseguir una emulsión estable y favorecer la incorporación del aceite en el medio, se le añadió DMSO hasta llegar a una concentración final de 0,112% en placa. Con ese mismo fin se hicieron pruebas adicionando diferentes concentraciones de Tween® 20 (Polysorbate, de Sigma-Aldrich®) aunque finalmente se descartó su uso porque alteraba la morfología del *Trichophyton rubrum*.

Preparación del inóculo

La extracción de esporas y la preparación del inóculo se elaboró según describe EUCAST¹³.

Estudio de la sensibilidad

Inicialmente se descartó un efecto inhibidor o tóxico del DMSO en el crecimiento del hongo, a la concentración con la que conseguimos una emulsión estable del aceite en el medio. Para ello, se sembró 10 µL del inóculo preparado de cada cepa de forma masiva a una concentración de 3×10^5 UFC/mL para el estudio de UFC. Por otro lado, se inoculó 5 µL del mismo inóculo para evaluar el crecimiento radial (CR) en APD y en APD con DMSO. Se incubaron a 30 °C durante seis días para hacer el recuento de UFC y medir el CR.

Una vez que conocimos los márgenes de concentración de DMSO que no afectaba al crecimiento del hongo, se inoculó el hongo en medio APD con emulsión estable de aceite de árbol de té a diferentes concentraciones. Estos experimentos se llevaron a cabo por duplicado y se repitieron cuatro veces.

Estudio estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa SPSS software v21.0, mediante la prueba *t* Student para muestras independientes y estableciendo el nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

Resultados

Se consiguió solubilizar el aceite con DMSO y Tween para su incorporación al medio sólido, siguiendo las metodologías de los trabajos consultados^{11,14,15}. Los resultados demostraron que con presencia de Tween 20, el *Trichophyton rubrum* aislado experimentaba cambios morfológicos posiblemente debido a la toxicidad de este (fig. 1). Finalmente, se consiguió una emulsión estable del aceite de árbol té en el medio a una concentración final de DMSO al 0,112%. No se obtuvo diferencia estadística al comparar los resultados obtenidos en el medio con y sin el disolvente (tabla 1), asumiendo así que el DMSO a esa concentración no afecta al crecimiento de los hongos estudiados.

Posteriormente, se hizo el recuento de UFC y medición del CR en los medios con las diferentes concentraciones de aceite esencial de árbol de té. Al comparar los resultados obtenidos en medios control y medios con aceite, se encontró diferencia estadística en el recuento de UFC en las concentraciones igual y superiores a 0,05% de aceite ($p = 0,001$), y de CR en concentraciones igual y superiores a 0,04% ($p = 0,004$) en el caso del *Trichophyton rubrum* (tabla 1A). Mientras que el crecimiento del *Trichophyton mentagrophytes*, según el recuento de UFC está comprometido en concentraciones superiores de 0,02% ($p = 0,017$) e inhibido a concentraciones superiores al 0,07% de aceite (tabla 1B). Con respecto al CR del *Trichophyton mentagrophytes* se manifiesta evidencia en su crecimiento a partir de concentraciones iguales o superiores a 0,03% ($p = 0,023$).

Discusión

Las condiciones oclusivas a las que se expone el pie son motivos predisponentes para sufrir una onicomicosis^{1,2}. Por ello, el presente trabajo de sensibilidad fue llevado a cabo con un hongo aislado de una muestra de uña humana con el fin de conseguir unas cepas adaptadas a esas condiciones y aportar una aproximación a la realidad.

Los primeros resultados obtenidos muestran que la presencia de Tween en el medio hace que el *Trichophyton rubrum* aislado

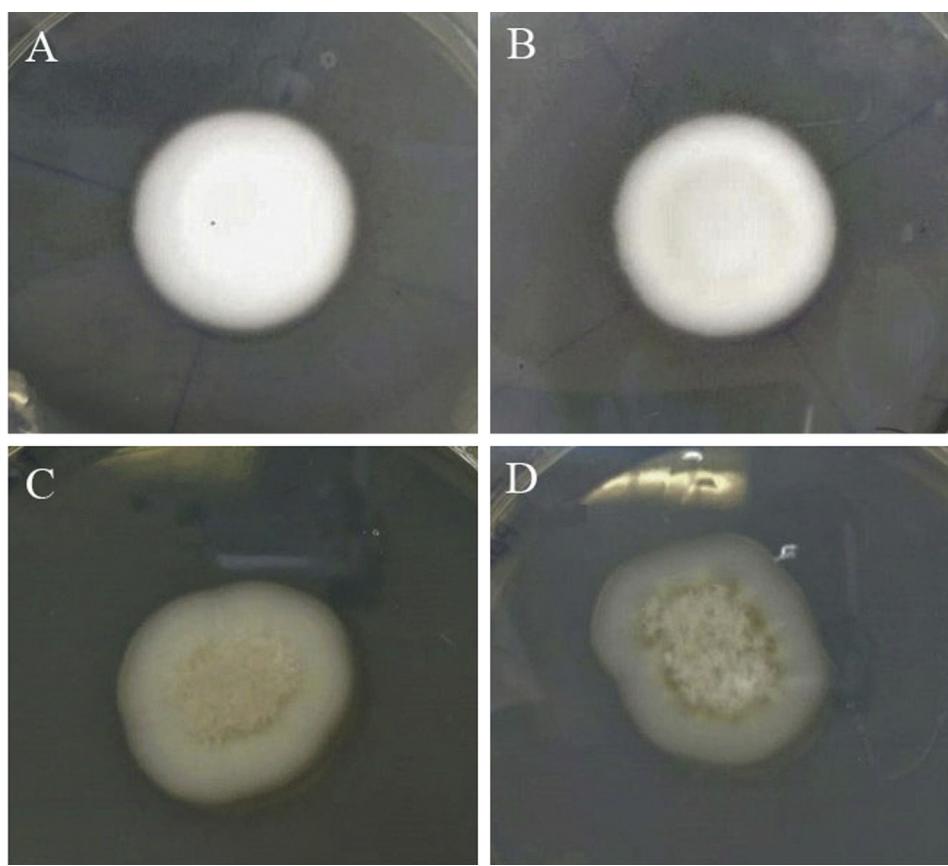


Figura 1. Morfología del crecimiento de la colonia del *Trichophyton rubrum* aislado en diferentes condiciones. A) Se observa un crecimiento normal en medio APD. B) No se aprecia alteración cuando el medio APD contiene DMSO. C) Observamos alteraciones cuando el medio APD contiene DMSO y Tween 20 al 0,1%. D) Lo mismo ocurre en el caso del medio APD sólo con Tween 20 al 0,1%.

Tabla 1

Estudio estadístico descriptivo y comparación de medias, con la prueba t Student para muestras independientes, de las UFC y del CR de las diferentes condiciones a estudio. A) Resultados obtenidos al comparar el medio base y añadiendo el disolvente, DMSO a concentración final de 0,112%. B) Resultados obtenidos en las diferentes concentraciones de aceite de árbol de té, donde es constante la concentración final de DMSO a 0,112%

| | n | UFC | DS | Valor p | CR | DS | Valor p |
|--|----|--------|---------|---------|-------|--------|---------|
| A: <i>Trichophyton rubrum</i> | | | | | | | |
| Medios Base | | | | | | | |
| APD | 30 | 207,30 | ± 36,46 | 0,685 | 22,13 | ± 1,22 | 0,176 |
| APD + DMSO | 30 | 203,33 | ± 38,83 | | 21,75 | ± 0,92 | |
| % Árbol de té | | | | | | | |
| 0 (control) | 4 | 100,50 | ± 13,05 | - | 14,70 | ± 0,86 | - |
| 0,03 | 4 | 99,12 | ± 31,60 | 0,938 | 13,25 | ± 0,37 | 0,109 |
| 0,04 | 4 | 91,50 | ± 39,73 | 0,682 | 12,50 | ± 0,49 | 0,004 |
| 0,05 | 4 | 35,75 | ± 19,02 | 0,001 | 10,28 | ± 1,03 | 0,001 |
| 0,06 | 4 | 32,50 | ± 13,42 | 0,000 | 9,71 | ± 2,93 | 0,000 |
| 0,07 | 4 | 8,50 | ± 08,13 | 0,000 | 10,25 | ± 0,35 | 0,000 |
| 0,08 | 4 | 20,00 | ± 22,44 | 0,001 | 10,15 | ± 2,10 | 0,007 |
| 0,09 | 4 | 38,25 | ± 29,95 | 0,009 | 12,31 | ± 0,72 | 0,005 |
| 0,10 | 4 | 15,25 | ± 17,61 | 0,000 | 8,15 | ± 1,15 | 0,000 |
| B: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | | | | | | | |
| Medios Base | | | | | | | |
| APD | 4 | 170,93 | ± 9,23 | 0,768 | 23,93 | ± 3,3 | 0,769 |
| APD + DMSO | 4 | 168,33 | ± 6,08 | | 19,25 | ± 6,25 | |
| % Árbol de té | | | | | | | |
| 0% (control) | 4 | 170,93 | ± 9,23 | - | 23,93 | ± 3,3 | - |
| 0,01% | 4 | 165,12 | ± 9,24 | 0,510 | 19,93 | ± 1,84 | 0,091 |
| 0,02% | 4 | 149,50 | ± 8,65 | 0,017 | 19,06 | ± 1,86 | 0,052 |
| 0,03% | 4 | 102,00 | ± 7,35 | 0,000 | 17,62 | ± 5,50 | 0,023 |
| 0,04% | 4 | 99,62 | ± 21,81 | 0,004 | 15,83 | ± 2,83 | 0,010 |
| 0,05% | 4 | 121,00 | ± 10,77 | 0,000 | 15,09 | ± 3,73 | 0,012 |
| 0,06% | 4 | 49,00 | ± 11,55 | 0,000 | 13,15 | ± 4,14 | 0,007 |
| 0,07% | 4 | 0,00 | - | 0,000 | 9,21 | ± 3,27 | 0,001 |
| 0,08% | 4 | 0,00 | - | 0,000 | 6,62 | ± 5,19 | 0,000 |

*UFC: Unidades formadoras de colonias. DS: Desviación típica. CR: Crecimiento radial en mm.

experimente cambios morfológicos que nos hacen pensar que el efecto antifúngico descrito en trabajos previos no se puede otorgar sólo al uso del aceite, sino posiblemente a su combinación con Tween^{11,14,15}. El presente trabajo, aporta datos concluyentes y objetivos con los que se puede afirmar el efecto *in vitro*, al menos fungistático, del aceite de árbol de té frente a los principales agentes causantes de las onicomicosis. Finalmente, se consiguió solubilizar el aceite de árbol de té solo con DMSO a una concentración final 0,112%. La ausencia de significación estadística, al comparar los resultados de crecimiento obtenidos tanto en ausencia como en presencia de DMSO, muestra que el DMSO no inhibe el crecimiento del *Trichophyton rubrum* ni del *Trichophyton mentagrophytes*. Este dato puede parecer estar en concordancia con lo descrito en la literatura consultada^{11,14,15}, pero estos trabajos describen una concentración final superior de DMSO, entre el 8% y el 20%, y en algunos trabajos además adicionan Tween para favorecer la incorporación del aceite al medio¹⁵. El presente trabajo aporta resultados efectivos y objetivos del efecto antifúngico en medios menos tóxicos que trabajos previos que favorecen la viabilidad celular, y sin experimentar cambios morfológicos^{11,14,15}.

Por último, se debe destacar que, a pesar de que la aplicación de aceites esenciales está popularizada en el tratamiento de infecciones fúngicas en la piel y sus anejos en todo el mundo¹¹, trabajos como el que presentamos aquí aportan la base para el diseño de tratamientos que minimicen las interferencias y los efectos tóxicos de los fármacos antifúngicos utilizados habitualmente, principalmente azoles². Se necesitan más estudios para cuantificar la concentración exacta inhibitoria del aceite de árbol de té frente al *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y otras subespecies también frecuentes, así como trabajos que estudien la permeabilidad de las uñas a estos aceites y ensayos clínicos, con el fin de conseguir tratamientos efectivos con un riesgo mínimo o nulo de toxicidad para los pacientes que sufren onicomicosis.

Conclusión

El aceite esencial de árbol de té tiene un efecto fungistático *in vitro* frente al hongo dermatofito *Trichophyton rubrum* a concentración igual y superior a 0,04%, y del 0,02% frente a *Trichophyton mentagrophytes* que incluso puede llegar a inhibirlo a una concentración de 0,07%.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Gobierno Regional de Extremadura (España) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) mediante una subvención al grupo de investigación (código CTS020, referencia GR18182), y las ayudas para el fortalecimiento de la I + D + i mediante la movilidad de investigadores posdoctorales en el ejercicio 2017 (Expediente P017018). Para la

realización de este trabajo Pablo González García disfrutó de un contrato (referencia 420/2018) de las ayudas para Personal de Apoyo a la Investigación financiadas por el SEXPE y la Junta de Extremadura.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. J Am Acad Dermatol. 2019;80:835–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.062>.
- Rich P, Elewski B, Scher RK, Pariser D. Diagnosis, clinical implications, and complications of onychomycosis. Semin Cutan Med Surg. 2013 Jun 1;32 2 Suppl 1:S5–8, <http://dx.doi.org/10.12788/j.sder.0015>.
- Gupta AK, Mays RR. The Impact of Onychomycosis on Quality of Life: A Systematic Review of the Available Literature. Ski appendage Disord. 2018 Oct;4:208–16, <http://dx.doi.org/10.1159/000485632>.
- Malakouti M, Brown GE, Leon A, Wang E, Naegeli AN, Edson-Heredia E, et al. The dermatologic intimacy scale: quantitatively measuring the impact of skin disease on intimacy. J Dermatolog Treat. 2017;28:347–52, <https://doi.org/10.1080/09546634.2016.1252032>.
- Achtermann RR, White TC. A foot in the door for dermatophyte research. PLoS Pathog. 2012;8:e1002564, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002564>.
- Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. J Am Acad Dermatol. 2019;80:853–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2018.05.1260>.
- Gupta AK, Cernea M, Foley KA. Improving Cure Rates in Onychomycosis. J Cutan Med Surg. 2016, doi: 10.1177%2F1203475416653734.
- Marcos-Tejedor F, Sánchez-Rodríguez R, Mayordomo R, Martínez-Nova A. The bacteriostatic effect of controlled-flux electrolyzed acidic solution on healthy hallux skin. J Tissue Viability. 2019;29:58–60, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31676120> <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.10.006>.
- Soares F, Fernandes C, Silva P, Pereira L, Gonçalves T. Antifungal activity of carageenan extracts from the red alga Chondracanthus teedei var. lusitanicus. J Appl Phycol. 2016;28:2991–8, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0849-9>.
- Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur-Galvis L, Mesa-Arango AC. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia. Rev Iberoam Micol. 2010;27:101–3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.005>.
- Orchard A, Van Vuuren S. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. Vol. 2017 Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Limited. 2017, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4517971>.
- Iglesias Sánchez MJ, Pérez Pico AM, Marcos Tejedor F, Iglesias Sánchez MJ, Mayordomo Acevedo R. Using a Polymerase Chain Reaction as a Complementary Test to Improve the Detection of Dermatophyte Fungus in Nails. J Am Pod Med Assoc. 2014;104:233–7, <http://dx.doi.org/10.7547/0003-0538-1043233>.
- Arendrup MC, Guinea J, Cuena-Estrella M, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, et al. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidium forming moulds. EUCAST antifungal MIC method for moulds. 2015, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def.9_3_Mould_testing_definitive.pdf.
- Saxena S, Uniyal V, Bhatt RP. Inhibitory effect of essential oils against trichosporon ovoides causing Piedra hair infection. Brazilian J Microbiol. 2012;43:1347–54, <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120004000016>.
- Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. J Appl Microbiol. 2004 Dec;97:1289–96, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02417.x>.