

# Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) sobre leveduras isoladas de pacientes hospitalizados

COSTA, A.C.B.P.<sup>1</sup>; TEODORO, G.R.<sup>1</sup>; FERREIRA, T.M.<sup>1</sup>; SILVA, F.S.<sup>1</sup>; MARIA, A.<sup>3</sup>; BELTRAME JUNIOR, M.<sup>4</sup>; KHOURI, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos/ [carol\\_biolog@yahoo.com.br](mailto:carol_biolog@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Microbiologia/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos/ [soniak@univap.br](mailto:soniak@univap.br)

<sup>3</sup> Instituto Adolfo Lutz – Regional I / Seção de Biologia Médica Taubaté - SP

<sup>4</sup> Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Síntese Orgânica – IP&D/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos/ [beltrame@univap.br](mailto:beltrame@univap.br)

**Resumo** – O aumento das infecções fúngicas nosocomiais por leveduras emergentes, resistentes aos antifúngicos convencionais, tem despertado interesse por novos fármacos com atividade antifúngica. As plantas podem ser consideradas como um dos caminhos nessa investigação. Nos últimos anos, várias plantas, com atividade antifúngica, têm sido citadas, dentre estas temos a *Melaleuca alternifolia*. Deste modo, este trabalho objetivou avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) frente a 100 amostras de leveduras do gênero *Candida* e 4 espécies de outras leveduras, todas isoladas de pacientes hospitalizados em um Hospital Universitário. Foi realizado o Método de Difusão em Agar (BAUER, *et al.*, 1966), onde as concentrações utilizadas foram de 10% a 100% do TTO. Nos ensaios realizados, observou-se 97% de sensibilidade para as amostras de *Candida spp.*, sendo que a variação do halo de inibição, nas concentrações de 30 a 100 (%), foi de 7 a 24 mm de diâmetro. Para os demais gêneros, esta variação foi de 7 a 25mm, começando a partir da concentração de 50%. Estes resultados demonstram o potencial antifúngico do TTO sobre leveduras isoladas de pacientes hospitalizados constituindo assim, uma opção futura para o desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** leveduras emergentes, *Melaleuca alternifolia*, atividade antifúngica.

**Área do Conhecimento:** Microbiologia.

## Introdução

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas nosocomiais, de origem endógena e exógena, têm aumentado drasticamente, principalmente em pacientes imunodeprimidos e transplantados, portadores do HIV, devido o uso de antibioticoterapia, corticoidoterapia, quimioterapia e outros (COLOMBO *et al.*, 1999); (AQUINO *et al.*, 2005). As leveduras mais comumente isoladas a partir de infecções nosocomiais são *Candida spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula spp.* (CANTÓN;VIJES;PEMÁN, 2001). O gênero *Candida spp.* corresponde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, sendo a espécie *C. albicans* a mais comum. Entretanto as espécies não-*albicans* já correspondem a cerca de 40% a 60% dos isolados (PFALLER *et al.*, 1998); (COLOMBO *et al.*, 1999), constituindo assim um grande desafio para os clínicos, pois sabe-se que a espécie *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e a espécie *C. glabrata* consitue um patógeno emergente em infecções nosocomiais, a taxa de mortalidade geral devido a infecções por este gênero varia de 40 a 60(%) (PFALLER *et al.*, 1998, AQUINO *et al.*, 2005, COLOMBO;GUIMARÃES, 2003).

Nos últimos anos vem aumentando o interesse por produtos naturais com ação antifúngica devido a diminuição da susceptibilidade, espectro de ação e toxicidade apresentada devido a semelhança entre a célula fúngica e a animal.

Têm sido investigadas as propriedades farmacológicas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree), sendo este usado medicinalmente na Austrália a mais de 80 anos, com uso de suas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias (MONDELLO *et al.*, 2003); (BRAND *et al.*, 2002 *apud* HAMMER;CARSON;RILEY, 2004)

O uso empírico de drogas antifúngicas tem contribuído para a diminuição da susceptibilidade (VAZQUEZ *et al.*, 1993); (BASSETTI *et al.*, 2006). Logo, se faz necessário o estudo de novos agentes antifúngicos que tenham maior espectro de ação e menos toxicidade, como os de origem natural que atendam satisfatoriamente a terapêutica das infecções fúngicas nosocomiais.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a susceptibilidade, *in vitro*, de 104 cepas de leveduras, obtidas do ambiente hospitalar, ao óleo essencial de *M. alternifolia* em diferentes concentrações..

## Material e Métodos

Foram testadas as cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida dubliniensis* (ATCC 778157). As amostras clínicas testadas foram isoladas de diversos materiais clínicos em pacientes com suspeita clínica de infecção nosocomial (internação superior à 72h). A coleta foi feita no período de fevereiro de 2002 a fevereiro de 2003 no Hospital Universitário de Taubaté (HUT), com aprovação da Comissão de Ética do HUT. Foram testadas 104 cepas de leveduras, dentre estas 100 eram do gênero *Candida*, sendo 39 cepas de *Candida albicans*, 25 cepas de *Candida tropicalis*, 21 cepas de *Candida parapsilosis*, 7 cepas de *Candida glabrata*, 4 cepas de *Candida guilliermondii*, 2 cepas de *Candida rugosa*, 1 cepa de *Candida krusei* e 1 cepa de *Candida norvegensis*. As outras espécies testadas foram 2 cepas de *Trichosporon asahii*, 1 cepa de *Hansenula polymorpha* e 1 cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi obtido comercialmente pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda., onde as concentrações utilizadas foram de 10% a 100% do TTO (diluídas em óleo vegetal de amêndoas- Amêndoas leclerc- Leclerc Industrial Ltda). O nitrato de miconazol (Vodol®) foi utilizado como controle positivo na concentração de 2% (20mg/mL).

O inóculo foi preparado obedecendo à escala de Mac Farland 0,5. Com o auxílio de uma alça de platina, culturas frescas das cepas (48h a 37°C) em placas de ágar Sabouraud-dextrose, foram transferidas para tubos contendo 3mL de solução salina estéril a 0,9%, obtendo-se assim o inóculo. Em placas de antibiograma estéreis, pipetou-se 1mL do inóculo homogeneizado e em seguida acrescentou-se 70mL de ágar Sabouraud-dextrose a 45-50°C. A mistura foi homogeneizada pela técnica de "Pour-plate". Após a solidificação do meio de cultura, fez-se os poços no agar utilizando canudos plástico estéreis de 5 mm de diâmetro, (BAUER *et al.*, 1996). Os poços foram perfurados em posições equidistantes e o poço do controle positivo foi feito no centro da placa. Pipetou-se 20µL das soluções preparadas do TTO nos poços e foi pipetado 10µL do controle positivo. O tempo de pré-difusão foi de aproximadamente 5 horas dentro do fluxo laminar. Após a difusão das soluções no meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Dado o período de incubação, a leitura dos halos formados foi feita com régua milimetrada colocada sob a placa. O diâmetro do halo foi anotado em milímetros.

## Resultados

Para a cepa padrão de *C. albicans*, os resultados obtidos para a ação antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, foi a formação de halo a partir da concentração de 40% e a variação do halo foi de 8 a 21 mm. Para as cepas *C. parapsilosis* e *C. krusei* a sensibilidade apresentada foi a partir da concentração de 60% para ambas, e a variação dos halos formados foram de 10 a 18 mm e 9 a 13 mm, respectivamente. Dentre as cepas padrão, a *C. dubliniensis* foi a mais susceptível apresentando halo a partir da concentração de 30%, o qual variou de 10 a 63 mm. O halo de sensibilidade formado para o controle positivo nas cepas ATCC de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* foi de 35 mm, 31 mm, 23 mm e 40 mm, respectivamente.

A ação antifúngica do TTO contra as cepas de leveduras obtidas de infecções nosocomiais e/ou colonização estão nas Tabelas 1 e 2.

As espécies *C. norvegensis*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula polymorpha* apresentaram susceptibilidade a partir da concentração de 60%, 80%, 60% e 70%, respectivamente, sendo que o tamanho dos halos variaram de 8 a 15mm, 8 a 12mm, 7 a 10mm e 8 a 15mm, respectivamente. Estas também foram sensíveis ao controle positivo, apresentando, respectivamente, halos de 31mm, 24mm, 25mm e 30mm.

## Discussão

O interesse por drogas não-convencionais, como os agentes antifúngicos naturais, têm aumentado com o propósito de combater doenças infecciosas mostrando que possuem espectro de ação e eficácia tão bem toleradas quanto as drogas convencionais. Assim, com a presença de leveduras emergentes em pacientes hospitalizados, desperta o interesse para o teste de produtos naturais com intuito de identificar o princípio ativo para uma futura aplicação prática.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) utilizado na Austrália por tribos aborígenes há mais de 80 anos, tem sido investigado quanto as suas propriedades farmacológicas como a sua ação antifúngica em leveduras, como o efeito na alteração da permeabilidade da membrana e fluidez em *C. albicans* e *C. glabrata*, ocorrência de acidificação do meio devido à expulsão de prótons sugerindo dano na membrana mitocondrial, comprometimento da produção de energia em *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. cerevisiae* (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004); (COX *et al.*, 2001). Estes eventos devem-se as características lipofílicas dos constituintes do TTO (monoterpenos e sesquiterpenos) que partilham

TABELA 1- Porcentagem de amostras de leveduras sensíveis as diferentes concentrações do óleo essencial.

Amostras	Controle positivo (nitrato de miconazol á 2%)	Concentrações do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (v/v)										
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
<i>C. albicans</i> (n=39)	100%	0%	0%	2,6%	15,4%	53,8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>C. tropicalis</i> (n=25)	100%	0%	0%	0%	0%	20%	76%	80%	92%	100%	100%	100%
<i>C. parapsilosis</i> (n=21)	100%	0%	0%	0%	0%	0%	9,5%	14,3%	33,3%	71,4%	85,7%	
<i>C. glabrata</i> (n=7)	100%	0%	0%	0%	0%	14,3%	71,4%	85,7%	100%	100%	100%	
<i>C. guilliermondii</i> (n=4)	100%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	50%	100%	100%	100%	
<i>C. rugosa</i> (n=2)	100%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	50%	100%	100%	
<i>Trichosporon asahii</i> (n=2)	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	

TABELA 2- Variação do diâmetro dos halos formados (em milímetros) das cepas sensíveis nas respectivas concentrações.

Amostras	Controle positivo (nitrato de iconazol á 2%)- halo em mm	Concentrações do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (v/v)- formação de halo ( mm)										
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
<i>C. albicans</i> (n=39)	20-40	0	0	7	8-9	7-11	8-11	9-13	10-15	11-16	13-20	
<i>C. tropicalis</i> (n=25)	22-30	0	0	0	0	7-9	8-12	8-15	8-18	8-22	9-24	
<i>C. parapsilosis</i> (n=21)	25-40	0	0	0	0	0	8-10	8-11	8-12	8-16	8-20	
<i>C. glabrata</i> (n=7)	27-32	0	0	0	0	0	8-10	8-11	9-11	9-14	12-17	
<i>C. guilliermondii</i> (n=4)	30-35	0	0	0	0	0	8	7-10	8-11	8-13	10-18	
<i>C. rugosa</i> (n=2)	28-29	0	0	0	0	0	8	8	9	9-10	11	
<i>Trichosporon asahii</i> (n=2)	30-32	0	0	0	0	0	8-9	8-9	9-14	13-24	14-25	

da fase aquosa da estrutura da membrana causando expansão da membrana, aumento da fluidez, desordem das estruturas e inibição de enzimas embebidas na membrana (SIKKEMA;DE BONT;POOLMAN, 1995).

Estudos realizados, com o gênero *Candida*, têm mostrado Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o TTO superior aos antifúngicos convencionais como fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B, observado também para as espécies mais resistentes como *C. krusei* e *C. glabrata*. O componente majoritário de maior efeito antifúngico documentado é o terpinen-4-ol, o qual tem demonstrando ação contra cepas clínicas de *Trichosporon spp.* e *S. cerevisiae* (HAMMER;CARSON;RILEY, 2003); (MONDELLO *et al.*, 2003); (OLIVA *et al.*, 2003). Estudo realizado com o componente  $\alpha$ -terpineno demonstrou dano causado no gene envolvido na biossíntese do ergosterol em *S. cerevisiae* (PARVEEN *et al.*, 2004). Em nosso estudo foi observado sensibilidade a partir da concentração

de 80% para as amostras testadas, exceto para 3 amostras de *C. parapsilosis* que apresentaram resistência a todas as concentrações. Mesmo as espécies mais resistentes como *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram sensibilidade considerável. Para os patógenos emergentes, *Trichosporon asahii* e *S. cerevisiae*, os halos de sensibilidade foram significativos, uma vez que apresentam relativa resistência a anfotericina B e diminuição da susceptibilidade aos azóis, respectivamente (PAPHITOU *et al.*, 2002); (ENAQUE-ANGOULVANT;HENNEQUIN, 2005). Porém os halos de sensibilidade observados para as amostras clínicas foram inferiores ao halo do controle positivo, isto pode ter ocorrido, devido aos componentes do TTO possuírem baixa solubilidade em água dado que o tamanho da zona de inibição deve-se a difusão dos componentes através do ágar aquoso (JANSSEN;SCHEFFER;BAERHEIM-SVENDSEN, 1987); (CARSON;RILEY, 1999).

## Conclusão

Os resultados obtidos comprovam a ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia*, em diferentes concentrações, sobre leveduras isoladas de pacientes hospitalizados constituindo uma opção para tratamentos futuros. Os resultados encorajam para que mais estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, sejam realizados para determinar o perfil de sensibilidade dessas leveduras ao TTO e também despertam o interesse, para a identificação do composto de maior ação antifúngica para o desenvolvimento de novos agentes com ação farmacológica.

## Referências

- COLOMBO, A.L. *et al.* High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases.** v.34, p.281-286, 1999.
- AQUINO, V.R. *et al.* Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.
- CANTÓN, E.; VIUDES, Á.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Rev.Iberoam.Micol.** v.18, p.51-55, 2001.
- PFALLER, M.A. *et al.* International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. **Journal of Clinical Microbiology.** v.36, n.7, p.1886-1889, 1998.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.36, n.5, p.599-607, 2003.
- MONDELLO, F. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and-resistant human pathogenic yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.51, p.1223-1229, 2003.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.53, p.1081-1085, 2004.
- VAZQUEZ, J.A. *et al.* Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An Epidemiologic Study. **The Journal of Infectious Diseases.** v.168, p.195-201, 1993.
- BASSETI, M. *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases.** v.6, n.26, p.1-22, 2006.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized simple disc method. **Am.J.Clin.Pathol.** v.45, p.493-496, 1966.
- COX, S.D. *et al.* Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules.** v.6, p.87-91, 2001.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol.Rev.** v.59, p.201-222, 1995.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology.** v.95, p.853-860, 2003.
- OLIVA, B. *et al.* Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology.** v.37, p.185-187, 2003.
- PARVEEN, M. *et al.* Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.54, p.46-55, 2004.
- PAPHITOU, N.I. *et al.* *In vitro* antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.46, n.4, p.1144-1146, 2002.
- ENAQUE-ANGOUVANT, A.; HENNEQUIN, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. **Clinical Infection Diseases.** v.41, p.1559-1568, 2005.
- JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review, aspects of the test methods. **Planta Medica.** v.53, p.395-398, 1987.
- CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology.** v.78, p.264-269, 1995.