

## “ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* EM AMOSTRAS OBTIDAS DE CANDIDOSE VAGINAL EM GESTANTES”

Martinet, A. S.<sup>1</sup>, Muniz, R. S.<sup>2</sup>, Teodoro, G.R.<sup>3</sup>, Khouri, S.<sup>4</sup>

1,2,3,4 Faculdade Ciências da Saúde Curso Biomedicina  
Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, CEP 12244- 000  
Fone: +55 12 3947 1015, Fax: +55 12 3947 1015

[alline\\_martinet@yahoo.com.br](mailto:alline_martinet@yahoo.com.br), [rafha\\_muniz@hotmail.com](mailto:rafha_muniz@hotmail.com), [guilhermerte@uol.com.br](mailto:guilhermerte@uol.com.br), [soniak@univap.br](mailto:soniak@univap.br)

**Resumo** - O aumento das infecções fúngicas por leveduras, resistentes aos antifúngicos convencionais, tem despertando o interesse por novos fármacos com atividade antifúngica como os de origem natural. A *Melaleuca alternifolia* é conhecida por sua atividade antimicrobiana e antiinflamatória. O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade do óleo, em 21 cepas de levedura do gênero *Candida spp.* isoladas de secreção vaginal de pacientes gestantes, HIV negativas e positivas, pela técnica de Microdiluição, segundo a NCCLS/CLSI, 2002. De acordo com os resultados obtidos, todas as cepas (100%) apresentaram sensibilidade às diferentes concentrações testadas do óleo de *Melaleuca alternifolia*, observando-se uma variação de CIM's 0,19 a 6,25% (v/v) e CFM's 0,785 a 12,5 % (v/v). Os ensaios da atividade antifúngica, *in vitro*, realizados com cepas clínicas de candidose vaginal demonstraram a eficácia deste óleo essencial, tanto com efeito fungistático quanto fungicida. Despertando assim, interesse para que outros estudos complementares sejam realizados para o desenvolvimento de novos fármacos, com possível emprego no tratamento de infecções oportunistas por *Candida* em gestantes soro - positivas.

**Palavras-chave:** Candidose Vaginal, *Melaleuca alternifolia*, microdiluição

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas II

### Introdução

As alterações do pH vaginal predis põem ao aparecimento da candidose, e outros fatores como: a gravidez, o uso de anticoncepcionais orais, de antibióticos, corticoterapia, drogas imunossupressoras, imunodepressão, diabetes entre outros fatores, propiciam ao aumento na concentração de glicogênio vaginal, com conseqüente acidificação do meio, onde auxiliam a proliferação da levedura *Candida* (HALBE, 2000; CASTRO et al., 2006; TRABULSI, 2004). Nos últimos anos o interesse por produtos medicinais naturais tem aumentado devido a crescente incidência de efeitos adversos associados as drogas convencionais (MONDELLO, 2003).

Os óleos essenciais são constituídos de elementos voláteis contidos em sua estrutura vegetal, e exercem papel fundamental na defesa contra microorganismos. A maior parte dessas propriedades é conferida por produtos do seu metabolismo secundário, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (TAIZ, 2004). Cientificamente cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antimicrobianas *apud* Lima et al (2006). Vários óleos essenciais de espécies de plantas distintas mostraram-se eficientes na atividade antifúngica contra *Candida* entre elas a *Eugenia uniflora L.*, *Rosmarinus*

*officinalis*, *Eucalyptus citriodora* HK, *Citrus limon* Risso e *Melaleuca alternifolia* (LIMA, 2006).

A *Melaleuca alternifolia* (TTO) é um óleo obtido da tea tree (arvore do chá), comum na região New South Wales (Australia) onde é utilizada como medicamento caseiro e conhecida por sua atividade antimicrobiana e antiinflamatória (MONDELLO, 2003). De acordo com a International Organization for Standardization 1996, o óleo de *Melaleuca alternifolia*, possui cerca de 14 componentes entre eles, 1,8-cineol e terpineno-4-ol (MONDELLO, 2006; HAMMER, 2003). A importância de se investigar a atividade do óleo de *Melaleuca alternifolia*, e seus componentes, consiste em conhecer a atividade de cada componente, e como cada um contribui para a atividade do óleo essencial (HAMMER, 2003).

O presente estudo avaliou a atividade antifúngica, *in vitro*, do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, através da técnica de microdiluição, em diferentes concentrações, frente às cepas de levedura do gênero *Candida sp.*, obtidas de secreção vaginal de gestantes HIV negativas e positivas.

### Metodologia:

Foram avaliadas cerca de 16 cepas clínicas, isoladas de gestantes sendo: 8 *C.*

*albicans*, 5 *C. glabrata*, 2 *Candida norvagensis*, 1 *C. tropicalis* e 3 cepas isoladas de gestantes soro positivas: , 2 *Candida norvagensis* e 1 *C. albicans*, cedidas pelo setor de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté. Foram também testadas cepas-padrão - ATCC (American Type Culture Collection): *C. albicans* 10231, *C. glabrata* 30070, *C. tropicalis* 157, e *C. parapsilosis* 22019, *C. krusei* 6258, totalizando cerca de 21 cepas.

Para a avaliação da atividade antifúngica as cepas foram submetidas à técnica de Microdiluição, segundo a NCCLS/CLSI, 2002, repicadas no ágar Sabouraud Dextrose (Difco®).

Os inóculos foram preparados a partir de cultivos de 24 horas em ágar Sabouraud Dextrose (Difco®), suspendendo-se as células fúngicas em solução salina estéril, a 0,9%, cujas turvações foram ajustadas e padronizadas pelo método de turbidez, utilizando o aparelho Probac, para a determinação da escala de Mac Farland de 0,5. Após a obtenção da escala de turvação, 20 µL foram transferidos para um tubo estéril contendo 2mL do meio RPMI em caldo, para a realização do teste.

Para a preparação das placas de microdiluição, 50 µL do meio RPMI foram pipetados nos 96 poços e a coluna 1 e 12, foram consideradas como: controle negativo (contendo somente o meio RPMI e controle positivo (contendo 50 µL do meio RPMI e 50 µL do inóculo obtido pela escala de turvação de Mac Farland), respectivamente. Conforme a figura 1.

FIGURA 1 – Placa de Microdiluição, utilizado para a determinação das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	11	12
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
C	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
D	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
E	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
F	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
G	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
H	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
	(-)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,56%	0,785	0,39%	0,19%	0,09%	(+)

● Coluna 1: Controle Negativo, meio RPMI

Coluna 2 ao 11: 50 µL do meio de cultura RPMI; Solução teste de *Melaleuca alternifolia* e 50 µL da suspensão microbiana de turvação de 5,0 pela escala de Mac Farland.

● Coluna 12: Controle Positivo: Meio de cultura RPMI e 50 µL da solução de turvação pela escala de Mac Farland.

O óleo de *Melaleuca alternifolia* foi preparado contendo 5 % de propilenoglicol. A diluição seriada iniciou-se em 50 µL desta solução por 50 µL do meio RPMI, previamente pipetada em toda a placa de microdiluição iniciando-se na concentração de 50% do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, obtendo uma diluição de 1:2, iniciando-se na segunda coluna com uma concentração inicial de 50% e terminado na décima primeira coluna, sendo nesta desprezado 50 µL restantes, obtendo assim uma concentração final de 0,09%, do óleo. As microplacas foram incubadas a 37°C, por um período de 24- 48horas.

A leitura consistiu na comparação visual do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poços de 2 a 11) com referência ao crescimento no poço-controle positivo (poço 12). Para a determinação do MIC, realizou-se a semeadura de 4 colunas, em estrias de 4 poços da placa de microdiluição em ágar Sabouraud Dextrose (Difco®), sendo uma coluna anterior ao efeito fungicida e outra posterior a Concentração Inibitória Mínima. Incubou-se por mais 24 horas à 37°C.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) baseou-se na presença de crescimento de leveduras nas estrias, sendo estas definidas como a menor concentração do óleo de *Melaleuca alternifolia* que determinasse a inibição do crescimento das leveduras, e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) a menor concentração do óleo que eliminasse o crescimento de leveduras.

## Resultados:

A CIM e o CFM do óleo de *Melaleuca alternifolia*, foram observados através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC) frente às 21 cepas de leveduras *Candida*, onde variou de: 0,19 a 1,56% para (CIM) e 3,12 a 0,785 % (CFM) para *C. albicans*; 3,12 a 6,25 % (CIM) e 6,25 a 12,5 % (CFM) para *C. glabrata*; 3,12 (CIM) e 6,25 % (CFM) *Candida norvagensis*; 1,56 a 3,12% (CIM) e 3,12 a 6,25% (CFM) para *C. tropicalis* e a para as cepas ATCC foram obtidos os seguintes valores: *C. krusei* 12,5 % (CIM) e 25% (CFM) e *C. parapsilosis* 12,5 %(CIM) e 25% (CFM). Conforme demonstrado pelas tabelas 1 e 2 abaixo

TABELA 01 – Avaliação da susceptibilidade do gênero *Candida* spp, isoladas de gestantes, frente ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

<b>CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FUNGICIDA (CFM) EM CEPAS CLÍNICAS</b>		
<b>Microrganismos</b>	<b>CIM % (V/V)</b>	<b>CFM % (V/V)</b>
001 <i>Candida albicans</i> *	1,56	3,12
002 <i>Candida albicans</i>	0,785	1,56
003 <i>Candida albicans</i>	0,785	1,56
004 <i>Candida albicans</i>	0,785	1,56
005 <i>Candida albicans</i>	0,39	0,785
006 <i>Candida albicans</i>	0,39	0,785
007 <i>Candida albicans</i>	0,39	0,785
008 <i>Candida albicans</i>	0,19	0,785
009 <i>Candida norvagensis</i> *	3,12	6,25
010 <i>Candida norvagensis</i> *	3,12	6,25
011 <i>Candida glabrata</i>	3,12	6,25
012 <i>Candida glabrata</i>	6,25	12,5
013 <i>Candida glabrata</i>	6,25	12,5
014 <i>Candida glabrata</i>	6,25	12,5
015 <i>Candida glabrata</i>	6,25	12,5
016 <i>Candida tropicalis</i>	3,12	6,25

\*Cepas clínicas isoladas de gestantes HIV positivas.

TABELA 02 Avaliação da susceptibilidade do gênero *Candida* spp, das cepas- padrão, frente ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

<b>CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FUNGICIDA (CFM) EM CEPAS ATCC</b>		
<b>Microrganismo</b>	<b>CIM% (V/V)</b>	<b>CFM % (V/V)</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,56	3,12
<i>Candida glabrata</i> ATCC 30070	3,12	6,25
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 157	1,56	3,12
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	12,5	25
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	12,5	25

### Discussão:

A leitura das cepas foi realizada após um período de 24 e 48 horas de incubação, sendo que no período de 24 horas, não pode ser considerada devido a pouca viabilidade de crescimento, de algumas cepas no meio ágar Sabouraud Dextrose (Difco®). Sendo considerada somente a leitura de 48 horas como preconiza a NCCLS, 2002.

O gênero *C.albicans*, apresentou menor sensibilidade comparada a outras cepas, tendo um CIM de 0,19% a 1,56% e CFM de 0,785% a 3,12 %, a *C. glabrata* maior sensibilidade ao óleo com

CIM de 3,12 % a 6,25 % e de CFM 6,25% a 12,5% . *C. tropicalis* apresentou uma variação do CIM entre 1,56 % a 3,12% e CFM 3,12 A 6,25% e as espécies de *C. norvagensis* não apresentaram alteração entre as amostras obtendo um CIM de 3,12% e CFM 6,25%.

Mondello et al (2003) também observou atividade antifúngica do óleo, em experimentos *in vitro* e *in vivo* sobre leveduras do gênero *Candida* e do gênero *Criptococos*, obtendo na MIC<sub>50</sub> entre 0,125 a 0,06 % e na MIC<sub>90</sub> entre 0,25 a 0,06 %. Já *in vivo*, realizou o tratamento com o óleo de *Melaleuca alternifolia* a 5%, em ratas infectadas com *Candida albicans*, resistentes a fluconazol, onde demonstrou a mesma eficácia na terceira semana de tratamento, comparando os resultados ao fluconazol e intraconazol.

Hammer et al (2003) observou atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em diferentes microrganismos e relatou que há diferenças nos CIM's e CFM's, entre os métodos de micro e macrodiluição. Uma das causas para as diferenças entre os CIM's e CFM's está relacionada a associação do óleo com o poliestileno presentes na placa de microdiluição resultando, em novos compostos presentes na solução, interagindo com o organismo teste, podendo explicar o porque de CIM's e CFM's, mais baixos na microdiluição que na macrodiluição (HAMMER, 2003). Além disso, o propileno presente nas bandejas no ensaio de microdiluição, pode induzir a uma subestimação da atividade antimicrobiana de alguns componentes do óleo essencial (MONDELLO, 2006).

Este estudo vem corroborar com o estudo realizado por Hammer (1998) em que concluiu que é difícil estabelecer uma correlação entre os trabalhos, pelo fato de não existir ainda, uma metodologia padrão.

Hammer et al (2004) investigaram o mecanismo de ação do óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes frente aos gêneros *C. albicans*, *C glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* e verificou alterações nas propriedades e funções da membrana tais como, o aumento da permeabilidade das células, fluidez da membrana e inibição da acidificação. No presente estudo não foi possível realizar estas análises, entretanto é de fundamental importância dar continuidade ao presente projeto para o entendimento e sucesso terapêutico com este óleo essencial incorporado em possíveis fármacos que possam ser testados, *in vitro* e *in vivo*.

### Conclusões:

- Comparando a *Candida albicans* isoladas de gestantes HIV positivas com as isoladas de HIV negativas, observou-se o aumento dos valores de CIM's e CFM's, quando correlacionadas com as

outras cepas do mesmo gênero, demonstrando presuntivamente uma menor sensibilidade.

- Com base nos resultados, são requeridos outros estudos para comparação do efeito, e identificação do componente de maior potencial antifúngico

- 100% das cepas analisadas foram sensíveis às concentrações estudadas, estes dados preliminares encorajam para que novos estudos sejam realizados no desenvolvimento de fármacos para tratamento tópico de candidose vaginal e outras infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* em paciente predisponentes, como gestantes e soro positivos .

#### Agradecimentos:

Ao Grupo de Genética Molecular e Genomas do IP&D da Universidade do Vale do Paraíba, e em especial ao Adolfo José da Mota, pela boa vontade e disponibilidade de tempo, para confirmação da identificação, das cepas clínicas, utilizando a técnica Polymerase Chain Reaction (PCR).

#### Referências bibliográficas:

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S.- Mecanismos de resistência da *Candida* sp. *www antifungicos- Infarma*, v.18, nº 9/10, 2006.

HALBE, H. W.- Tratado de ginecologia.-3ª Edição- Editora Roca São Paulo: Roca, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.42, p.591-595, 1998.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V.- Antifungal activity of the oil components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) - *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 853–860.

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* (2004) 53, 1081–1085 DOI: 10.1093/jac/dkh243 Advance Access publication 12 May 2004.

International Organisation for Standardisation (1996) Oil of *Melaleuca*, Terpinen-4-ol Type (Tea

Tree Oil) (ISO 4730:1996). Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.

LIMA, I. O., OLIVEIRA, R. A. G., LIMA, E.O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. bras. farmacogn.*, Apr./June 2006, vol.16, no.2, p.197-201. ISSN 0102-695X.

MONDELLO, F., BERNARDIS, F., GIROLAMO, A., SALVATORE, G., CASSONE A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 51, 1223-1229.

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 Infectious Diseases* 2006, 6:158 doi:10.1186/1471-2334-6-158

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M27-A2, 2002.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TRABULSI, Luiz Rachid et al. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.