



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Viviah Lima de Assis Machado

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE MELALEUCA
ALTERNIFOLIA SOBRE CEPAS DE *Cândidas albicans* e *krusei*.

Palmas – TO

2022

Viviah Lima de Assis Machado

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE MELALEUCA
ALTERNIFOLIA SOBRE CEPAS DE *Cândidas albicans e krusei*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Palmas – TO

2022

Viviah Lima de Assis Machado

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE MELALEUCA
ALTERNIFOLIA SOBRE CEPAS DE *Cândidas albicans e krusei*.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Orientador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Me. Luis Fernando Albarello Gellen

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Dr. Luís Fernando Castagnino Sesti

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu guia e minha fortaleza. Me deu forças e direcionamento durante toda minha vida me fazendo chegar até aqui. Me deu coragem, determinação e foco para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus pais, Paulo Machado e Marilene Lima que nunca mediram esforços para me fazer um grande ser humano. Me deram a melhor educação, princípios e valores. Se sacrificaram para que eu pudesse estar concluindo este curso em uma universidade de referência. Me deram amor, força e apoio. Como também minha irmã e sobrinho. Vocês são minha força diária. Obrigada por nunca terem duvidado de mim.

A todos os meus professores que contribuíram com essa jornada, assim como os supervisores de estágio, serei sempre grata. Ao meu orientador Ernane Gerre Pereira Bastos, obrigada pela orientação, apoio, paciência e tempo dedicado a este trabalho. Me inspiro e tenho orgulho de ter sido aluna de todos.

Por fim, a todos que direto ou indiretamente fizeram parte dessa história.

EPÍGRAFE

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 6 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 7 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 9 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 11 |
| REFERÊNCIA..... | 12 |



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U nº 198, de 14/10/2016
ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL LUTERANA DO BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA SOBRE CEPAS DE *Cândidas albicans* e *krusei*.

*AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA SOBRE CEPAS DE *Cândidas albicans* e *krusei*.*

Viviah Lima de Assis Machado^a; Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.^b

^a Graduando em Biomedicina, Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP. Av. Joaquim Teotônio Segurado, 1501 Sul, Palmas – TO, CEP 77.019-900, limadeassismachado@gmail.com.

^b Biomédico, Professor, Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP. Av. Joaquim Teotônio Segurado, 1501 Sul, Palmas – TO, CEP 77.019-900, biomedicina@ceulp.edu.br.

Resumo

Cândida é um gênero de fungos patogênicos que causam doenças infecciosas podendo ocorrer infecções fatais atingindo a corrente sanguínea. A infecção provoca diversos sintomas que causam incômodo como coceira e inflamação. O microrganismo vive em harmonia com o organismo, mas em situações de desequilíbrio, como baixa imunidade, há a manifestação patológica sendo recorrente em casos de imunossupressão. O objetivo deste trabalho foi buscar alternativas de tratamento testando, *in vitro*, a atividade antifúngica do óleo essencial de Melaleuca sobre cepas de *Cândida albicans* e *Cândida krusei*. Os óleos essenciais (OE) são produtos naturais de origem vegetal utilizados nas indústrias de perfumaria, alimentos e farmacêutica. Trata - se de uma pesquisa experimental de abordagem quali-quantitativa de natureza aplicada, utilizando o método de diluição seriada em duplicata. Neste estudo não houve ação antifúngica do óleo testado diferentemente de alguns testes já realizados com o mesmo. Com os resultados obtidos há uma necessidade de novos experimentos com novas diluições para resultados satisfatórios.

Palavras-chave: *Cândida*. Fungo. Melaleuca.

Abstract

Candida is a genus of pathogenic fungi that cause infectious diseases and can lead to fatal infections reaching the bloodstream. The infection causes several symptoms that cause discomfort such as itching and inflammation. The microorganism lives in harmony with the body, but in situations of imbalance, such as low immunity, there is a pathological manifestation that is recurrent in cases of immunosuppression. The objective of this work was to look for treatment alternatives by testing, in vitro, the antifungal activity of Melaleuca essential oil on strains of *Candida albicans* and *Candida krusei*. Essential oils (EO) are natural products of plant origin used in the perfumery, food and pharmaceutical industries. This is an experimental research with a quali-quantitative approach of an applied nature, using the serial dilution method in duplicate. In this study, there was no antifungal action of the oil tested, unlike some tests already carried out with it. With the results obtained there is a need for new experiments with new dilutions for satisfactory results.

Keywords: *Candida*. Fungus. Melaleuca.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são produtos originários de plantas adquiridos por meio de técnicas como, arraste a vapor, podendo ser extraídos de folhas, cascas rizomas e frutas. São utilizados na perfumaria, alimentos e em tratamentos de enfermidades (BIZZO e col. 2009).

Há muitos anos os óleos essenciais fazem parte da medicina popular como alternativa terapêutica, o que envolve estudos para que haja comprovação de resultados que possam ser reproduzidos e eficazes, a avaliação *in vitro* é uma das alternativas utilizadas (NASCIMENTO e col. 2006).

Há uma gama de óleos essenciais existentes no mercado que são utilizados para diversos fins. Laranja, Menta japonesa, Hortelã-pimenta, Cedro, Spearmint são apenas alguns dos principais óleos essenciais que fazem parte do mercado mundial de consumidores. (BIZZO e col. 2009).

Dentre as diversas espécies, há o óleo de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), originário da Austrália e extraído das folhas da árvore *Melaleuca alternifolia*. Conhecido por suas propriedades antimicrobianas, está presente em diversas formulações com fins terapêuticos. (CARSON e col. 2006). Para Lima e col. (2013) a *Melaleuca* apresenta ainda potencial antifúngico, antisséptico e parasiticida.

Visando a necessidade de novas alternativas de tratamento, os óleos essenciais vêm ganhando cada vez mais visibilidade devido a ser uma opção terapêutica natural, levando em consideração que a busca pelo orgânico está ganhando força nos últimos anos. É importante para a ciência estudar meios alternativos de tratamentos para patologias. Assim, com novas descobertas é possível levar para a população conhecimento e opções de tratamento.

Dentre espécies de fungos, a *Cândida* é conhecida por seu potencial patogênico além de apresentar mais de 200 gêneros. Essa tem se mostrado resistente a alguns fármacos utilizados na terapêutica, como, fluconazol e anfotericina B. Essas resistências são observadas devido a mutações e recombinações mitóticas, formando componentes-alvo dos antifúngicos com menor afinidade de ligação a ele, a chamada resistência adquirida, essas mutações são ocasionadas após a exposição do microrganismo com o antifúngico, havendo a proliferação dos mutantes resistentes (VIEIRA e SANTOS, 2016).

A espécie *Cândida albicans* é uma das mais patogênicas que se multiplica por brotamento e ainda produz tubos germinativos crescendo como pseudo-hifa. É um fungo presente no organismo em pequenas quantidades, porém, alguns fatores desencadeiam o acometimento desses microrganismos fazendo com que ele se manifeste, como exemplo: queda da imunidade, gravidez, uso de antibióticos e infecções por *Papilomavírus humano* - HPV (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2022).

Portanto, analisando o seu potencial fungicida, o objetivo do presente trabalho é avaliar, *in vitro*, se há atividade antifúngica do Óleo Essencial de *Melaleuca* frente a duas espécies de *Cândida*, *C. albicans* e *C. krusei* com a inibição do crescimento fúngico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho tratou-se de uma pesquisa experimental e transversal, sendo de abordagem quali-quantitativa de natureza aplicada com objetivo de explorar se há atividade antifúngica do óleo de Melaleuca em duas espécies de *Cândida*: *C. albicans* e *C. krusei*.

O estudo foi realizado no laboratório de microbiologia do Centro Universitário Luterano de Palmas. O óleo essencial de Melaleuca foi manipulado em Fórmula Mais Farmácia e Perfumaria LTDA. Os microrganismos utilizados foram adquiridos do CEULP ULBRA, assim como os meios de cultura necessários.

Para início do estudo foi preparado o meio de cultura Ágar sabouraud para o crescimento fúngico das espécies selecionadas: *C. albicans* e *C. krusei*, conforme instruções do fabricante, sendo diluído em água destilada e autoclavado por 15 minutos a 121°C. Desta forma, em ambiente estéril, foi repicado por meio de esgotamento de alça as espécies a serem trabalhadas em placas distintas, posteriormente, foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas.

O óleo utilizado no estudo foi diluído conforme o método descrito por Aligiannis et al. (2001) e Lima et al. (2006), sendo: 800 µL do óleo essencial, 50 µL de Tween 80 e 4,2 ml de água destilada estéril, adicionados em um tubo estéril e agitado por 5 minutos. Apresentando uma concentração de diluição a 16% (144mg/mL).

O Tween 80 é um emulsificante utilizado para obtenção de emulsões entre água e óleo devido a sua característica hidrofílica da cadeia de polioxietileno (MAPRIC, s.d.).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM. A CIM foi avaliada por meio de coloração com o corante resazurina, no qual há alteração de cor de azul para rosa ou não. Permanece a cor azul quando há baixo crescimento fúngico, devido ação do antifúngico avaliado já alteração de cor ocorre quando há um crescimento fúngico significativo (ROCA e col. 2019). A técnica foi realizada em placa de 96 poços por meio de diluição seriada em duplicata.

A microdiluição foi realizada no caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), meio de cultura rico para crescimento de microrganismos exigentes, como fungos, leveduras, enterobactérias e outros. É composto por nutrientes de cérebro e coração, além de fontes de carboidratos, como dextrose e peptona fornecendo nitrogênio e vitaminas para estes microrganismos (PROLAB, 2019).

Nas colunas avaliadas foi adicionado 100 µL de caldo BHI. As duas primeiras foram destinadas a avaliação da *C. albicans*, na 5 e 6 para *C. Krusei*, 10 controle negativo, 11 controle positivo para *C. krusei* e 12 controle positivo para *C. albicans*. Na primeira linha dos poços foi adicionado 100 µL do óleo diluído (concentração inicial a 8%), as concentrações seguintes do

óleo foram obtidas por meio de uma diluição seriada passando 100 µL de um poço para o outro subsequente, como a tabela 1 representa.

Após as diluições, foi adicionado 10 µL da suspensão fúngica na escala McFarland 0,5 de *C. albicans* em todos os poços da coluna 1, 2. Assim como em todos os poços das colunas 5, 6 - 10 µL da suspensão fúngica de *C. krusei*.

A escala McFarland é um padrão de turvação utilizado para determinação de intensidade dos microrganismos em um meio líquido, ocorrendo turvação do meio. No meio líquido contém quantidades de cloreto de bário sulfúrico, sendo assim, quanto maior a concentração de fungos ou bactérias, maior a opacidade do meio. O preparo é realizado adicionando o microrganismo com auxílio de um swab em solução salina e comparando a olho nu com o meio McFarland pronto (INTERJET, s.d.).

O poço destinado para controle negativo havia apenas 100 µL o caldo BHI. Já os destinados para controle positivo, foi adicionado 100 µL do caldo mais 10 µL da suspensão fúngica na escala McFarland 0,5 de *C. albicans* (poço 11) e na cavidade 12 havia o 100 µL do caldo mais 10 µL da suspensão fúngica na escala McFarland 0,5 de *C. krusei*.

Em todos os poços foi adicionado resazurina. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas, para realização da leitura. A Concentração Inibitória Mínima é definida pela menor concentração que há inibição do crescimento fúngico.

Tabela 1: Concentrações das diluições seriadas do óleo essencial de Melaleuca.

| Linhas | Fator de Diluição | Concentração <i>C. albicans</i> | Concentração <i>C. krusei</i> |
|--------|-------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| A | 1:2 | 8% | 8% |
| B | 1:4 | 4% | 4% |
| C | 1:8 | 2% | 2% |
| D | 1:16 | 1% | 1% |
| E | 1:32 | 0,5% | 0,5% |
| F | 1:64 | 0,25% | 0,25% |
| G | 1:128 | 0,125% | 0,125% |
| H | 1:256 | 0,0625% | 0,0625% |

Fonte: autor, (2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo realizado e metodologia empregada, o óleo essencial de Melaleuca não se apresentou eficaz para inibição do crescimento fúngico das espécies de *Cândida albicans* e *Cândida krusei* nas concentrações preparadas, apresentando coloração rosa, por meio do corante resazurina, após um período de incubação de 48 horas. As condições de tempo e temperatura podem ter sido interferentes durante o processo.

Os poços definidos como controle de esterilidade não apresentaram quaisquer manifestações de crescimento fúngico.

Seria necessário refazer novos testes com concentrações e tempo de incubação diferentes, uma vez que estes podem ter sido fatores determinantes para os resultados obtidos, assim como o óleo adquirido e todos os outros reagentes. Devido aos recursos disponíveis e tempo, não foi possível dar prosseguimento no estudo.

Em um estudo realizado por Cavalcanti e col. (2011) o óleo essencial de melaleuca apresentou capacidade antifúngica para *Cândida albicans* nas concentrações 2,25 mg/mL e 9,0 mg/mL, já para *C. krusei* 4,5 mg/mL.

Já em outro estudo realizado por COSTA e col. (2010), foi utilizado como metodologia a formação de halos realizada em placas de antibiograma. A diluição do óleo de *M. alternifólia* foi realizada com óleo vegetal de amêndoas, em concentrações de 10 a 100%. As leveduras foram preparadas com solução fisiológica 0,9% ajustadas a escala McFarland. A atividade antifúngica foi observada pelo tamanho dos halos de inibição formados. Apresentou resultados positivos nas concentrações 50 (8mm), 60 (10mm), 70 (12mm), 80 (13mm), 90 (15mm) e 100% (16mm) para *C. albicans*. Para espécie *C. krusei* 60 (11mm), 70 (12mm), 80 (13mm), 90 (14mm) e 100% (16mm).

4 CONCLUSÕES

Todos os processos foram realizados em precisão e dedicação desde o momento da cultura dos fungos, até o fim da pesquisa. Nas condições do estudo, os resultados não se apresentaram satisfatórios com o esperado. Em todas as diluições houve crescimento fúngico, sendo assim, o óleo essencial de melaleuca não foi eficaz para inibição das espécies. Qualidade do óleo estudado, diluição testada e condições de tempo podem ter sido fatores determinantes para tais resultados.

REFERÊNCIAS

BATISTA, Leônia Maria. Boletim Informativo do PET-Farmácia – UFPB. **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, março 2019. Disponível em: <https://www.ufpb.br/petfarmacia/contents/documentos/bips/infeccoes-fungicas-final-ok.pdf>. Acesso em 14/09/2022.

CANDIDÍASE. DIVE - diretoria de vigilância epidemiológica. Disponível em: <https://www.dive.sc.gov.br/index.php/candidiase>. Acesso em: 03 nov. 2022.

CAVALCANTE, A. A. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha spicata* sobre cepas de *Candida não albicans***. JOÃO PESSOA, 2017.

CAVALCANTI, Y.; ALMEIDA, ; PADILHA, W. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Centra**, 2011.

ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MC FARLAND. Bula. São Paulo: **Probac do Brasil**. Disponível em: <http://www.probac.com.br/anexos/bulas/isentos/nefelobac-rev03.pdf>. Acesso em 10 nov. 2022.

LIMA, C. F.; BERNUCI, K. Z.; MORESCHI, A. R. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca*, 2013.

NETO, A. A.; HAMDAN, J. S.; SOUZA, R. C. Prevalência de *Candida* na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 1999.

NOBRE, H. S. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato, frações e óleo essencial da *P. obliquum* Ruiz e Pavon. **South American Journal**. Rio Branco, 2019., p. 48-66.

PEIXOTO, J. V. *et al.* Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, Ipatinga, Jun-Ago 2014., p. 75-82.

RESUMO de Cândida: definição, micologia e infecções. **SANAR**, 2021. Disponível em: <https://www.sanarmed.com/resumo-de-candida-definicao-micologia-e-infeccoes>. Acesso em: 06 out. 2022.

ROCA, B. *et al.* Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade. **Vittalle – Revista de Ciências da Saúde**, 2019., p. 32-37.

SANTANA, D. P. *et al.* Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, mai./ago. 2013., p. 229-233.

SILVA, H. M. Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida*. Goiânia, 2011.

TWEEN 80. Bula. São Paulo: Mapric. Disponível em: <http://sistema.boticamagistral.com.br/app/webroot/img/files/Tween%2080.pdf>. Acesso em 10 nov. 2022.

VENTUROSO, L. R. *et al.* Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, dez. 2010.

VIEIRA, A. J.; SANTOS, J. I. **Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina**, Florianópolis, 14 ago. 2015.

