

2.12.02 - Microbiologia / Microbiologia Aplicada

"ÓLEO DE MELALEUCA E PRÓPOLIS COMO INIBIDOR FARMACOLÓGICO NATURAL CONTRA *Candida albicans* – TRATAMENTO ALTERNATIVO PARA CANDIDÍASE".

Suzy C. Oliveira¹, Gabrielle F. Silva ¹, Marisa Cristina. F. Casteluber²

¹Graduanda do curso de Ciências Biológicas da UEMG

²PhD; Orientadora da Pesquisa; Coord. do curso de Ciências Biológicas da UEMG.

Resumo:

A *Candida albicans* é um fungo oportunista capaz de infectar várias partes do organismo. O tratamento para esta infecção, com os medicamentos atualmente disponíveis, é longo e muitas vezes ineficaz pela falta de adesão do paciente ou até mesmo por resistência do fungo aos antimicóticos disponíveis. Desde os primórdios da humanidade os medicamentos naturais vêm sendo utilizados para o tratamento de doenças. O objetivo deste estudo foi analisar "*in vitro*" a eficácia do extrato de própolis e do óleo de melaleuca como fármacos naturais para tratamento alternativo contra candidíase. O método utilizado foi o de disco de difusão em ágar. Nos testes, o óleo de melaleuca se mostrou mais eficiente como inibidor do crescimento do fungo com o potencial de inibição semelhante ao fluconazol, que foi utilizado como controle positivo nos testes. O extrato de própolis também apresentou halos de inibição do crescimento, no entanto, mostrou-se menos eficaz quando comparado ao melaleuca e ao fluconazol.

Palavras-chave: Doenças Humanas; Antifúngicos; Fármaco Natural.

Apoio financeiro: PAPq/UEMG

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UEMG

Introdução

Os fármacos naturais vêm sendo utilizados para o tratamento de doenças há muitos anos (NAVES, 2013). A molécula de própolis é utilizada pelos homens desde os 350 anos a.C. e sua utilização começou pelos povos gregos, romanos e egípcios para tratamento de abscessos, feridas e mumificação (Belmiro et.al., 2011). O extrato da própolis é uma molécula de hormônio vegetal que age no bom desenvolvimento das plantas, sua mistura é complexa, formada por materiais resinosos e vários componentes químicos como alcoóis, vitaminas, minerais, flavonóides e flavonas. Atualmente a própolis é um dos produtos naturais de maior destaque, sendo conhecida pelas suas diversas propriedades biológicas, como antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório, cicatrizante, anestésico e anticancerígeno (BARBOSA, et. al. 2009).

Além da própolis, um composto muito utilizado pelos aborígenes da Austrália há milhares de anos, é o óleo de melaleuca. A melaleuca é uma planta nativa do sul da Austrália e da nova Caledônia. Também conhecida como árvore do chá, o óleo de melaleuca é usado para desinfecções, cicatrizações e pequenas curas, e possui propriedades antimicrobianas e antissépticas (SILVA, et.al. 2001).

Existem vários antifúngicos sintéticos atualmente comercializados. No entanto, a utilização incorreta desses fármacos dificulta o tratamento com eliminação completa das doenças fúngicas, além de induzir resistência microbiana (FENER 2006). A consequência disso são as inúmeras recidivas da infecção fúngica, muito comum nos casos de *C.albicans*, também conhecida como infecção crônica fúngica (LIMA et al., 2006; FIDEL et al.,1999). Diante deste cenário, já existem vários estudos de prováveis antifúngicos naturais com potencial de inibição do crescimento de microrganismos oportunistas e muitas pesquisas procuram compostos alternativos que sejam incapazes de provocar a resistência dos microrganismos. Essa última consideração é importante para que os antimicrobianos testados possam ser utilizados para mais de um tipo de infecção.

Em face dessas observações, o objetivo do estudo foi verificar o potencial do extrato de própolis e do óleo de melaleuca, como antifúngicos naturais para o tratamento da candidíase provocada por *C. albicans*, e padronizar a concentração dos fármacos naturais, determinando para isso a concentração inibitória mínima. Os dados obtidos mostraram que os antifúngicos testados neste trabalho apresentam potencial para serem utilizados como inibidores naturais de *C.albicans*.

Metodologia:

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada na Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibitaré (LAMAP). Foi utilizado 100mL do extrato de própolis puro da Marca Natulife®, na concentração de 40% (v/v). Para que o propolis tivesse a concentração de 20% (v/v), como descrito por Bianchini e Bedendo (1998), 50mL do extrato foi diluído em 50mL de água destilada. O óleo de melaleuca foi adquirido em

farmácia de manipulação na concentração de 10% (v/v) e utilizado nos testes sem fazer novas diluições. O cultivo da *Candida albicans* foi realizado em ágar Sabourraund Dextrose 4%, pH 5,6. A cultura foi mantida em estufa por 24 horas à 35°C. Em seguida, uma alçada de 1mm de diâmetro da *C.albicans* (1×10^6 células) foi inoculada em 50 mL de caldo Sabourraud Dextrose e incubado por 12 horas à 35°C. Um mililitro deste cultivo foi inoculado em placa contendo Ágar Sabourraud pela técnica de espalhamento. Sobre essa placa foram dispersos os discos embebidos nos antifúngicos a serem testados. Os discos consistiam de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, e e continham separadamente: melaleuca 10 % (v/v); própolis 20% (v/v); Fluconazol (200mg/mL) de acordo com Cruz (2013) como controle positivo; e etanol 70% (v/v) como controle negativo.

A metodologia do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi à mesma usada por Salvarani (2008). Para o preparo da *Candida* em suspensão, foi inoculada uma alçada de 1mm de diâmetro de *C. albicans* em 50mL de caldo Sabourand incubado por 24 horas à 35C⁰. Após 24 horas foi retirado 900uL do microrganismo em suspensão e colocado em 10 tubos de ensaio, em seguida, foi acrescentado no primeiro tubo 100uL da solução teste melaleuca 10% (v/v). Para a diluição do propolis 20% (v/v) foi retirado 800 uL da *candida* em suspensão para 200 uL de propolis. Iniciando assim, para ambos, a diluição seriada até o último tubo. Em seguida, foi retirado do primeiro tubo de ensaio contendo melaleuca 100uL da solução diluída, e do tubo contendo propolis foi retirado 200uL, ambos foram colocados em placa de *Petri*, contendo o ágar sabourand, usando a técnica de espalhamento, foi feito o mesmo para os demais tubos. As placas foram mantidas em estufa a 35C⁰ por 24 horas. As concentrações obtidas foram de 10^{-1} até 10^{-10} para o melaleuca, e de 2×10^{-1} a 2×10^{-10} para o própolis. Foram feitas também placas com o controle positivo (+) fluconazol, controle negativo (-) álcool 70% (v/v). Para o controle de esterilidade as placas contendo meio para fungo foram deixadas em estufa a 35C⁰ por 24 horas, podendo assim, ser avaliada a esterilidade do meio. A leitura do teste foi realizada após 24 horas de incubação, sendo iniciada pelas placas controle sem o antifúngico (controle negativo), e em seguida pela placa com antifúngico (controle positivo). Essas placas foram comparadas e em seguida foi determinado às menores concentrações capazes de inibir 90% e 50% de *C.albicans*. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Resultados e Discussão:

Segundo Fuzér e Souza (2003), as plantas medicinais são um recurso seguro e acessível, além de não gerarem lixo tóxico, como alguns medicamentos antibióticos e antifúngicos sintéticos que podem ocasionar toxicidade ao meio ambiente ou até mesmo um surto de resistência desses microrganismos oportunistas. O estudo de plantas medicinais, bem como, de seus óleos essenciais e extratos, tem crescido nos últimos anos. Muitas comunidades indígenas e/ou de baixa renda utilizam plantas medicianas, geralmente, como uma única forma de tratamento, devido à assecibilidade aos meios de tratamento convencionais que se mostram honerosos (OLIVEIRA, et, al., 2011). Essa observação leva os pesquisadores a investigarem cada vez mais os efeitos dessas plantas, a fim de, propor terapias alternativas que contemplem a população em geral e que seja de baixo custo para resolver o problema da aquisição e do tratamento de doenças.

Em um estudo do Departamento de Pesquisa do Colégio Nacional de Quiropraxia, EUA, foi constatado que a melaleuca age como antisséptico de duas maneiras: através de uma ação direta sobre os micro-organismos e por meio de um processo de ativação dos glóbulos brancos, no processo de defesa do corpo. Sendo assim, podemos considerar que ele possui propriedades imunoestimulantes, o que o torna uma alternativa para pacientes com baixa resistência e/ou doenças que fragilizam sua imunologia e permitem o aparecimento de doenças inoportunas (OLIVEIRA, 2011).

A ação inibitória da própolis contra microrganismos encontra-se relacionada à sua composição química, sendo os flavonoides apontados como os principais compostos responsáveis por essa propriedade (BARBOSA; BONATO, 2009; MARUXOL et. al. 2009). São definidos como compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, atuando na ação e absorção de vitaminas, nos processos de cicatrização como antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema imune. Atualmente, questiona-se a ação da própolis na regeneração e na granulação dos tecidos. Nesta perspectiva, a própolis é sugerida como produto que favorece a cicatrização, além de sua propriedade antimicrobiana natural desprovida de efeitos colaterais, o que não acontece com os antifúngicos sintéticos, apresentando, também, baixo custo em relação às coberturas utilizadas atualmente, tornando-se acessível à população (MENDONÇA, 2010). O medicamento Fluconazol, utilizado como tratamento contra diversas enfermidades provinda de fungos, tem sido um dos antifúngicos sintéticos mais indicados para tratar a candidíase. Por ser um medicamento hidrofílico, este circula pelo sangue por mais tempo e sua baixa ligação com as proteínas permite-lhe uma concentração alta no soro e ampla distribuição nos tecidos, chegando a apresentar a disponibilidade de aproximadamente 90%. (COSTA, FERNANDES e SILVA, 2003). Uma pesquisa feita pela Universidade de Medicina de Ribeirão Preto em São Paulo na Unidade de Trasplante Renal do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto investigou alguns medicamentos utilizados nos pacientes transplantados renais cm infecções fúngicas. O Fluconazol mostrou-se tolerável, no entanto, observou-se, altas concentrações da droga no líquido cefalorraquidiano, de 50% a 90% da concentração sérica concomitante. Observou-se também, que 80% da dose administrada é eliminada de forma ativa pelos rins e sua vida média no soro é estendida na vigência de insuficiência renal, podendo prejudicar os pacientes que utilizam o medicamento (NETO, e DE CASTRO, 1996).

Como pode ser observado na figura 1, tanto o extrato de própolis quanto o óleo de melaleuca apresentaram atividade de inibição contra a *C. albicans*, sendo que o óleo de melaleuca apresentou um melhor resultado,

mesmo quando comparado ao fluconazol. A própolis também apresentou inibição contra o fungo, porém, os resultados da própolis foram inferiores ao fluconazol. O controle negativo, álcool 70%, foi usado para confirmar que não foi a porcentagem alcoólica usada no preparo do óleo de melaleuca e no propolis que inibiu o microrganismo, e sim, o princípio ativo dos extratos. O controle positivo usado, fluconazol, foi escolhido por ser um dos medicamentos antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidíase. Foram realizados 12 testes para que a análise estatística fosse mais precisa.

Neste estudo foi apresentado que a própolis além de sua aplicação no tratamento de doenças bactericidas e anti-inflamatórias. (BARBOSA, et. al. 2009), para o qual é comumente utilizado pelas comunidades, ainda possui potencial de inibição contra a *C. albicans*. Mais interessante ainda, foi comprovar que o óleo de melaleuca foi capaz de inibir a *C. albicans*, apresentando halos de inibição superiores aos encontrados pelo antifúngico Fluconazol.

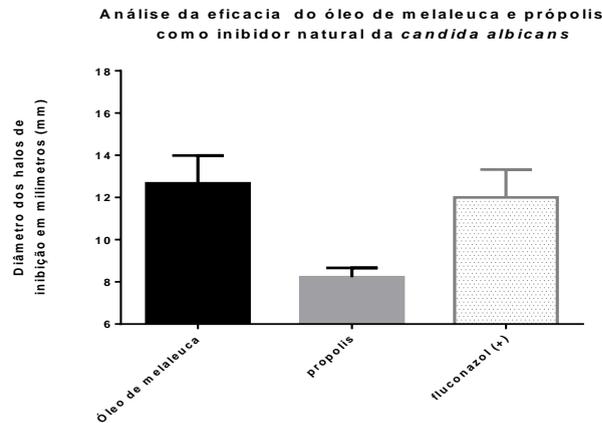


Figura 1: Eficácia do óleo de melaleuca e do extrato de própolis como inibidores farmacológicos naturais contra a *C.albicans*. No gráfico foi representado a média estatística dos halos de inibição. Em todos os testes pode-se observar que o óleo de melaleuca apresentou maior potencial de inibição ($p > 0,01$) quando comparado ao controle negativo e ao própolis. E se mostrou tão eficaz quanto o fluconazol para inibir esse fungo.

A concentração inibitória mínima (MIC) capaz de inibir 100 % do crescimento de *C.albicans* em placa foi na diluição 10^{-2} para o óleo de melaleuca. Para o extrato de própolis a concentração inibitória mínima foi de 10^{-1} . Nas demais concentrações o crescimento do microrganismo foi observado de forma crescente à medida que reduzia a concentração do extrato testado, como pode ser observado na Figura 2.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

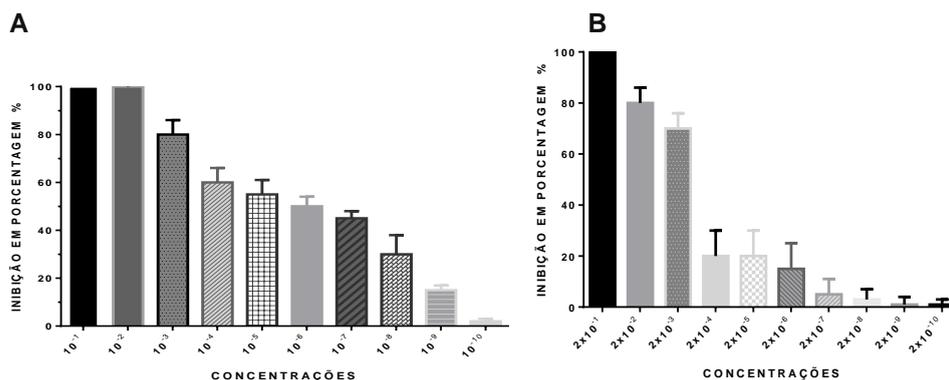


Figura 2. Representação da Concentração Mínima do Extrato testado que foi capaz de inibir o crescimento de *C.albicans*. A- MIC testado para o óleo de Melaleuca. No gráfico A pode ser observado que o óleo de melaleuca foi capaz de inibir em 100 % o crescimento do fungo ainda na concentração 10^{-2} . B- MIC testado para o extrato da própolis. Nos testes com a própolis pode ser observado no que esse extrato foi capaz de inibir 100% o crescimento de *C.albicans* na diluição 10^{-1} como mostrado no gráfico B.

O óleo de melaleuca quando comparado ao própolis apresentou-se como um inibidor farmacológico natural mais eficaz uma vez que mesmo em concentração menor do que aquela originalmente apresentada pela própolis, foi capaz de inibir totalmente o crescimento da *C.albicans*. Chama a atenção nesse estudo, também, a capacidade de inibição do crescimento de *C.albicans*. Quando comparadas ao óleo de melaleuca e ao fluconazol, o óleo de melaleuca mostrou-se mais eficaz para inibir o crescimento microbiano em todas as análises realizadas. Isso sugere que esse óleo pode ser um antifúngico tópico de escolha em substituição ao fluconazol

e sem gerar os efeitos adversos comuns de um medicamento sintético ingerido. Mais testes agora em animais devem ser feitos para comprovar a eficácia tópica desse medicamento.

Conclusões:

Os resultados dos testes realizados demonstraram que o óleo de melaleuca se mostrou eficiente na inibição do fungo, com eficácia comparada ao fluconazol (controle positivo +), o extrato de própolis apresentou halos de inibição do crescimento do fungo, mas foi inferior ao observado com o óleo de melaleuca e fluconazol. Esse trabalho comprovou a eficácia em nível laboratorial do óleo de melaleuca, principalmente, e da própolis demonstrando o efeito antifúngico positivo de inibição, sendo esta uma alternativa segura para fármacos naturais contra candidíase. Ressaltamos que o MIC determinado na pesquisa deve ser levado em consideração para o uso terapêutico no tratamento de candidíase, fazendo assim uma utilização em dosagens mínimas do composto natural.

Referências bibliográficas

- ¹BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, 2009.
- ²BIANCHINI, L. e BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.
- ³BELMIRO, M.S., OKI, Y. e FERNANDES, G. W. O presente das abelhas, própolis. Ed. 463. **Revista Planeta**. Abril, São Paulo. Editora três. 2011.
- COSTA, M.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. CANDIDIASE VULVOVAGINAL: ASPECTOS CLINICOS, TRATAMENTOS ORAL COM AZÓLICOS E SUSCETIBILIDADE IN VITRO. **Revista de Patologia tropical**, v. 32, n. 2, p. 145-162, 2003.
- ⁴CRUZ, M. A. G. Atividade inibitória de *Morinda citrifolia* sobre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Uberaba, 2013. Dissertação (Mestrado em Odontologia Biopatologia) – Universidade de Uberaba.
- ⁵DA SILVA, L. B. et al. Fatores de Virulência de *Candida ssp*. Conexão Fametro: Ética, cidadania e sustentabilidade. XII Semana Acadêmica, Ceará, 2016.
- ⁶Fenner, Raquel, et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. Vol. 42, n. 3, (Jul./set. 2006), p. 369-394 (2006).
- ⁷FUZÉR, L.; SOUZA, I. IBAMA dá início a núcleo de plantas medicinais. **Bionotícias**, Rio de Janeiro, n. 57, p.6-7, jan./fev. 2003.
- ⁸NAVES, P. L. F. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.
- NETO, M. M; DE CASTRO, F. J. F.; Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. **J. Bras. Nefrol**, v. 18, n. 4, p. 369-374, 1996.
- ⁹RODRIGUES & LIMA. Estudo fitoquímicos e o efeito do extrato etanólicos das folhas de *Solanum grandiflorum* RUIZ sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 2, p. 183-189, maio/ago. 2014.
- ¹⁰SALVARANI, F. M., PINTO, F. F., LOBATO, F. C. F., de ASSIS, R. A., GONÇALVES, L. A., MARTINS, N. E., et, al. (2008). Concentração inibitória mínima (CIM) de oito antimicrobianos frente isolados de *Streptococcus suis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 45(1), 41-47.
- ¹¹SILVA, S.R.S. Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Cheel crescida no Brasil. Viçosa, 2001. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ¹²OLIVEIRA, A.C.M. et al. “Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal”. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. UNESP, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.