

Sandra Cristina Barbosa Vieira

Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais em leveduras do
género *Candida*

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2009

Sandra Cristina Barbosa Vieira

Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais em leveduras do
género *Candida*

Sandra Cristina Barbosa Vieira
(Sandra Cristina Barbosa Vieira)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Professora Doutora Fátima Cerqueira

Porto 2009

SUMÁRIO

O trabalho apresentado é justificado pelo aparecimento de resistências aos antifúngicos disponíveis comercialmente e também à necessidade de procura de novos agentes antifúngicos, nomeadamente entre os compostos naturais (Pinto *et al.*,2006; Saikia *et al.*,2001). Na medicina tradicional, o uso de óleos essenciais deve-se principalmente às suas propriedades como anti-sépticos, agentes antimicrobianos (nomeadamente como antifúngicos), entre outras actividades (Galarraga *et al.*,2008; Saikia *et al.*,2001). Nesse sentido foi testada a actividade de sete óleos essenciais contra *Candida albicans* e *C. glabrata*. (Cerqueira *et al.*, 2008; Anexo 1) Estes fungos são responsáveis por micoses superficiais e sistémicas, pelo que necessitam de novas opções terapêuticas para o seu tratamento.

A actividade antifúngica dos óleos essenciais foi testada por determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) usando o método das microdiluições em agar Sabouraud.

Os resultados preliminares demonstram que os óleos essenciais de cravo-da-índia e o de tomilho têm uma actividade antifúngica potente contra os fungos testados. Os restantes óleos essenciais testados, nomeadamente lavanda, hortelã-pimenta, eucalipto, amêndoas doces e árvore do chá não apresentam actividade antifúngica. A sensibilidade destes fungos aos agentes antifúngicos comerciais (Anfotericina B e Itraconazol) foi também testada, uma vez que as espécies testadas foram isoladas de amostras clínicas.

A principal conclusão tirada deste trabalho é a de que os óleos essenciais podem ser boas alternativas terapêuticas para o tratamento de candidoses superficiais e que a sensibilidade de outros fungos a estes compostos deve ser testada e também devem ser identificados outros compostos naturais activos.

AGRADECIMENTOS

Nesta etapa da minha vida, chegou finalmente a altura de agradecer a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, com os seus conhecimentos, conselhos, experiências, histórias e opiniões.

Em primeiro lugar quero agradecer à Prof. Doutora Maria de Fátima Araújo Magalhães Cerqueira pela disponibilidade em me aceitar neste projecto.

Queria também agradecer à Prof. Doutora Elisabete Machado e também um muito obrigado ao Dr. Ricardo Silva por todo o apoio que me deram durante a minha “estadia” no laboratório de investigação.

Um muito obrigado também aos meus amigos, por tudo o que me ensinaram durante todos estes anos que convivemos juntos.

Ao meu namorado pelo apoio incondicional, pela paciência que teve e continua a ter comigo.

Ao meu irmão e avó por estarem sempre por perto.

E por fim, o meu maior agradecimento é para os meus pais, por me terem ajudado, aconselhado, compreendido e apoiado sempre e acima de tudo por todo o esforço feito durante estes anos para eu ter chegado onde cheguei.

A todos o meu muito obrigado

ABREVIATURAS

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

SNC – Sistema Nervoso Central

DMSO – Dimetilsulfoxido

ÍNDICE

SUMÁRIO.....	1
AGRADECIMENTOS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJECTIVOS.....	12
3. CANDIDOSES E SEU TRATAMENTO.....	13
3.1. CANDIDOSES.....	13
3.2. TRATAMENTO.....	17
3.2.1. Polienos.....	19
3.2.2. Azóis.....	21
3.2.2.1. Imidazóis.....	21
3.2.2.2. Triazóis.....	23
3.2.3. Alilaminas.....	24
3.2.4. Equinocandinas.....	25
3.3. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
3.3.1. Árvore-do-chá (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	28
3.3.2. Cravo-da-índia (<i>Eugenia cryophyllata</i>).....	29
3.3.3. Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>).....	30
3.3.4. Hortelã-pimenta (<i>Mentha x piperita</i>).....	31
3.3.5. Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>).....	32
3.3.7. Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	34
4. ACTIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> 35	
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1.1. Fungos.....	35

Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais em leveduras do género *Candida*

4.1.2.	Reagentes e Meios de Cultura	35
4.1.3.	Identificação	35
4.1.3.1.	Teste do tubo Germinativo	35
4.1.3.2.	Ágar Biggy.....	36
4.1.3.3.	API 32 C	36
4.1.4.	Amostras.....	37
4.1.5.	Actividade antifúngica.....	37
4.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.2.1.	Identificação	38
4.2.2.	Determinação da actividade (CMI) dos óleos essenciais	41
4.3.	CONCLUSÃO	43
5.	BIBLIOGRAFIA	44

ANEXO 1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Candidose da mucosa bucal.	13
Figura 2: Candidose genital: A) Vulvovaginite; B) Balanite, lesão localizada no pénis.	14
Figura 3: Candidoses: A) Perioníquia; B) Oníquia.	15
Figura 4: Candidose interdigital.	16
Figura 5: Estrutura molecular da Anfotericina B.	19
Figura 6: a) Estrutura molecular do Cetoconazol; b) Estrutura molecular do Clotrimazol; Estrutura molecular do Econazol; d) Estrutura molecular do Miconazol.	21
Figura 7: A) Estrutura molecular do Itraconazol; B) Estrutura molecular do Fluconazol; C) Estrutura molecular do Voriconazol.....	23
Figura 8: Estrutura molecular da Terbinafina.....	24
Figura 9: Ilustração extraída do Herbário de Trento que representa a raiz de mandrágora, símbolo da cura da esterilidade masculina	27
Figura 10: Árvore-do-chá.	28
Figura 11: Cravo-da-índia.	29
Figura 12: Eucalipto	30
Figura 13: Hortelã-pimenta.	31
Figura 14: Lavanda.	32
Figura 15: Amêndoas.	33
Figura 16: Tomilho.	34
Figura 17: Resultados do teste do tubo germinativo para Amostra 1, onde se pode observar a formação do Tubo germinativo	39
Figura 18: Resultados do teste do tubo germinativo para Amostra 2, onde se pode observar que não há formação do Tubo germinativo.	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais antifúngicos utilizados na terapêutica das infecções fúngicas.....	18
Tabela 2: Resultados dos testes de identificação das leveduras isoladas das amostras clínicas	38
Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais para <i>C.albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	41

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A relação entre os fungos e o Homem é já conhecida desde os primórdios da humanidade. Os primeiros registos datam de 300 a 200 a.C. e são simbolizados por estatuetas representativas de fungos (Henriques, 2008). Estes seres têm uma importância relevante na vida do Homem, quer de uma forma benéfica, quer de um modo prejudicial. Os fungos são importantes como fertilizantes dos solos, são óptimos indicadores de poluição e podem ainda ser usados para controlo biológico, por exemplo, para evitar pragas de insectos ou para destruir plantas (ex: infecção da planta de coca com *Fusarium*). (Marcelo, 2000) Na investigação científica são usados devido ao seu rápido crescimento *in vitro* e por serem de fácil reprodução e manipulação, tornando-se bons modelos de células eucarióticas. A importância dos fungos a nível económico prende-se com a possibilidade da sua utilização a nível industrial devido às suas capacidades enzimáticas, biossintéticas e fermentadoras, sendo assim usados a nível alimentar no fabrico de cerveja, vinho, pão e algumas variedades de queijos. A nível farmacêutico e químico os fungos são usados na obtenção de antibióticos (penicilina), imunossuppressores (ciclosporina), anti-inflamatórios (corticosteroides) e antifúngicos (Ferreira e Sousa, 2000). Mas estes microorganismos não trazem só benefícios para o Homem. Na agricultura os fungos podem ser responsáveis por grandes prejuízos pois provocam algumas doenças nas plantas que podem levar a destruição total de uma cultura agrícola, como é o caso do míldio nas videiras. São também responsáveis por contaminações alimentares, destruição de madeiras e peles. Outro grande problema associado prende-se com o facto de poderem provocar intoxicações alimentares, por ingestão por vezes de cogumelos venenosos ou então pela ingestão de micotoxinas que se podem encontrar nos alimentos contaminados. Além disso os fungos têm a capacidade de provocar infecção nos Homens e animais.

Foi com a invenção do microscópio, no século XVII que o estudo sistemático dos fungos teve o seu início. Em 1729, o Botânico italiano padre Antonio Micheli, incluiu pela primeira vez observações sobre fungos no seu livro *Nova Platerum Genera* (Henriques, 2008).

Os fungos são um vasto grupo de organismos, tradicionalmente classificados como plantas, mas por serem tão diferentes na sua estrutura, no modo como se desenvolvem e como

se alimentam, passaram a ser classificados num reino próprio, o Reino *Fungi* (Henriques, 2008).

São células eucariotas, ou seja, com núcleos rodeados por uma membrana nuclear. Neste grupo de organismos encontramos os fungos, com dimensões consideráveis como os cogumelos, os mais complexos possuindo hifas mais organizadas e especializadas, bem como formas microscópicas, como os bolores e as leveduras. Os bolores, são conjuntos de hifas que formam micelios “fofos” sendo as leveduras fungos unicelulares.

Os fungos são organismos heterotróficos, porque ao contrário das plantas verdes, não possuem clorofila e como tal não utilizam a energia solar para produzir o seu alimento. Assim estes organismos para obterem alimento, dissolvem e digerem a matéria orgânica e mineral do meio onde vivem. Para isso possuem um sistema de enzimas que são segregadas sobre o alimento, transformando-o em substâncias passíveis de serem absorvidas através das hifas. Esta característica é importante para uma das principais funções dos fungos a nível ecológico: são decompositores de matéria orgânica e desempenham um papel importante na ciclo natural da vida, pois conseguem extrair nutrientes que depois repõem na natureza de forma a que estes possam ser usados por outros organismos. (Henriques, 2008)

Os fungos podem reproduzir-se de duas formas, por reprodução sexuada, através de esporos sexuados, ou então através de esporos assexuados, dando origem assim à reprodução assexuada. Os esporos são células únicas, por vezes rodeados por uma película protectora, a partir dos quais se podem formar novos organismos. É o processo de formação destes esporos que determina o modo de vida e classificação dos fungos. (Henriques, 2008)

Na reprodução assexuada, os esporos formam-se a partir de um único indivíduo, sem que haja formação de células sexuais. Esta multiplicação dá-se por segmentação das hifas ou então por produção de hifas especializadas que formam estruturas reprodutoras, de aspecto muito diversificado, que assim originam uma enorme quantidade de esporos geneticamente idênticos. (Henriques, 2008)

A reprodução sexuada caracteriza-se pela união de dois núcleos compatíveis (do mesmo indivíduo ou indivíduos diferentes) que provêm de células sexuais formadas em

estruturas especializadas. Neste tipo de reprodução originam-se indivíduos geneticamente diferentes dos seus progenitores, tornando-se assim uma vantagem em termos da adaptação às condições ambientais (Henriques, 2008).

Os fungos podem utilizar os dois tipos de reprodução que foram referidos anteriormente quer isoladamente, quer em simultâneo, ou seja, há fungos que em condições adversas produzem esporos de resistência com uma camada protectora e com reservas alimentares para lhes permitir esperar por condições adequadas à sua reprodução sexuada.

As micoses são infecções provocadas por fungos microscópicos e podem ser classificadas em três categorias, consoante a sua localização: micoses cutâneas, subcutâneas e sistémicas. As micoses cutâneas e mucocutâneas, atingem principalmente a pele, o cabelo, o pelo, as unhas e as mucosas como os olhos, orofaringe, vagina e ouvido externo. As micoses subcutâneas, localizam-se a nível da derme, tecidos subcutâneos e dos músculos. Por fim, as micoses sistémicas ou profundas, que na sua grande maioria têm origem no pulmão, disseminam-se por todo o organismo podendo atingir qualquer outro órgão como por exemplo o SNC. (Ferreira e Sousa, 2000)

No que respeita às infecções provocadas por fungos, o seu número tem vindo a evoluir significativamente, principalmente devido ao aumento dos grupos de risco e também ao aumento de casos de pessoas com problemas de imunossupressão, nomeadamente o aumento significativo dos casos de VIH/SIDA. (Pinto *et al* 2006)

Mas as infecções fúngicas mais comuns são as micoses superficiais sendo que, apesar de se apresentarem normalmente como micoses benignas, associadas principalmente a um problema estético, atingem uma grande percentagem da população, num ou vários estádios da sua vida. A sua ocorrência varia com a idade, sexo, etnia e hábitos sócio-culturais. (Ferreira e Sousa, 2000)

Nas micoses superficiais incluem-se infecções da pele, do cabelo, do pêlo, das unhas e das mucosas, tais como olhos, orofaringe, vagina e ouvido externo, sendo que as mais importantes em Portugal são as dermatofitoses e as candidoses cutâneas e mucocutâneas. (Ferreira e Sousa, 2000)

A *Candida albicans*, apesar de ser uma levedura comensal do tubo digestivo de mais de metade da população sã, é a espécie responsável por grande parte das infecções humanas (50 – 90% das candidoses humanas). Considera-se a colonização do trato gastrointestinal e génito-urinário o foco de infecção mais importante das candidoses, mas, esta colonização também é benéfica para o hospedeiro, uma vez que não só limita a posterior colonização por fungos patogénicos oportunistas como também promove a resposta imunológica, prevenindo assim que o hospedeiro imunocompetente possa vir a sofrer de infecções sistémicas. (Ferreira e Sousa, 2000)

O tratamento destes tipos de afecções cutâneas é realizado por recurso a uma grande quantidade compostos como os antisépticos (tintura de iodo, ácido salicílico ou ácido benzóico) e/ou antifúngicos de diferentes classes químicas, nomeadamente, polienos, azóis (imidazóis e triazóis) e a alilaminas. (Lima *et al.*,2006)

A obrigatoriedade de prescrição médica, o custo dos medicamentos disponíveis, e a crescente procura de alternativas terapêuticas “naturais”, criaram a necessidade de pesquisar novos compostos. Além disso, o aumento significativo das resistências aos antifúngicos disponíveis no mercado obriga à descoberta de novas alternativas terapêuticas.

Cerca de metade dos medicamentos usados hoje em dia têm origem vegetal, isto porque ao longo de milhares de anos as diferentes sociedades e diferentes culturas foram desenvolvendo formas tradicionais de utilização medicinal das plantas. Actualmente, uma das formas mais agradáveis de desfrutar dos benefícios das plantas é através da aromaterapia, envolvendo assim a utilização de óleos essenciais extraídos de plantas normalmente por destilação com vapor de água. (Moura *et al.*,2006) No que respeita às infecções provocadas por fungos, o seu número tem vindo a evoluir significativamente, principalmente devido ao aumento dos grupos de risco e também ao aumento de casos de pessoas com problemas de imunossupressão, nomeadamente o aumento significativo dos casos de VIH/SIDA. (Pinto *et al* 2006)

OBJECTIVOS

2. OBJECTIVOS

Ao longo dos últimos anos, vários têm sido os estudos realizados sobre os efeitos das plantas aromáticas, nomeadamente em casos de afecções cutâneas. (Martínez *et al.*, 1996) Estes estudos têm como principal objectivo conhecer as propriedades e também as condições em que se podem usar as plantas aromáticas para que estas possam ser introduzidas no mercado como alternativa terapêutica em casos de resistência aos antifúngicos habituais. (Ellof, 1998)

É de conhecimento geral que na sua grande maioria as propriedades das plantas se devem aos seus óleos voláteis. (Duarte, 2006) No que respeita às infecções provocadas por fungos, o seu número tem vindo a evoluir significativamente, principalmente devido ao aumento dos grupos de risco e também ao aumento de casos de pessoas com problemas de imunossupressão, nomeadamente o aumento significativo dos casos de VIH/SIDA. (Pinto *et al.*, 2006)

Sabe-se também que muitas plantas possuem actividades antifúngica, mas a informação sobre esta actividade relativamente a fungos patogénicos para o homem é limitada. (Ellof, 1998)

Assim o objectivo deste trabalho é avaliar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de alguns óleos essenciais em *C. albicans* e *C. glabrata*. Os óleos essenciais testados que encontram disponíveis comercialmente foram os seguintes: Tomilho (*Thymus vulgaris thymoliferum*), Cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), Árvore Do Chá (*Melaleuca alternifolia*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), Óleo de Amêndoas Doces (*Olio di Mendorle Dolci*).

CANDIDOSES E SEU TRATAMENTO

CANDIDOSES

3. CANDIDOSES E SEU TRATAMENTO

3.1. CANDIDOSES

As infecções fúngicas provocadas por leveduras são as infecções mais frequentes nos humanos. A candidose é a conotação genérica para denominar as doenças provocadas por espécies de *Candida*, nomeadamente *C. albicans* e *C. glabrata*. (Henriques, 2008) Estas podem provocar candidoses cutâneas, sistémicas e alérgicas.

Apesar deste tipo de leveduras ser comensal do tubo digestivo dos Humanos, as candidoses têm vindo a aumentar significativamente, isto devido também ao aumento do número de imunodeprimidos, que também tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos tempos.

As candidoses mucocutâneas podem ser agudas ou crónicas. Dentro da candidoses mucocutâneas agudas temos as mais frequentes, que são as bucais e peribucais. As candidoses bucais (Figura 1) são caracterizadas pelo aparecimento de pequenas pápulas brancas, confluentes, muito aderentes e formando uma camada cremosa que pode cobrir a língua, o palato e a faringe. (Ferreira e Sousa, 2000) Mas para além dos locais referidos, podem também ser atingidos os cantos da boca, originando assim a tradicionalmente chamada boqueira, que se caracteriza pelo espessamento e fissura da comissura labial. Muito mais raramente aparecem casos de candidoses esofágicas, mas estas estão mais relacionadas com casos de indivíduos portadores de HIV. (Ferreira e Sousa, 2000)



Figura 1: Candidose da mucosa bucal. (Fonte: www.dermis.net (Consultado em 25 de Abril de 2009))

As candidose genitais são mais frequentes em mulheres, mas também pode afectar os homens e na sua grande maioria são provocadas por *C. albicans*. As candidoses têm-se tornado muito frequentes, muito devido ao uso excessivo de antibióticos, contraceptivos orais e outros medicamentos responsáveis por alterações das condições normais da vagina, muitas vezes por diminuições de pH ou por diminuição da flora normal desta zona, o que leva a uma maior facilidade da proliferação dos fungos. Nas mulheres, os sintomas deste tipo de infecção são um prurido ou irritação da vagina e um corrimento esbranquiçado, abundante e floculoso (Figura 2A). (Ferreira e Sousa, 2000) Nos homens, este tipo de infecção tem o nome de balanite e surge após contacto sexual com uma parceira infectada. Caracteriza-se pelo aparecimento de um eritema pruriginoso seguido de pequenas pústulas no sulco balano-prepucial podendo também ocorrer um corrimento mais ou menos abundante (Figura 2B). (Ferreira e Sousa, 2000)

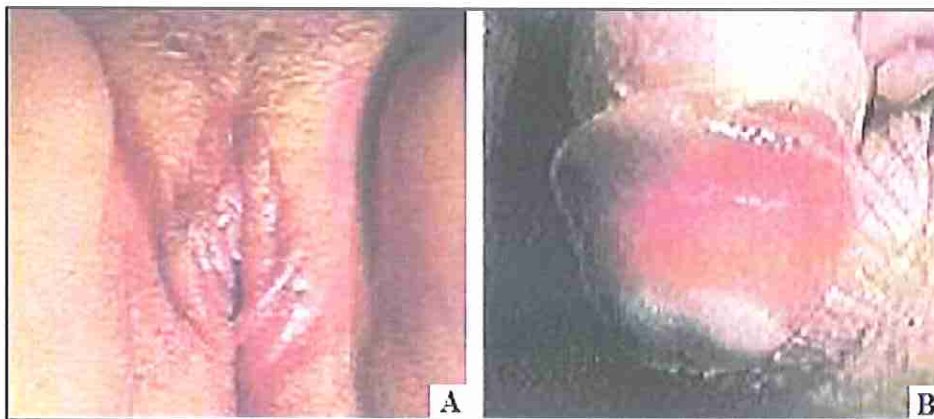


Figura 2: Candidose genital: **A)** Vulvovaginite; **B)** Balanite, lesão localizada no pénis. (Fonte: <http://br.geocities.com/maycon.silveira/paginas/index.htm>; Consultado em 25 de Abril de 2009)

Também a zona anal pode ser afectada por este tipo de infecções, caracterizando-se por um prurido intenso acompanhado por uma sensação de queimadura. As lesões apresentam-se circunscritas com a pele macerada, podendo invadir o sulco interglúteo.

No caso de infecções das unhas podemos ter perioníquia e oníquia. Estes dois tipos de lesão têm diferentes localizações, mas muito próximas. Nos casos de perioníquia (Figura 3 A)

há uma inflamação da pele periférica da unha que se encontra vermelha e brilhante, podendo esta inflamação ser mais ou menos dolorosa. O aparecimento deste tipo de lesões tem alguns factores predisponentes, que são essencialmente o sexo, alterações hormonais, e traumatismos diversos, nomeadamente no que respeita à manicure. É devido a este último facto que se observa muito pouco este tipo de lesões nos homens, sendo apenas frequentes em determinadas profissões, tais como pasteleiros, cozinheiros e trabalhadores das fábricas de conserva. (Ferreira e Sousa, 2000) Os casos de oníquia (Figura 3 B) caracterizam-se pela estriação progressiva, discromia e opacidade da lâmina da unha que por vezes se torna quebradiça. A onicólise aparece brusca e dolorosamente, provocando muitas vezes o deslocamento da unha. (Ferreria *et al.*, 2000)



Figura 3: Candidoses: A) Perioníquia; B) Oníquia. (Fonte: <http://www.dermis.net/dermisroot/en/home/index.htm> (Consultado em 25 de Abril de 2009))

O intertrigo, é uma outra forma de afecção cutânea provocada por *Candida* spp. e pode ocorrer em várias zonas do corpo, nomeadamente, mãos, pés (Figura 4), pregas submamárias (mulheres obesas), prega suprapúbica, virilhas e sulco interglúteo. Nas mãos e nos pés aparece como uma lesão eritemo-escamosa, exsudativa e pruriginosa, tratando-se de uma lesão bem delimitada periféricamente e onde normalmente a pele se encontra descolada. Nas restantes zonas, caracteriza-se pelo aparecimento de vesículas e pústulas, que por rotura originam pontos vermelhos exsudativos.

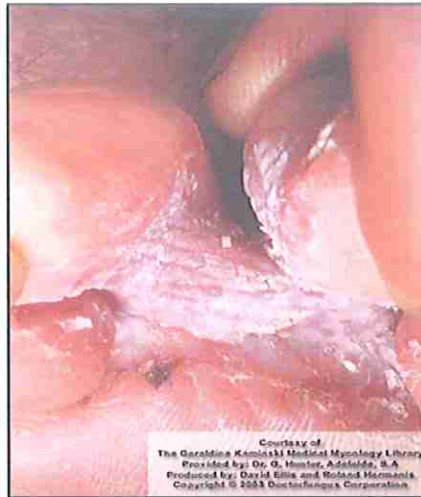


Figura 4: Candidose interdigital. (Fonte: http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl; Consultado em 25 de Abril de 2009)