

CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ
CURSO DE BIOMEDICINA

ANA LUÍZA PETRASSI BOTASSINI
LETÍCIA DOMINGUES CASTELANI
ROZILÉIA DA SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*
FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS.

Ribeirão Preto

2023

**ANA LUÍZA PETRASSI BOTASSINI
LETÍCIA DOMINGUES CASTELANI
ROZILÉIA DA SILVA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca
alternifolia* FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS.**

Trabalho de conclusão de curso de
Biomedicina do Centro Universitário Barão
de Mauá como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Denissani Ap.
Ferrari dos Santos Lima

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A963

Avaliação da eficácia do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a patógenos bacterianos/ Ana Luiza Petrassi Botassini; Letícia Domingues Castelani; Roziléia da Silva Santos - Ribeirão Preto, 2023.

40p.il

Trabalho de conclusão do curso de Biomedicina do Centro Universitário Barão de Mauá

Orientador: Dra. Denissani Aparecida Ferrari dos Santos Lima

1. Óleo de melaleuca 2. Inibição Antimicrobiana 3. Microdiluição I. Botassini, Ana Luiza Petrassi II. Castelani, Letícia Domingues III. Santos, Roziléia da Silva IV. Lima, Denissani Aparecida Ferrari dos Santos V. Título

CDU 616.9

Bibliotecária Responsável: Iandra M. H. Fernandes CRB⁸ 9878

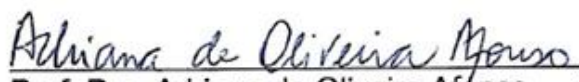
ANA LUÍZA PETRASSI BOTASSINI
LETÍCIA DOMINGUES CASTELANI
ROZILÉIA DA SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS.

Trabalho de conclusão de curso de
Biomedicina do Centro Universitário Barão
de Mauá como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Data de aprovação: 16/11/2023.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Adriana de Oliveira Afonso
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto


Prof. Me Antonio José Ipolito
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto


Profa. Dra. Denissani Ap. Ferrari dos Santos Lima
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto
Orientadora

Ribeirão Preto

2023

RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, conhecido como *tea tree*, é extraído das folhas dessa árvore nativa da Austrália e amplamente utilizado devido às suas propriedades antissépticas. É composto principalmente por terpenos, sendo o terpinen-4-ol seu principal componente ativo, responsável por suas propriedades analgésicas, cicatrizantes, anti-inflamatórias, antifúngicas e bactericidas. Este estudo visa avaliar a ação inibitória do óleo de *Melaleuca* em cinco cepas de patógenos bacterianos, sendo eles: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, e duas cepas fúngicas *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do óleo essencial contra esses microrganismos. As cepas foram preparadas a partir de culturas puras na escala de 0.5 de McFarland e o óleo de *Melaleuca* foi diluído em série. Os resultados obtidos foram: O TTO apresentou maior atividade inibitória contra alguns patógenos gram positivos, dentre eles *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* com CMI de 8 µL/mL e CMB de 8 µL/mL para ambos. *S. aureus* demonstrou uma CMI de 16 µL/mL e CMB de 16 µL/mL. As cepas fúngicas a *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram resultados de CMI de 8 µL/mL e a CMB de 8 µL/mL. De modo geral, o TTO em diferentes concentrações inibiu o crescimento dos microrganismos, demonstrando maior concentração para duas cepas bacterianas, o *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* com CMI 32 µL/mL e CMB de 32 µL/mL. Espera-se que o presente estudo possa contribuir para o conhecimento da eficácia do óleo de *Melaleuca* como agente antimicrobiano e seu potencial uso terapêutico no combate a infecções bacterianas e fúngicas.

Palavras-chave: eficácia; *Melaleuca alternifolia*; inibição antimicrobiana.

ABSTRACT

Melaleuca alternifolia essential oil, known as *tea tree*, is extracted from the leaves of this tree native to Australia and is widely used due to its antiseptic properties. It is mainly composed of terpenes, with terpinen-4-ol being its main active component, responsible for its analgesic, healing, anti-inflammatory, antifungal and bactericidal properties. This study aims to evaluate the inhibitory action of Melaleuca oil on five strains of bacterial pathogens, namely: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, and two fungal strains *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The broth microdilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the essential oil against these microorganisms. Strains were prepared from pure cultures on the 0.5 McFarland scale and Melaleuca oil was serially diluted. The results obtained were: TTO showed greater inhibitory activity against some gram-positive pathogens, including *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* with MIC of 8 μ L/mL and CMB of 8 μ L/mL for both. *S. aureus* demonstrated a MIC of 16 μ L/mL and CMB of 16 μ L/mL. The fungal strains *C. albicans* and *C. tropicalis* showed MIC results of 8 μ L/mL and CMB of 8 μ L/mL. In general, TTO at different concentrations inhibited the growth of microorganisms, demonstrating a higher concentration for two bacterial strains, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* with MIC 32 μ L/mL and CMB 32 μ L/mL. It is expected that the present study can contribute to the knowledge of the effectiveness of Melaleuca oil as an antimicrobial agent and its potential therapeutic use in combating bacterial and fungal infections.

Keywords: effectiveness; Melaleuca alternifolia; antimicrobial inhibition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Melaleuca alternifolia</i>	8
Figura 2-	Esquema explicativo utilizado para a pesquisa da CMI	20
Figura 3-	Microdiluições de <i>S. aureus</i> .	23
Figura 4-	Microdiluições de <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 5-	Microdiluições de <i>C. tropicalis</i>	24
Figura 6-	Ação bactericida em <i>S. aureus</i>	25
Figura 7-	Ação bactericida em <i>S. pyogenes</i>	25
Figura 8-	Ação bactericida em <i>C. tropicalis</i>	25
Figura 9-	Ação bactericida em <i>E. faecalis</i>	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais componentes do óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i>	9
Tabela 2-	Diluições do Óleo Essencial utilizadas no Teste da CIM (µL/mL)	20
Tabela 3-	Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) (µg/mL) do TTO	22
Tabela 4-	Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) (µg/mL) do TTO	23
Tabela 5-	Valores de Concentração Mínima Bactericida (CMB) (µg/mL) do TTO	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Microrganismos avaliados	9
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.1.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
1.1.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
1.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.1.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	12
1.1.6 <i>Candida albicans</i>	12
1.1.7 <i>Candida tropicalis</i>	13
1.2 Metodologias aplicadas para avaliação da inibição bacteriana	14
1.3 Microdiluição em caldo	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivo específico	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Cepas Utilizadas	18
4.2 Método de microdiluição em caldo	18
4.2.1 Preparo da solução estoque de óleo essencial	18
4.2.2 Preparação do inóculo	18
4.2.3 Preparo das placas de microtitulação	19
4.4.4 Teste de ação bactericida	21
4.4.5 Armazenamento dos dados	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Atividade antimicrobiana do TTO por microdiluição em caldo	22
5.2 Atividade bactericida do TTO por diluição seriada em placa	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXO A – Declaração de pureza do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	36
ANEXO B – Análise da cromatografia gasosa de óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	37

1 INTRODUÇÃO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também conhecido como *tea tree* (árvore do chá) da família Myrtaceae. É um óleo amarelo, extraído por arraste de vapor das folhas e ramos terminais da árvore, que é nativa da Austrália e muito cultivada na Europa (Figura 1). Foi incluído nos kits militares de primeiros socorros, durante a Segunda Guerra Mundial para tratar ferimentos de soldados por conta de suas propriedades, principalmente antissépticas e continua sendo muito usado como tratamento alternativo em todo o mundo, tanto o óleo puro quanto como componente ativo em diversos produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Figura 1- *Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae



Fonte: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-tea-tree-melaleuca/>

A composição do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) é de hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados. De acordo com a ISO 4730-2004, o controle de qualidade por cromatografia gasosa, especifica certas características do TTO (Tabela 1), como apresentar mais de 30% de terpinen-4-ol, menos de 15% de 1,8-cineole, de 10 a 28% de gama-terpineno e 0,5 a 12% de p-cimeno, para o quimiotipo terpinen-4-ol, comum no Brasil e Austrália (CARSON *et al.*, 2006).

Na literatura o TTO tem ação comprovada como analgésico, cicatrizante, anti-

inflamatório, antifúngico e bactericida. Essas atividades são atribuídas ao principal componente do óleo, o terpinen-4-ol, um monoterpene, sendo o principal mediador da atividade de tratamento “*in vitro*” e “*in vivo*”. Segundo Carson *et al.* (2006), o mecanismo de ação bactericida consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, consequente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração (CARSON *et al.*, 2006; FELIPE *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).

Tabela 1- Principais componentes do óleo de *Melaleuca alternifolia*

Componentes	ISO 4730	Valor medido
Alpha-Pinene	1.0 – 6.0 %	2.6 %
Sabinene	≤ 3.5 %	0.3 %
Alpha-Terpinene	5.0 – 13.0 %	10.4 %
Limonene	0.5 – 4.0 %	0.9 %
1,8-Cineole	≤ 15.0 %	2.1 %
Gamma-Terpinene	10.0 – 28 %	21.9 %
Para-Cymene	0.5 – 12.0 %	2.8 %
Terpinolene	1.5 – 5.0 %	3.7 %
Terpinen-4-ol	≥ 30.0 %	44.7 %
Aromadendrene	≤ 7.0 %	0.4 %
Alpha-Terpineol	1.5 – 8.0 %	2.3 %

Fonte: Frey & Lau (Pharma Special)

1.1 Microrganismos avaliados

Tendo em vista sua importância e utilização como alternativa natural e promissora contra doenças bacterianas e fúngicas que apresentam resistência a medicamentos convencionais, este estudo experimental avaliará a eficácia do TTO contra 5 cepas de patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* e duas cepas fúngicas *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

S. aureus, *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* são comumente encontrados em infecções de trato respiratório superior. As cepas fúngicas *C. albicans* e *C. tropicalis* causam com frequência micose de unha, onde o TTO tem diversas aplicações como

solução do produto e esmalte base para unhas, para tratamento da micose.

1.1.1 *Staphylococcus aureus*

São cocos gram positivos, pertencente à família das Micrococacea, gênero *Staphylococcus spp*, tem apresentação celular individual ou em pares, cadeias curtas ou ainda agrupados.

O *S. aureus* apresenta mecanismos para provocar danos no hospedeiro, através de proteínas extracelulares denominadas enterotoxinas. Essas toxinas são responsáveis pela intoxicação alimentar, choque tóxico e a síndrome da pele escaldada (FARIA, 2008; LIMA *et al.*, 2015).

As colônias em placa possuem presença de pigmento e podem apresentar hemólise em Ágar Sangue de Carneiro, auxiliando na identificação. São anaeróbios facultativos, não produtores de esporos e produtores de catalase. Estruturalmente são bactérias encapsuladas, produzem toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas, entre outras), além de produção de coagulase e nuclease. O teste de coagulase é utilizado como diferencial para os *Staphylococcus* coagulase positivas (CoPS), apesar de haver relatos de *Staphylococcus aureus* coagulase negativa (CoNS) em vários países, inclusive no Brasil (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

S. aureus colonizam a cavidade nasal de cerca de 30% da população humana, porém são também reconhecidos como importantes patógenos, podendo causar desde infecções de pele e tecidos moles relativamente benignas (como furunculose, impetigo e foliculite) até infecções mais invasivas como bacteremias, pneumonias, osteomielite e endocardite (TONG *et al.*, 2015). Estão associados tanto a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) como a infecções comunitárias, que acometem indivíduos saudáveis da comunidade, sem fatores de risco clássicos para aquisição de infecções nosocomiais (SADA; FUKUDA; ISHIMARU, 2017).

1.1.2 *Streptococcus pyogenes*

Esta espécie é cocos gram positivo e pertence ao grupo A de Lancefield, formam colônias β -hemolíticas, com vários fatores de virulência. Habita a garganta e a pele de portadores saudáveis e é transmitida de pessoa a pessoa pelo ar através da expulsão de gotas de saliva ao falar, tossir ou espirrar. Podem causar faringites, infecções respiratórias, impetigo, erisipela, endocardites, meningites e artrites. Infecções por cepas produtoras de toxinas podem causar a febre escarlatina e choque tóxico (KONEMAN, 2001).

1.1.3 *Streptococcus pneumoniae*

São cocos gram positivo e um microrganismo exigente sob o ponto de vista nutricional, além de sensível ao calor e frio. A via de transmissão é aérea, por meio de gotículas de saliva de portadores, eliminadas principalmente durante a tosse ou espirro. A doença ocorre quando a resistência do hospedeiro está diminuída, após uma infecção viral prévia ou após a aquisição de uma cepa mais virulenta, seguida por alterações da microbiota. As doenças pneumocócicas são mais prevalentes no outono, inverno e primavera (KONEMAN, 2001).

Comumente encontrado na mucosa da nasofaringe e orofaringe de indivíduos saudáveis, é o patógeno bacteriano mais comum em casos de otite média aguda e pneumonia, e segundo mais importante em casos de meningite em crianças menores de 2 anos. Todas as faixas etárias, gêneros e etnias humanas são susceptíveis às doenças por pneumococo. Entretanto são altamente susceptíveis os indivíduos com imaturidade ou alguma forma de comprometimento do sistema imunológico, como os muito jovens e os idosos (KONEMAN, 2001).

1.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilo gram negativo não fermentador e pode ser isolada em terra, água, plantas e animais, incluindo o homem, colonizando preferencialmente o períneo, as axilas e os ouvidos (MURRAY *et al.*, 1999). Como apresenta ampla tolerância às

condições físicas adversas e uma relativa resistência a antimicrobianos, desempenha importante papel como patógeno oportunista (BALLOWS *et al.*, 2001).

Em hospitais, este o microrganismo é encontrado frequentemente em pias, soluções antissépticas e receptáculos de urina. A transmissão para pacientes por profissionais da área da saúde pode ocorrer especialmente nos casos de queimadura e em unidades de tratamento intensivo (UTI) neonatais, a menos que práticas de controle de infecção sejam rigorosamente seguidas.

Infecções por *P. aeruginosa* podem se desenvolver em muitos locais anatômicos, incluindo pele, tecido subcutâneo, ossos, orelhas, olhos, trato urinário, pulmões e valvas cardíacas. O local varia com a porta de entrada e a vulnerabilidade do paciente (BALLOWS *et al.*, 2001).

1.1.5 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus spp. são cocos gram positivos, dispersos em pares e cadeias curtas, anaeróbios facultativos e as colônias, em geral, não apresentam hemólise, sendo necessário fazer testes fenotípicos para diferenciar as espécies de *Enterococcus*.

São microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas e que causam infecções em pacientes hospitalizados. Geralmente ficam localizados no trato gastrointestinal, mas também podem ser encontrados em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina. A maior parte das infecções causados por *E. faecalis* começa da microbiota normal do paciente, embora também ocorra a contaminação pessoa-pessoa ou através de água e alimentos contaminados (HÖRNER *et al.*, 2005).

Devido ao seu potencial de resistência, tem sido despertada a ânsia por novas alternativas de medicamentos, tendo os efeitos terapêuticos favoráveis em pesquisas sendo a maioria originada de extrato natural, como por exemplo, o TTO (EPIFÂNIO *et al.*, 2022).

1.1.6 *Candida albicans*

O gênero *Candida sp* possui mais de 163 espécies e causam infecções primárias e secundárias relatados por espécies diferentes (FERREIRA, 2017). A sua

morfologia é caracterizada como espesso, semelhante a coalhada de cor branco-amarelado, eram consideradas como contaminantes de ambiente e de pouca importância clínica, sendo agora conhecida como agentes infecciosos oportunistas causadoras de infecções disseminadas e graves.

Essas leveduras são facilmente isoladas na pele, no trato gastrointestinal e geniturinário de humanos. Esse tipo de microrganismo vive de forma comensal, ou seja, existindo em equilíbrio com a microbiota humana e depende de condições específicas para desenvolver a candidíase, por ser um microrganismo oportunista. Como indivíduos com imunodeficiência, dentre eles os idosos, os bebês, pacientes oncológicos, AIDS, transplantados, indivíduos cujo tratamento utiliza cateteres (na nutrição parenteral ou na hemodiálise), indivíduos submetidos a terapias baseadas em antimicrobianos de grande espectro como os corticoides, diabéticos e indivíduos que fazem dietas com açúcares. Todos esses fatores possibilitam a ativação do fator de virulência e sua disseminação no hospedeiro (FELIPE *et al.*, 2018).

Candida albicans tem diversas formas clínicas, incluindo micoses cutâneas (unhas, peles e mucosas), candidíase mucocutânea crônica, infecção de corrente sanguínea, endocardite, meningite, peritonite, gastroenterite, endoftalmite, infecção de suprarrenais e pneumonia é raramente. Mais de 60% das infecções são causadas por *Candida albicans* (FERREIRA, 2017).

1.1.7 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é o principal patógeno envolvido nas infecções disseminadas em pacientes imonocomprometidos. Cerca de 10% das infecções fúngicas em unidades de terapia intensiva de neonatos são causadas por *Candida tropicalis* (FERREIRA, 2017).

Essa capacidade de virulência está relacionada à capacidade de formação de biofilme e sua mudança fenotípica, ou seja, mudar da forma filamentosa para leveduriforme significando invasão tecidual.

Segundo Felipe *et al.*, 2018, as classes de medicamentos disponíveis para o tratamento de infecção fúngica, causam diversos efeitos colaterais como nefrotoxicidade (especialmente na administração de anfotericina), náusea/vômito e dor de estômago estão entre os principais efeitos. Outro grande desafio é o decorrente do uso indiscriminado de antifúngicos ou de terapias antifúngicas prolongadas,

causando refratariedade aos medicamentos tradicionalmente utilizados e favorecendo a seleção natural de cepas de *Candida spp* resistentes.

1.2 Metodologias aplicadas para avaliação da inibição bacteriana

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo teste, esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998 (OSTROSKY *et al.*, 2008).

As variações referentes à determinação da CMI (Concentração Mínima Inibitória) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL *et al.*, 2004).

1.3 Microdiluição em caldo

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que

outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente.

Karaman *et al.* (2003) utilizaram a técnica para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Juniperus oxycedrus* dissolvido em DMSO 10%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos microrganismos. A técnica descrita por Zogda e Porter (2001) foi adaptada, dispensando-se 95 µL de caldo nutriente e 5 µL de inóculo em cada poço. No primeiro foi então adicionado 100 µL de extrato de *J. oxycedrus* preparado inicialmente na concentração de 500 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração, resultando na diluição de até 7,8 µg/mL. No último poço não se adicionou o inóculo e o extrato, a fim de se ter um controle negativo. O crescimento microbiano foi determinado por leitura no espectrofotômetro a 600 nm.

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho justifica-se, primeiramente, para a contribuição e orientação do uso controlado e eficaz do referido óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em processos antimicrobianos na necessidade de acelerar o sistema imunológico contra diferentes bactérias e de identificar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) em algumas cepas bacterianas e fúngicas por microdiluição em placa.

3 OBJETIVOS

Neste trabalho será analisado a eficácia e ação do óleo de *Melaleuca alternifolia*, tendo em vista sua importância e utilização como alternativa natural contra patógenos.

3.1 Objetivo geral

Analisar a eficácia do óleo de Melaleuca como inibidor de crescimento de microrganismos.

3.2 Objetivo específico

Avaliar a eficácia do óleo essencial frente a microrganismos patogênicos, utilizando a microdiluição em caldo;

Determinar a atividade bactericida da ação do óleo utilizando difusão em placas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental, de caráter quantitativo e qualitativo, no período de maio a setembro de 2023 no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto. Este laboratório oferece todos os equipamentos e condições para a realização do experimento.

4.1 Cepas Utilizadas

Serão utilizadas para a pesquisa de atividade da CIM e atividade bactericida amostras de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC) *Candida albicans*, *Candida tropicalis*.

4.2 Método de microdiluição em caldo

Segue abaixo a descrição do método de microdiluição em caldo.

4.2.1 Preparo da solução estoque de óleo essencial

Empregou-se o método de microdiluição em caldo, descrita pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) para o teste de Concentração Mínima inibitória (CMI), como demonstrada na tabela 2, para os óleos essenciais.

Foi utilizado do 1mL do óleo de *Melaleuca alternifolia* de origem australiana pelo fabricante Frey & Lau de lote 1252549, em 7 mL de DMSO para preparar a solução estoque, resultando na concentração de 64 µL/mL. A solução foi preparada imediatamente antes do uso e mantida sob refrigeração até o momento da manipulação.

4.2.2 Preparação do inóculo

As amostras dos microrganismos testados foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento foi verificado a pureza da cultura para o preparo das suspensões que foram utilizadas.

A suspensão inicial do inóculo foi preparada em 2 mL de salina estéril com a bactéria a ser testada. Após homogeneização da suspensão de tubos, a concentração do inóculo foi verificada através da aferição da turbidez, utilizando turbidímetro, que corresponde à escala 0,5 de turbidez McFarland (Brcast, 2022).

Este processo foi realizado para todos os microrganismos testados.

4.2.3 Preparo das placas de microtitulação

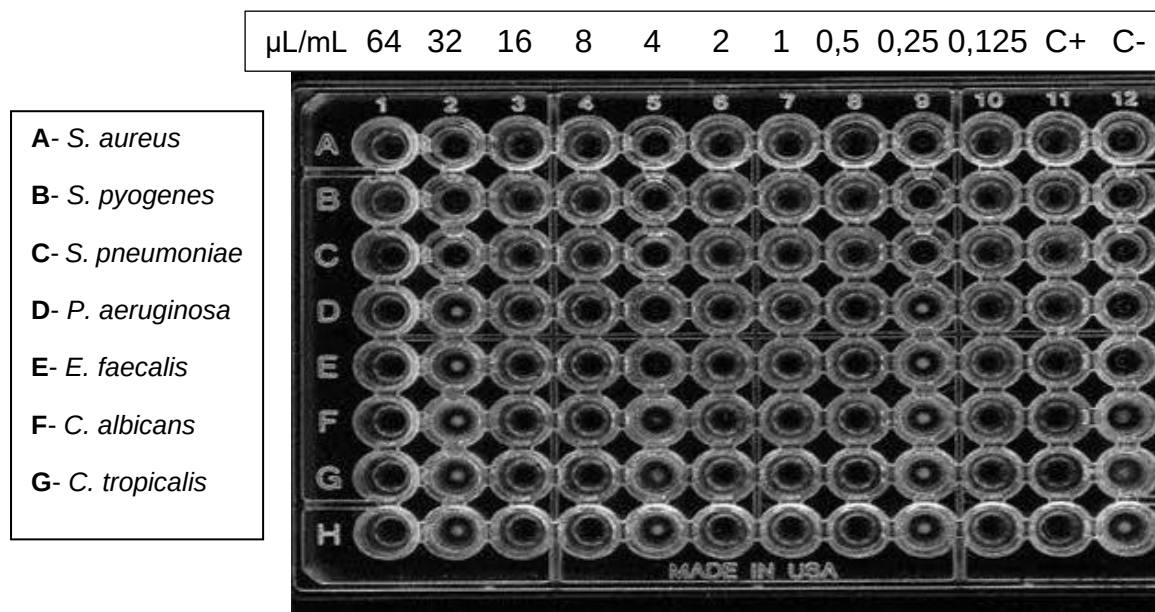
O teste de microdiluição em caldo para cada amostra bacteriana foi realizado em triplicata, para garantir a reprodutibilidade dos testes e assim como seus resultados.

Utilizamos placas de microtitulação de 96 orifícios (Figura 2). Em cada orifício da placa foi colocado um volume total de 210 μL , sendo 100 μL preenchidos com meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI), 10 μL com o inóculo bacteriano previamente preparado na escala 0,5 de McFarland em salina estéril e 100 μL do óleo essencial em diferentes diluições (Tabela 2).

Os orifícios da coluna 11 e 12 foram utilizados para controle positivo e negativo, respectivamente. Os orifícios da coluna 11 continham o caldo BHI inoculado com o microrganismo, já os orifícios da coluna 12, continham apenas caldo BHI e o óleo essencial (SANTOS, 2009).

Foi realizado controle de esterilidade do óleo essencial, do DMSO, dos meios de cultura utilizados, assim como a pureza das amostras empregadas no teste.

Figura 2- Esquema explicativo utilizado para a pesquisa da CMI



Microrganismo orifícios de 1 – 12. Orifícios 11 e 12 controles positivo e negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2- Diluições do Óleo Essencial utilizadas no Teste da CMI ($\mu\text{L/mL}$)

Diluições do Óleo Essencial utilizadas no Teste da CMI ($\mu\text{L/mL}$)										
Concentração Final nos Poços										
Diluições	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu\text{L/mL}$	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

Fonte: Dados da pesquisa.

Concluído o preenchimento da placa, ela foi incubada em estufa bacteriológica por 24 horas a 36°C. Após este período as placas foram lidas de forma visual.

A leitura da placa foi feita verificando em qual dos poços houve turvação para cada tipo de microrganismo, e foi marcado o primeiro poço não turvo como a concentração mínima inibitória.

4.4.4 Teste de ação bactericida

Para garantir a ação inibitória do óleo, foi realizado o teste de ação bactericida. Para tanto, foi realizada semeadura de todas as diluições feitas na placa de microtitulação para cada microrganismo após incubação, inclusive os controles positivos e negativos, em placa de meio de cultura ágar sangue. Após semeadas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas e após este período foi realizada a verificação do crescimento. Realizamos esta leitura com 24, 48 e 72 horas a fim de verificar alteração na CBM.

4.4.5 Armazenamento dos dados

Todos os dados foram armazenados em tabelas no formato EXCEL para serem analisados no final do experimento.

5 RESULTADOS

Neste trabalho, utilizamos o método de microdiluição em caldo em placa de microtitulação de 96 poços, onde as concentrações do TTO foram de 0,125 µL/mL, 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL, 2 µL/mL, 4 µL/mL, 8 µL/mL, 16 µL/mL, 32 µL/mL e 64 µL/mL.

A tabela 3 demonstra a comparação dos resultados da CMI e da CMB das cinco cepas bacterianas e duas cepas fúngicas utilizadas no estudo, onde foi possível observar que o TTO teve CMI e CMB 32 µL/mL com o *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para a *C. albicans* e *C. tropicalis*, a CMI foi de 8 µL/mL para ambas e CMB foi de 8 µL/mL.

Tabela 3- Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) (µL/mL) do TTO

Microrganismo	CMI (µL/mL)	CMB(µL/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	32
<i>Candida albicans</i>	8	8
<i>Candida tropicalis</i>	8	8

Fonte: Dados da pesquisa

5.1 Atividade antimicrobiana do TTO por microdiluição em caldo

A tabela 4 demonstra a CMI das cinco cepas bacterianas e duas cepas fúngicas utilizadas no estudo. De modo geral, o TTO inibiu o crescimento dos microrganismos nas seguintes concentrações: *Staphylococcus aureus* com CMI 16 µL/mL (figura 3), *Streptococcus pyogenes* com CMI 8 µL/mL, *Streptococcus pneumoniae* com CMI 8 µL/mL, *Enterococcus faecalis* com CMI 32 µL/mL, *Pseudomonas aeruginosa* com CMI 32 µL/mL como demonstrado na figura 4, *Candida albicans* com CMI 8 µL/mL e

Candida tropicalis com CMI 8 µL/mL (figura 5), o *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 4 - Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) (µL/mL) do TTO

Patógenos	Diluições (µL/mL)											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	+	-
<i>S aureus</i>												
<i>S pyogenes</i>												
<i>S pneumoniae</i>												
<i>P aeruginosa</i>												
<i>E faecalis</i>												
<i>C albicans</i>												
<i>C tropicalis</i>												

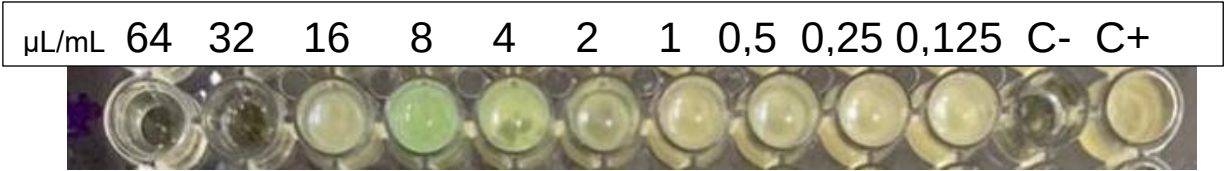
Fonte: Dados da pesquisa. Onde ocorreu crescimento do microrganismo

Figura 3- Microdiluições de *S. aureus*



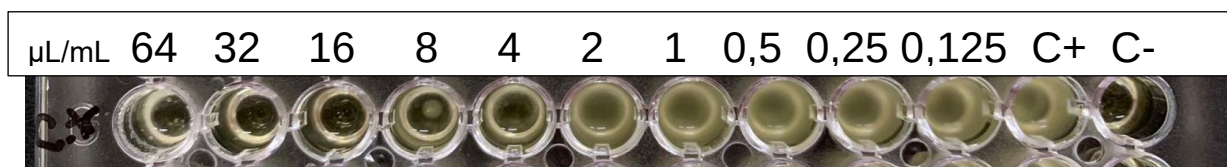
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4- Microdiluições de *P. aeruginosa*



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5- Microdiluições de *C. tropicalis*



Fonte: Dados da pesquisa

5.2 Atividade bactericida do TTO por diluição seriada em placa

A tabela 5 demonstra a CMB das cinco cepas bacteriana e duas cepas fúngicas utilizadas no estudo. Desse modo, a ação bactericida do TTO ocorreu nas seguintes concentrações: *Staphylococcus aureus* com CMB 16 µL/mL (figura 6), *Streptococcus pyogenes* com CMB 8µL/mL (figura 7), *Streptococcus pneumoniae* com CMB 8 µL/mL. Na figura 9 o *Enterococcus faecalis* com CMB 32 µL/mL, *Pseudomonas aeruginosa* com CMB 32 µL/mL, *Candida albicans* com CMB 8µL/mL e *Candida tropicalis* demonstrado na figura 8 com CMB 8 µL/mL.

Tabela 5- Valores de Concentração Mínima Bactericida (CMB) (µL/mL) do TTO

Patógenos	Diluições (µL/mL)											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	+	-
<i>S aureus</i>												
<i>S pyogenes</i>				■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>S pneumoniae</i>					■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P aeruginosa</i>					■	■	■	■	■	■	■	■
<i>E faecalis</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C albicans</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C tropicalis</i>					■	■	■	■	■	■	■	■
					■	■	■	■	■	■	■	■

Fonte: Arquivo pessoal. Onde ocorreu crescimento do microrganismo



Figura 6 – Ação bactericida de *S. aureus*



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7- Ação bactericida de *S. pyogenes*



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8 - Ação bactericida em *C. tropicalis*



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 9 - Ação bactericida em *E. faecalis*



Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

O tratamento de infecções com antimicrobianos é o padrão-ouro, porém, o uso indiscriminado levou ao aumento de resistência para vários microrganismos. A sinergia da terapia com antibióticos ou fungicidas tradicionais e TTO podem exercer boa suscetibilidade no combate aos microrganismos, através dos seus compostos incluindo monoterpenos e sesquiterpenos com forte atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos resistentes a terapias tradicionais (AMORESE *et al.*, 2018).

No estudo Cox *et al.*, (2000), investigou a composição química do TTO e o mecanismo de suas atividades antimicrobianas para a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*. A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa identificou o terpinen-4-ol como o componente individual mais abundante, representando aproximadamente 23% do TTO. Esse estudo demonstrou que a CMI para o *S aureus* foi de 0,25% (v/v) e a CMB DE 0,5% (v/v), estes dados indicaram que o TTO produziu efeitos antimicrobianos ao comprometer a membrana celular, resultando na perda do citoplasma e em danos às organelas, o que leva à morte celular. Neste trabalho a cepa bacteriana de *S aureus* apresentou uma CMI 16 µL/mL e CMB de 16 µL/mL, após 24 horas de incubação a 37°C, inibindo o microrganismo.

No estudo feito por Jakub *et al.*, (2009), a CMI foi de 0,125% e CMB mais alta foi de 1%. Portanto, o TTO é uma promissora alternativa para tratamento de infecções contra a cepa de *Staphylococcus aureus*, matando e eliminando a formação de biofilme em uma concentração de até 1%, enquanto as preparações comercialmente disponíveis são de até 10%.

Jakub *et al.*, (2009), também afirma que TTO pode ser uma arma nova, barata e eficaz para combater infecções por *Staphylococcus aureus*, incluindo MRSA.

Em pesquisa realizada por Crispim e Lacerda (2014), utilizando *S pyogenes* foi obtida uma solução com concentração de 8% do óleo essencial de Melaleuca, e a partir da mesma, foi feito um processo de diluição seriada, onde as concentrações do TTO foram de 8%, 25%, 50% e 100%. Para se obter os resultados finais, foi feito o teste de disco-difusão, onde os discos impregnados com as concentrações de TTO foram fixados na placa de Ágar Mueller Hinton. Nesse caso, houve crescimento do *Streptococcus pyogenes* na concentração de 8% e 25%, e a inibição ocorreu na concentração de 50% e 100%. Após as análises, da ação do TTO contra a bactéria

Streptococcus pyogenes, foi observado na CMI de 8 μ L/mL, e a CMB de 8 μ L/mL, neste presente trabalho.

A inibição do crescimento do *Streptococcus pneumoniae* neste estudo demonstrou uma CMI de 8 μ L/mL e a CMB 8 μ L/mL. No estudo feito por Inouye, Takizawa, Yamaguchi *et al.*, (2001) foram preparadas várias diluições do óleo de melaleuca ou de seu constituinte, terpinen-4-ol, dissolvido em acetato de etila: 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 e 7,8 mg/mL. Também foi feito um segundo experimento somente com o óleo puro nas seguintes concentrações: 800, 400, 200, 100, 50mg/L. Parte dessas soluções foram impregnadas em papel de filtro embebido em acetato de etila, que foi escolhido como solvente por ser menos tóxico que os outros tipos de solventes. Após as análises dos resultados, a CMI do óleo de melaleuca puro foi de 50mg/L e a do terpinen-4-ol foi de 25mg/mL.

No estudo feito por Mumu (2017), foi determinado o percentual do poder de inibição do óleo de melaleuca contra o *S. pneumoniae*, onde os resultados das primeiras seis horas de incubação foram de 99,25% e depois de vinte e quatro horas foi de 100%. Também foi feito o método disco difusão para comparar a zona de inibição criada pelo TTO e por antibióticos de controle, nesse caso, foi formada uma zona 19 mm ao redor do disco com o 50 μ L de TTO. Outra comparação foi feita com o TTO e os antibióticos convencionais, onde a zona de inibição ao redor do TTO foi de 17,6mm.

Enterococcus faecalis, neste presente trabalho foi possível determinar a CMI e a CMB da bactéria que foram, respectivamente, 32 μ L/mL e 32 μ L/mL.

No trabalho feito por Epifânio, Maekawa, Mata (2022), também foi utilizado o método de microdiluição em caldo em microplaca com 96 poços, e as concentrações finais do óleo nos poços foram de 22,5%; 11,25%; 5,62%; 2,8%; 1,4%; 0,7%, sendo essa a menor concentração. Dessa forma, foi definida a Concentração Mínima Bactericida capaz de impedir o crescimento microbiano. Frente aos resultados, pode-se observar que o óleo essencial de melaleuca inibiu o crescimento bacteriano somente na concentração de 22,5%, demonstrando crescimento da bactéria nas demais concentrações testadas.

Pseudomonas aeruginosa demonstrou menor suscetibilidade ao TTO em comparação com outras espécies bacterianas, essa resistência está envolvida com a permeabilidade da membrana externa da bactéria, impedindo a entrada dos

componentes bactericidas do TTO, sendo assim, a resistência espontânea é mais provável de ocorrer. Neste trabalho apresentou CMI 32 $\mu\text{L/mL}$ e CMB 32 $\mu\text{L/mL}$, indicando que a integridade da membrana celular foi comprometida pelo tratamento com TTO ou alguns de seus principais componentes.

Segundo Chelsea *et al.*, (2004), indicou que a despolarização das membranas celulares com desacoplador CCCP (protonoforo carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona) sensibilizou os organismos à norfloxacin, possivelmente por inibir a função das bombas de efluxo. E a adição de 0,25% de TTO às células pré-tratadas com CCCP teve boa sinergia e resultou em uma morte de 3 log 10 após 4 h, em comparação com uma morte de 0,7 log10 com 0,25% de TTO sozinho.

O aumento da suscetibilidade do TTO contra *Pseudomonas aeruginosa*, está diretamente relacionado com a permeabilidade da membrana celular, podendo envolver sistemas de efluxo e sinergia de antibióticos tradicionais com o TTO (CHELSEA *et al.*, 2004).

Oliveira *et al.*, (2011) relatou que *Pseudomonas aeruginosa* coletadas de lesões endodônticas apresentaram baixa resistência ao TTO de 2,0%.

A concentração mínima inibitória (CMI) de 8 $\mu\text{L/mL}$ para ambas as cepas fúngicas é particularmente notável, pois sugere que o TTO é eficaz em concentrações relativamente baixas. Isso pode ser vantajoso na prática clínica.

Além da CMI, os resultados também indicam o Concentração mínima bactericida (CMB) de 8 $\mu\text{L/mL}$ para *C. albicans* e 8 $\mu\text{L/mL}$ para *C. tropicalis*. Isso significa que o TTO não apenas inibiu o crescimento dessas cepas, mas também foi capaz de eliminar efetivamente esses microrganismos em concentrações um pouco mais elevadas. Essa capacidade de eliminar as cepas é fundamental para garantir a erradicação completa da infecção.

No entanto, é importante lembrar que a eficácia do TTO pode variar dependendo da cepa e das condições específicas do ambiente em que a infecção ocorre. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para avaliar a eficácia do TTO em diferentes cenários clínicos e contra uma variedade de cepas de *Candida spp.*

Além disso, estudos futuros podem explorar os mecanismos subjacentes à atividade antimicrobiana do TTO, bem como sua segurança e tolerabilidade em seres humanos. Isso pode abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos mais direcionados e eficazes para infecções fúngicas, oferecendo uma alternativa valiosa

aos tratamentos convencionais, muitas vezes associados a efeitos colaterais adversos.

O estudo de Correa *et al.*, (2020) aborda a incorporação do óleo de Melaleuca em um creme muco cutâneo, destacando sua atividade antimicrobiana. Isso pode ser relevante para compreender como o TTO pode ser formulado em produtos de cuidados pessoais.

O trabalho de Nakao *et al.*, (2020) investiga a atividade antimicrobiana dos óleos de gengibre e Melaleuca contra *Candida albicans*, oferecendo informações sobre a eficácia do TTO em comparação com outros óleos essenciais.

Camargo Matos e Cruz (2018) compararam a atividade antimicrobiana do óleo de Melaleuca com conservantes químicos em bases cosméticas. Isso pode ajudar a avaliar se o TTO é uma alternativa mais natural e eficaz para a preservação de produtos cosméticos.

Além disso, os estudos de Savani *et al.*, (2021) e Lima (2022) examinaram a atividade antifúngica do TTO contra *Candida albicans*, contribuindo para a compreensão de como esse óleo pode ser usado no tratamento de infecções fúngicas.

Bona (2017) investigou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de outra planta, o *Psidium salutare*, contra *Candida albicans*, demonstrando a diversidade de óleos essenciais com potencial antimicrobiano.

Por fim, o estudo de Monteiro (2015) abordou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de maneira geral, fornecendo um contexto mais amplo sobre o potencial desses compostos na inibição de microrganismos.

Portanto, esses estudos em conjunto sugerem que o óleo de Melaleuca (TTO) possui atividade antimicrobiana significativa, especialmente contra *Candida spp*, o que pode ter implicações importantes na formulação de produtos de cuidados pessoais e tratamento de infecções fúngicas. Além disso, eles destacam a importância de considerar alternativas naturais, como o TTO, em comparação com conservantes químicos em produtos cosméticos e farmacêuticos.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados do presente estudo, destacamos a eficácia da ação antimicrobiana, que revelam que os níveis inibitórios mínimos do *tea tree* inibem o crescimento das cepas utilizadas nesse estudo.

Apesar da diferença nas concentrações inibitórias dos óleos de melaleuca encontrados em nosso estudo e na literatura, podemos verificar que nosso experimento demonstrou concentrações semelhantes ao encontrado por outros autores inibindo o crescimento de microrganismos.

O emprego deste óleo essencial foi demonstrado em várias fontes da literatura, como em soluções, emulsões e até usado puro, desta forma a pesquisa atual e futura pode ter um forte impacto na saúde pública, com terapias que podem ser adotadas para superar a resistência aos antibacterianos e tem implicações significativas para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para infecções fúngicas, dada a crescente escassez de medicamentos e, particularmente, de novas alternativas para tratamento.

REFERÊNCIAS

- AMORESE, V.; DONADU, M.; USAI, D.; SANNA, A.; MILIA, F.; PISANU, F.; MOLICOTTI, P.; ZANETTI, S.; DORIA, C. In vitro activity of essential oils against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected hip implants. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 996–1001, 2018. DOI: 10.3855/jidc.10988. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/32012130>. Acesso em: 1 nov. 2023.
- AZAMBUJA, W. **Óleo Essencial de Tea Tree (Melaleuca)**. 2015. Disponível em: <https://www.oleos essenciais.org/oleo-essencial-de-tea-tree-melaleuca/>. Acesso em: 25 maio 2023.
- BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. (ed.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**. 2. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2013. 1155 p.
- BONA, C. M. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Psidium salutare* (Myrtaceae) contra *Candida albicans***. 2016. 25 f. TCC (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10737/1309>. Acesso em: 19 out. 2023.
- CAMARGO MATOS, J.; SANTOS CRUZ, N. R. Atividade antimicrobiana do óleo de melaleuca alternifolia comparada a conservantes químicos usados em bases cosméticas. **Revista Multidisciplinar de Estudos Científicos em Saúde**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 21–30. 2018. DOI: 10.24281/rremecs2526-2874.2018.3.4.21-30. Disponível em: <https://www.revistaremeccs.com.br/index.php/remecs/article/view/653>. Acesso em: 19 out. 2023.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V.. **Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties**. 2006. Tese (Doutorado) - Curso de Biomedicina, Clinical Microbiology Reviews, The University Of Western Australia, Western Australia, 2006. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/cmr.19.1.50-62.2006>. Acesso em: 17 out. 2023.
- CORREA, L. T. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca e sua incorporação em um creme mucocutâneo. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 26-37, 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/41290>. Acesso em: 19 out. 2023.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 170-175, 01 jan. 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/88/1/170/6721378?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 23 out. 2023.
- CRISPIM, G. J. B.; LACERDA, M. C. R. N. **Análise da Ação Bacteriolítica da Melaleuca Alternifolia nas Principais Bactérias de Interesse Médico**. 2014. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Faculdade Anhanguera de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/260/26042164001.pdf>. Acesso em: 17 out. 2023.

ELOFF, J. N.. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, Pretoria, v. 64, n. 08, p. 711-713, dez. 1998. DOI: 10.1055/s-2006-957563. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-957563>. Acesso em: 28 jul. 2023.

FARIA, R. C. B. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus***. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15785>. Acesso em: 28 jul. 2023.

FELIPE, L. O.; SILVA JÚNIOR, W. F.; ARAÚJO, K. C.; FABRINO, D. L. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia* —natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal Of Microbiology**, São João del Rei, v. 49, n. 2, p. 212-219, abr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216307298>. Acesso em: 28 jul. 2023.

FENNELL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J.. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal Of Ethnopharmacology**, Kwazulu-Natal, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, out. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002508>. Acesso em: 28 jul. 2023.

FERREIRA, A. W. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013. 496 p.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. **Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact**. 2001. 47 v. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Centro de Pesquisa em Biologia Médica, Teikyo University Institute Of Medical Mycology, Tokyo, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.565>. Acesso em: 19 out. 2023.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖLJÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADİGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 85, n. 2-3, p. 231-235, abr. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00006-0). Acesso em: 28 jul. 2023.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color**. 5 ed. São Paulo: Medsi, 2001.

KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 343-347, abr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.028>. Acesso em: 21 set. 2023.

LIMA, P. M. N. **Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos óleos essenciais de gerânio e lemongrass sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.*** 2022. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual

Paulista (Unesp), São José dos Campos, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/217586>. Acesso em: 19 out. 2023.

LONGBOTTOM, C. J.; CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. **Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes**. 2004. 54f. Tese (Doutorado) - Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, Universidade de Oxford, Oxônia, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-pdf/54/2/386/2303902/dkh359.pdf>. Acesso em: 10 out. 2023.

MATOS, J. C.; CRUZ, N. R. S. Avaliação comparativa da atividade antimicrobiana de óleo de alecrim (*rosmarinus officinalis*) e conservantes químicos utilizados em bases cosméticas. **Revista Processando o Saber**, Praia Grande, v. 11, p. 01-20, 2019. Disponível em: <https://www.fatecpg.edu.br/revista/index.php/ps/article/view/41>. Acesso em: 19 out. 2023.

MENDES, J. M. **Investigação da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis***. 2011. Tese (Doutorado) - Curso de Ciencias Biologicas, Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6717>. Acesso em: 19 out. 2023.

MONTEIRO, A. R. P. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmaceuticas, Repositório Institucional da Universidade Fernando Pessoa, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10284/5327>. Acesso em: 19 out. 2023.

MUMU, S. K. **Antimicrobial activity of Tea Tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against skin infection causing bacteria and comparison of its effectiveness with that of the Eucalyptus oil, Lemongrass oil and conventional antibiotics**. 2017. 62 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Department Of Mathematics And Natural Sciences, Brac University, Dhaka, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10361/9268>. Acesso em: 19 out. 2023.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington, D.C: Asm Press, 2007. 2256 p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; A PFALLER, M.. **Microbiologia médica**. 7. ed. [S.l.]: Elsevier Hs - Education, 2014. 888 p.

NAKAO, A. K.; MAEKAWA, L. E.; SOUSA, N. J. A.; MATA, P. S.; NAKAE, M. Y.; PAIVA, J. C. M. **Atividade antimicrobiana dos óleos de gengibre e melaleuca frente *Candida albicans***. 2020. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Revista Científica da Umc, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2020. Disponível em: <http://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1061>. Acesso em: 13 out. 2023.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard, USA, 2003. Disponível em: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf. Acesso em: 28 jul. 2023.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T.; PONTIERI, E.; AURELI, P.; FERRINI, A. M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major

components. **Lett Appl Microbiol.**, L'Aquila, v. 37, n. 2, p. 185-187, 01 ago. 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/lambio/article-pdf/37/2/185/47049991/lambio0185.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2023.

OLIVEIRA, A. C. M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T. C.; NOGUEIRA, M. N. M.; BEDRAN, T. B. L.; ANDRADE, C. R.; SPOLIDORIO, L. C.; SPOLIDORIO, D. M. P. 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**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/3HdchzszsGnG9h8JV8pwjZym/?lang=pt>. Acesso em: 23 out. 2023.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 301-307, jun. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/y8LwqybqjB9hjwn9c7YJVn/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

RIBEIRO, E. Human methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization: a major public health concern?. **Saúde & Tecnologia**, Lisboa, p. 5-7, 28 jul. 2022. Disponível em: <https://journals.ipl.pt/stecnologia/article/view/530>. Acesso em: 28 jul. 2023.

SAVANI, E. C.; SALVI, C. P. P.; MELO, A.; SALVI JÚNIOR, A. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de melaleuca alternifolia cheel sobre isolado clínico de candida albicans**. 2021. 7 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Infarma, Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (Unipinhal), Espírito Santo do Pinhal, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v33.e3.a2021.pp276-282>. Acesso em: 19 out. 2023.

SILVA, L. L.; ALMEIDA, R.; VERÍCIMO, M. A.; MACEDO, H. W.; CASTRO, H. C. Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal Of Health Review**, Curitiba, v. 2, n. 6, p. 6011-6021, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/5488>. Acesso em: 25 maio 2023.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 30 nov. 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20exatas%20e%20da%20terra/levantamento%20e%20analise.pdf>. Acesso em: 03 out. 2023.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015. 920 p.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 3,

p. 603-661, jul. 2015. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00134-14>. Acesso em: 28 jul. 2023.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R.. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p. 221-225, jan. 2001. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1076/phbi.39.3.221.5934?needAccess=true>.

Acesso em: 28 jul. 2023.

ANEXO A – Declaração de pureza do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

TO WHOM IT MAY CONCERN

16 May 2018

Statement

We hereby declare that, to the best of our knowledge, the following product

S0401837 Teetree Oil

is 100% pure and natural and is obtained by watersteam distillation of leaves and twigs of *Melaleuca Alternifolia*.

The geographical origin is Australia.

This is an automatic print. It is valid without signature.

ANEXO B – Análise da cromatografia gasosa de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.



TYPE ANALYSIS

Page: 1/1

Order Data

Art.-No.: S0401837
Description: Tea tree Oil

Production date: 28.04.2023
Date of analysis: 05.05.2023
Best before: 27.04.2026

Characters: Clear, mobile, colourless or pale yellow liquid; characteristic odour.

Analytical Data	Method	Target Value	Measured Value
Identification:			
GC	Method Ph.Eur.	must comply	complies
Purity:			
Relative density (d ₂₀ /20)	2.2.5	0.885 - 0.906	0.8937
Refractive index (n _D 20)	2.2.6	1.475 - 1.482	1.4771
Optical rotation (α _D 20)	2.2.7	+5 - +15 °	+10.4 °
Fatty oils and resinified essential oils	2.8.7	must comply	complies
Chromatographic profile:			
alpha-Pinene	2.2.28_FL WAX 35	1.0 - 6.0 %	2.6 %
Sabinene	2.2.28_FL WAX 35	≤ 3.5 %	0.3 %
alpha-Terpinene	2.2.28_FL WAX 35	5.0 - 13.0 %	10.4 %
Limonene	2.2.28_FL WAX 35	0.5 - 4.0 %	0.9 %
1,8-Cineole	2.2.28_FL WAX 35	≤ 15.0 %	2.1 %
gamma-Terpinene	2.2.28_FL WAX 35	10.0 - 28.0 %	21.9 %
para-Cymene	2.2.28_FL WAX 35	0.5 - 12.0 %	2.8 %
Terpinolene	2.2.28_FL WAX 35	1.5 - 5.0 %	3.7 %
Terpinen-4-ol	2.2.28_FL WAX 35	≥ 30.0 %	44.7 %
Aromadendrene	2.2.28_FL WAX 35	≤ 7.0 %	0.4 %
alpha-Terpineol	2.2.28_FL WAX 35	1.5 - 8.0 %	2.3 %
Additional test F+L chirality:			
(-)-alpha-Pinene	2.2.28_FL Chiral	≤ 10.0 %	9.2 %
(+)-alpha-Pinene	2.2.28_FL Chiral	≥ 90.0 %	90.8 %
(-)-Terpinen-4-ol	2.2.28_FL Chiral	30.0 - 31.75 %	30.58 %
(+)-Terpinen-4-ol	2.2.28_FL Chiral	68.25 - 70.0 %	69.43 %
(-)-alpha-Terpineol	2.2.28_FL Chiral	24.0 - 26.5 %	24.8 %
(+)-alpha-Terpineol	2.2.28_FL Chiral	73.5 - 76.0 %	75.2 %

This product complies in all points with the above-mentioned monograph.

Henstedt-Ulzburg, 17.05.2023

This is an automatic print. It is valid without signature.