



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS

LUANA MADEIRA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Juiz de Fora

2023
LUANA MADEIRA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca Examinadora da
Universidade Presidente Antônio
Carlos, como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Profa. Soraia Chafia
Naback de Moura

Juiz de Fora
2023
Luana Madeira Martins

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca Examinadora da
Universidade Presidente Antônio
Carlos, como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Profa. Soraia Chafia
Naback de Moura

AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL EVALUATION OF *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* OIL

LUANA MADEIRA MARTINS¹, SORAIA CHAFIA NABACK DE MOURA²

Resumo

Introdução: A *Melaleuca alternifolia* é uma planta medicinal bastante usada na medicina alternativa. Ela possui diversos constituintes, porém o que se destaca por sua maior quantidade é o terpien-4-ol. O óleo tem sido usado no combate à bactéria *Staphylococcus aureus* e ao fungo *Candida albicans*, devido a suas propriedades antifúngicas e antibacterianas. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro* da *Melaleuca alternifolia* frente às linhagens de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. **Métodos:** O óleo *in natura* e diluído nas proporções 1:2, 1:4, 1:6 foram submetidos à avaliação antifúngica e antibacteriana pelo Método de Difusão em ágar – Técnica do Poço. **Resultados:** Os resultados evidenciaram que o óleo apresentou um discreto halo de inibição nas proporções 1:2 e 1:4 frente ao *Staphylococcus aureus* e uma forte resistência do fungo *Candida albicans* frente ao óleo *in natura* e diluído. **Conclusão:** Conclui-se que a *Melaleuca alternifolia* possui atividade antibacteriana discreta e nenhuma atividade antifúngica como método alternativo na prevenção de infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* evidenciando a necessidade de aprofundar as investigações clínicas para obter um resultado seguro .

Descritores: *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. *Melaleuca alternifolia*. Ação antibacteriana. Ação antifúngica.

Abstract

Introduction: *Melaleuca alternifolia* is a medicinal plant that has been widely used in alternative medicine. It has several constituents, but the one that stands out for its largest quantity is terpien-4-ol. The oil has been used to combat the bacteria *Staphylococcus aureus* and the fungus *Candida albicans* that causes candidiasis, mainly in women due to its antigungal and antibacterial properties. **Objective:** To evaluate the *in vitro* antifungal and antibacterial activity of *Melaleuca alternifolia* against strains of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Methods:** The oil diluted in proportions 1:2, 1:4, 1:6 were subjected to antifungal and antibacterial evaluation using

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos UNIPAC - Juiz de Fora - MG

² Farmacêutica, Professora do Curso de Farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, mestrado

the Agar Diffusion Method - Well Technique. **Results:** The results showed that the oil presented a discrete inhibition halo in proportion 1:2 and 1:4 against *Staphylococcus aureus* and strong resistance to the *Candida albicans* fungus, with no halo formation. **Conclusion:** It is concluded that *Melaleuca alternifolia* has discrete antibacterial activity and no antifungal activity as an alternative method of disease prevention.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. *Melaleuca alternifolia*. Antibacterial action. Antifungal action.

INTRODUÇÃO

A *Melaleuca alternifolia*, do gênero Myrtaceae, uma planta nativa da Austrália, comumente chamada de “Tea tree oil” (TTO), devido aos seus constituintes monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois e terpenos, é considerada uma importante aliada da medicina atual, com destaque para o composto de hidrocarboneto terpenos (terpene-4-ol), o principal componente do óleo.¹

Os óleos essenciais são obtidos através do material vegetal e são consideradas como substâncias oleosas aromáticas. O extrato obtido da *Melaleuca* é feito pela extração das folhas por hidrodestilação; levando em conta que o conteúdo natural dos terpenos pode variar dependendo do clima, da maceração, da idade das folhas, da duração do processo da destilação e da população da árvore ao seu usada – 130 gêneros e aproximadamente 200 espécies.²

A *Melaleuca*, além da atividade antifúngica e antibacteriana, é também utilizada para o tratamento de herpes simples, como cicatrizante, anti-inflamatório, analgésico expectorante, balsâmico, imune-estimulante e diaforético.¹

O uso irracional de antibacterianos e fungicidas causou o surgimento de bactérias e fungos multirresistentes. A partir disso, se faz necessário a descoberta de novos agentes antibacterianos e antifúngicos que atuem em amplo espectro. Com isso, o óleo essencial de TTO, produzido por destilação a vapor das folhas e ramos, exerce função antibacteriana em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com ênfase nos testes experimentais *in vitro* para o *Staphylococcus aureus*.³

As bactérias, por um mecanismo intrínseco, conseguem produzir linhagens geneticamente menos susceptíveis aos fármacos, o que lhes permite uma alta resistência.⁴ A partir do momento em que um antibiótico começa a decair até um ponto em que há um aumento na restrição do seu uso, ocorre o surgimento dessas cepas resistentes, com isso, se faz necessário a produção de novas substâncias que não tenham somente um espectro de atividade, mas também, que possuam novos mecanismos de ação. Como destaque nos estudos a respeito do uso terapêutico de óleos essenciais ou medicamentos fitoterápicos.⁵

Diversos estudos buscam opções de antimicrobianos que reforcem o desenvolvimento de novas medicações para tratar complicações decorrentes de micro-organismos multirresistentes, tendência estimulada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) que leva em conta sua efetividade e segurança no uso de práticas complementares. Uma linhagem bacteriana pode produzir linhagens geneticamente menos susceptíveis aos fármacos convencionais e a ocorrência das infecções eleva os períodos de internação. Com a predominância do composto terpien-4-ol, que compõe 40 % do óleo de *Melaleuca*, corresponde ao efeito de inibição sobre o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos.⁴

A *Candida albicans* é a linhagem mais frequente causadora das infecções com potencial patogênico, com isso, a *Melaleuca* se destaca na estratégia do tratamento dessas infecções devido à diminuição da sensibilidade das leveduras, com propósito de reduzir o tempo de tratamento e efeitos colaterais.⁶

É caracterizada como uma inflamação fúngica que acomete a vulva e a vagina ocasionada pelo supercrescimento de fungos, podendo se apresentar na forma de leveduras, o que colabora para que a doença e a forma filamentosa, que manifesta a candidíase, não se desenvolvam. Episódios repetitivos dessa doença causam um impacto muito sério na qualidade de vida e pelo advento de espécies resistentes, o que se faz necessário que mulheres recorram a métodos alternativos, incluindo os produtos de origem natural.⁷

Portanto, a pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre as linhagens de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa com cunho investigativo e experimental com abordagem qualitativa sobre a avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana do óleo de TTO frente às linhagens de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* pelo Método de Disco Difusão em Ágar. A pesquisa foi conduzida no laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, localizado no município de Juiz de Fora, no mês de outubro a dezembro de 2023.

Avaliação da atividade antibacteriana

Foi utilizada a cepa padronizada ATCC (*American Type Culture Collection*) obtida no laboratório de microbiologia da UNIPAC, de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A linhagem padronizada de ATCC é uma preparação quantitativa de microrganismos desenvolvidos para a realização de testes de promoção de meios de cultura, que é fundamental para o processo de controle de qualidade.

A avaliação antibacteriana foi feita pelo método disco difusão em Ágar, em duplicata. As placas contendo Ágar Mueller Hinton foram preparadas e deixadas em repouso em temperatura ambiente para resfriar, em seguida, foram acondicionadas sob refrigeração entre 2° e 8°C até o uso.

Para iniciar o Teste de Sensibilidade antimicrobiano, foi feita uma suspensão direta da cepa em tubo identificado em respectivo microrganismos contendo 3 mL de caldo Mueller Hinton e mantidos na estufa bacteriológica durante 24 horas com o objetivo de obter crescimento das bactérias. Após incubação, as amostras foram suspensas em 3 mL de solução salina (0,9%) até a obtenção de uma turvação 0,5 escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL – unidades formadoras de colônias/mL).⁸ Em seguida, as amostras pura e diluídas (1:2, 1:4 e 1:6) foram semeadas, utilizando um swab estéril, na superfície da placa de Petri contendo Ágar Muller Hinton com aproximadamente 4mm de espessura, de acordo com as recomendações da CLSI 2019 (The Clinical and Laboratory Standards Institute).⁹

Com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos impregnados com óleo *in natura* de melaleuca e com as diluições (1:2, 1:4 e 1:6) foram aplicados sobre a placa de Petri contendo os microrganismos. Como controle positivo, foi utilizado o antimicrobiano Amicacina 30 µg, Cefoxitina 30 µg, Ciprofloxacina 50 µg e, como controle negativo, foi utilizado com um disco de papel de filtro umedecido com álcool a 70%. Logo após a distribuição dos discos na superfície das placas, estas foram mantidas invertidas dentro da estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas.

O tamanho dos halos de controle positivo e de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, através de uma régua.

Avaliação da atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica do óleo de *Melaleuca*, foi utilizada uma linhagem clínica *Candida albicans* cedida pelo laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para a semeadura do fungo, foi utilizado o ágar sangue de carneiro a 5%. Após o crescimento do fungo, foi feita uma suspensão em 3 mL de solução salina (0,9%) até a obtenção de uma turvação 0,5 da escala de McFarland, ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL - unidade formadoras de colônias/ mL). Em seguida, com o auxílio de um swab estéril, o inóculo foi distribuído uniformemente sobre a superfície da placa contendo o ágar sangue. As placas contendo os inóculos foram dispensados, os discos impregnados de óleo *in natura* foram diluídos na proporção de 1:2, 1:4, 1:6. Como controle positivo, foi utilizado o Fluconazol 25 mcg e, como controle negativo, o álcool a 70%. O procedimento foi feito em duplicata, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram que o óleo teve uma discreta ação antibacteriana nas diluições 1:2, 1:4, de inibição dos crescimentos da cepa em estudo, como demonstrado na Tabela 1 e Figura 1.

Estudos realizados por Cruz e Paixão³ e também por Tedesco et al¹⁰ afirmaram que o óleo extraído diretamente da planta possui um resultado inibitório melhor do que os comerciais frente a cepa do *S. aureus*, que objetivaram a comparação do teste microbiano.

Tabela 1. Diâmetro dos halos de inibição pelo Método difusão em Ágar (técnica do “poço”) para a atividade antibacteriana do óleo essencial

Concentração (mg/ml)	Medida do halo de inibição(mm)	Medida do halo de inibição(mm)
1:2	5	7
1:4	7	6
1:6	5	-
TM	9	-
CN	-	-
AM	20	20
CE	30	25
CP	27	25

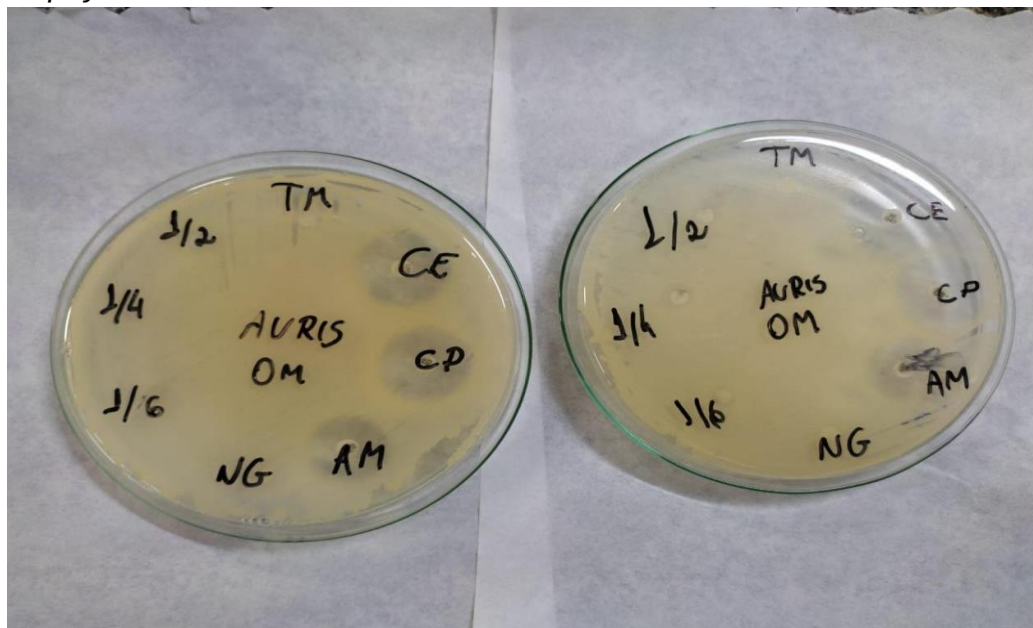
Fonte: Elaboração da autora (2023).

O óleo do TTO apresentou um discreto halo de inibição nas diluições 1:2, 1:4, possivelmente pelo fato de ter sido adquirido comercialmente. Segundo Tedesco, o potencial hidrogeniônico (pH), temperatura ambiente, tempo de exposição, estabilidade química, são fatores que devem ser levados em consideração para a manufatura do produto acabado.¹⁰

A composição do óleo de *Melaleuca* muda particularmente na presença de oxigênio atmosférico, mas também, quando o óleo é exposto à luz e a temperaturas

mais elevadas, por possuir uma alta complexidade química, que faz com que a bactéria não consiga modificar seu sistema enzimático. Cestari et al¹¹ tiveram em sua pesquisa um resultado não satisfatório frente a cepa de *S. aureus*, que utilizou outro método com placas contendo o meio TSA (*Tryptycase- Soy-Agar*) previamente semeado com as cepas ATCC.

Figura 1. Antibiograma da atividade antibacteriana frente a cepa do *Staphylococcus aureus*



Fonte: Acervo pessoal.

Os resultados obtidos para a atividade antifúngica evidenciaram que o fungo *Candida albicans* foi resistente ao óleo *in natura*, ao óleo diluído, ao controle negativo e ao Fluconazol (Figura 2). O mesmo foi evidenciado em um estudo realizado por Mertas et al¹² no qual foram testadas 32 linhagens clínicas da candidíase. A cepa referência também foi resistente a baixas concentrações do TTO e ao Fluconazol. Foram avaliadas mudanças na atividade do Fluconazol *in vitro* contra a cepa de *Candida albicans* isolando o bioativo principal, o terpien-4-ol e usando as concentrações subletais do óleo.

Um estudo realizado por Savani et al⁶ avaliou, pelo método disco-difusão em ágar, com controle positivo sendo o nitrato de miconazol, que os resultados obtidos nas concentrações do óleo inferiores a 10% não houve interferência no crescimento

dos micro-organismos. A formação de halos de inibição ocorreu somente na concentração de 25% do óleo. Com isso, os autores afirmaram que a composição do óleo essencial pode variar, dependendo do local de plantio, condições de cultivo e colheita, a técnica aplicada, o micro-organismo utilizado no teste, se os extratos foram de plantas frescas ou secas, a quantidade testada e o diluente utilizado, o que corrobora com o resultado obtido.

Figura 2. Antifungigrama frente a cepa da *Candida albicans*.



Fonte: Acervo pessoal.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, foi possível evidenciar que o óleo de *Melaleuca alternifolia* adquirido no comércio local apresentou uma baixa atividade antibacteriana e nenhuma atividade antifúngica. Com isso, fica claro a necessidade de aprofundar as investigações sobre o óleo e suas atividades clínicas para obter um resultado seguro, devido ao grande interesse farmacêutico sobre seus compostos, visto que há resistência dos micro-organismos aos medicamentos convencionais usados no mercado.

REFERÊNCIAS

- 1) Silva LL, Almeida R, Verícimo MA, Macedo HW, Castro HC. Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*melaleuca alternifolia*): uma revisão de literatura. Brazilian Journal of Health Review [periódico na internet]. 2019 [citado 2023 Maio 30]; 2(6): [cerca de 10p.]. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/5488/4994>
- 2) Gomes AD, Riscado L, Barros RS, Dezidério P, Santiliano BRA. Aplicabilidade do xampu contendo óleo de melaleuca alternifolia cheel 0,2% na profilaxia da seborréia. Cadernos Camilliani [periódico na internet]. 2019 [citado 2023 Nov 21]; 15 (3-4): [cerca de 20p.]. Disponível em: <https://www.saocamilo-es.br/revista/index.php/cadernoscamilliani/article/view/344/185>
- 3) Cruz TS, Paixão JA. Aplicação do óleo essencial de Melaleuca alternifolia (TEA TREE) no tratamento da acne vulgar. Revista Artigos.Com [periódico na internet]. 2021 [citado 2023 Maio 30]; 29: [cerca de 8p.]. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/artigos/article/view/7657>
- 4) Gioppo A, Zancanaro V, Bellaver EH. Atividade antibacteriana do óleo essencial de Melaleuca alternifolia frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. Biotemas [periódico na internet]. 2019 [citado 2023 Maio 30]; 32(3): [cerca de 7p.]. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21757925.2019v32n3p35/40662>
- 5) Crispim GJB, Lacerda MCRN. Análise da ação bacteriolítica da melaleuca alternifolia nas principais bactérias de interesse médico. Ensaios e Ciência Biológicas Agrárias e da Saúde [periódico na internet]. 2015 [citado 2023 Nov 21]; 18(2): [cerca de 8p.]. Disponível em: <https://ensaioseciencia.pgskroton.com.br/article/view/1073>
- 6) Savani EC, Salvi CPP, Melo A, Júnior AS. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre isolado clínico de *Candida albicans*. Infarma [periódico na internet]. 2021 [citado 2023 Maio 30]; 33: [cerca de 6p.]. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=2844&path%5B%5D=pdf>
- 7) Lima LS, Lacerda VAM. Os efeitos do óleo essencial de Melaleuca *alternifolia* cheel no tratamento da candidíase vulvovaginal recorrente. Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde [periódico na internet]. 2022 [citado 2023 Maio 30]; 4(3): [cerca de 8p.]. Disponível em: <https://revistarebis.rebis.com.br/index.php/rebis/article/view/382/223>

- 8) Diagnósticos microbiológicos especializados. Antibiograma: interpretação das zonas de inibição e concentração inibitória mínima. [texto na internet]. CLSI; 2022. Disponível em: <https://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/Bula-de-Bancada-CLSI-2022.pdf>
- 9) Manual de Antibiograma 2019 - Segundo BrCAST/EUCAST. [texto na internet]. Laborclin Produtos para Laboratório Ltda; 2019.
- 10) Tedesco L, Bufalo AC, Wietzikoski EC, Velasquez PAG, Ciesca GM. Avaliação antibacteriana do extrato de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) frente à cepa de *Staphylococcus aureus*. Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR [periódico da internet]. 2014 [citado 2023 Nov 21]; 18(2): [cerca de 10p.]. Disponível em: <https://ojs.revistasunipar.com.br/index.php/saude/article/view/5172/2992>
- 11) Cestari TN, Vieira KS, Pfau VJM, Pfau EA. Atividade antimicrobiana de agentes fitoterápicos e químicos utilizados em odontologia. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR [periódico na internet]. 2013 [citado 2023 Nov 21]; 17(1): [cerca de 3p.]. Disponível em: <https://ojs.revistasunipar.com.br/index.php/saude/article/view/4974/2900>
- 12) Mertas A, Garbusinska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. A influência do óleo da árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*) na atividade do fluconazol contra cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol. BioMed Research International [periódico na internet]. 2015 [citado 2023 Nov 21]; 2015: [cerca de 8p.]. Disponível em: https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2015/590470.pdf?_gl=1*1fjuvmh*_ga*MTQzMDQ4MTQzMC4xNzAwNTcxNDcw*_ga_NF5QFMJT5V*MTcwMDU3MTQ3MC4xLjAuMTcwMDU3MTQ3MC42MC4wLjA.&_ga=2.169263585.1144898965.1700571470-1430481430.1700571470