

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO TEA TREE OIL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIA PROPIONIBACTERIUM ACNES

Caroline dos Santos Fogaça de Andrade¹; Nilo Fuhr Batista¹; Priscila Rodrigues Lasakosvitsch¹; Carlos Rocha Oliveira²; Valéria Maria de Souza Antunes²

¹Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Anhembi Morumbi, SP, Brasil.

²Professor da Universidade Anhembi Morumbi.

Recebido em: jan. 2018; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

Nos últimos anos, de uma maneira geral, as pessoas estão focadas tanto na saúde como na aparência e veem buscando alternativas naturais de tratamento para diversas doenças e problemas. Uma alternativa que começou a ser explorada é o uso do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, uma planta nativa da Austrália com baixa citotoxicidade e diversas funções, dentre elas uma ação antifúngica, antiviral e antibacteriana contra muitas bactérias, como a *Propionibacterium acnes*, uma bactéria causadora de umas das principais doenças que acometem jovens e adultos que é a acne e a qual não se tem muitos estudos que comprovem essa ação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em *Propionibacterium acnes* através do método de Mueller Hinton e Pour Plate e sua atividade citotóxica em fibroblastos através do método de determinação do IC₅₀ (método de exclusão por azul de tripan) e Ensaio de redução MTT à formazan e com isso conclui-se que o óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* tem baixa atividade citotóxica e alta atividade antimicrobiana contra a bactéria estudada.

Palavras-chaves: Pele. Óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*. *Propionibacterium acnes*. Citotoxicidade.

Introdução

O crescente desenvolvimento comercial e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais, ocorrendo atualmente a maior produção em países exteriores à Europa tais como o Brasil (29%), a Índia (26%), os Estados Unidos (17%) e a China (9%). No entanto, o consumo e a preocupação com o controle de qualidade e com os aspectos relacionados com a saúde humana são particularmente significativos na Europa (MARTINS, *et al*, 2011). Devido à despreocupação de alguns países, a adulteração de óleos essenciais tem

sido uma prática constante e a determinação dos índices físico-químicos de densidade, rotação óptica e índice de refração são de extrema importância para detectar adulterações, muito comuns na comercialização dos óleos essenciais (SANTOS, *et al*, 2009). Por isso a normalização dos óleos essenciais tem posto em evidência os seus benefícios, mesmo em mercados onde juntamente com a intensificação da procura, a adulteração e a deficiência de controle são por vezes fatores críticos (MARTINS, *et al*, 2011).

A *Melaleuca alternifolia* Cheel, conhecida comumente como Tea Tree, é uma planta da famí-

lia Myrtaceae nativa da costa subtropical nordeste australiano (SILVA, 2001). Seu óleo é obtido das folhas (SIMÕES *et al.*, 2002) e sua cor vai de incolor a amarelo pálido (WHO, 1999). O óleo é composto principalmente por Hidrocarbonetos (Monoterpenos e Sesquiterpenos), Álcoois (Monoterpenóides e Sesquiterpenóides) e Óxidos. (SILVA, 2004).

Recentemente ganhou uma reputação como antisséptico seguro, eficaz e natural sendo atualmente incorporado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos de uso externo (COX, *et al.*, 2000).

Apesar de sua popularidade como agente antimicrobiano, há poucos estudos que comprovam sua eficácia na diminuição de *Propionibacterium acnes*, que faz parte da biota natural da pele sendo o principal microrganismo envolvido na etiopatogenia da acne vulgar, uma doença dermatológica que acomete a saúde em seu completo estado de bem-estar físico, mental e social e comumente afeta jovens e adultos em todo mundo. Para garantir seu uso tópico é necessário ter conhecimento sobre a pele, o maior órgão do corpo humano, que tem como suas principais camadas, a derme e a epiderme, que se assentam em uma terceira camada, chamada hipoderme, além disso, deve ser

estudado se há atividade citotóxica do óleo contra as células desse órgão.

Aspectos botânicos

A *Melaleuca alternifolia* Cheel, conhecida comumente como tea tree, é uma planta da família Myrtaceae nativa da costa subtropical nordeste australiana (SILVA, 2001). O termo - tea tree, aparentemente, foi dado pelo Capitão James Cook em sua viagem exploratória pela Austrália em 1770, quando encontrou um arbusto de Myrtaceae, possivelmente uma espécie de *Leptospermum* sp., cujas folhas eram usadas pelos marinheiros em substituição ao chá de *Camellia sinensis*. (MAIDEN e BETCHE, 2013).

Essa árvore pode atingir até sete metros de altura, têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte (SIMÕES, 2002). A cor do óleo dessa planta vai de incolor a amarelo pálido (WHO, 1999). A descrição olfativa de seu aroma pode ser: fresco, amadeirado, herbal, balsâmico e pungente (SILVA, 2001) e suas flores são amarelas ou púrpuras e naturalmente crescem em áreas pantanosas, porém já foram adaptadas a outros ambientes pelo homem (WALTERS, 2000). Na figura 1, estão representados arbustos de *Melaleuca alternifolia*, folhas e flores.



Figura 1: Fotografias de *Melaleuca alternifolia*. A) Planta inteira. B) Destaque para as flores Fonte: A) *Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008a e B) *Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008b.

Constituintes

O óleo, que é obtido das folhas (SIMÕES *et al.*, 2002), é composto principalmente por Hidro-

carbonetos (Monoterpenos e Sesquiterpenos); Álcoois (Monoterpenóides e Sesquiterpenóides) e Óxidos. (SILVA, 2004). Dentre esses compostos, pode conter quantidades variadas de terpe-

nos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol, que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana (SIMÕES *et al*, 2002). Além destes componentes, a *melaleuca* apresenta pelo menos 48 componentes orgânicos, alguns dos quais raramente foram encontrados em outras plantas (CORAZZA, 2002). A concentração

de cineol depende da época em que a melaleuca é colhida; no inverno há um aumento da concentração deste composto, época ideal para colheita, pois poderia aumentar a propriedade antimicrobiana, em oposição ao verão, onde a concentração está diminuída (VADEMÉCUM, 2003). O Quadro 1 demonstra componentes da *Melaleuca alternifolia*.

Classe		Constituintes Principais	Composição %
Hidrocarbonetos	Monoterpenos	Alfa – pineno	0,8-3,6
		Beta – pineno	0,1-1,6
		Terpinoleno	3
		Alfa – tuieno	0,1-2,1
		Limoneno	0,4-2,77
		Para – cimeno	0,4-12,4
		Alfa – felandreno, sabineno	Traços – 3,2
		Alfa – terpineno	4,6-12,8
		Gama – terpineno	9,5-28,3
		Mirceno	0,1-1,8
	Alfa e beta – felandrano	Traços – 1,9	
	Sesquiterpenos	Beta – cariofileno	1
		Aromadendreno	0,1-6,6
		Delta – cadineno	0,1-7,5
		Allo – aromadendreno	0,3
		Alfa – muuroleno	0,1
		Viridifloreno	0,3-6,1
		Biciclogermacreno	0,1
		Alfa – gurjuneno	0,2
Calameno	0,1		
Alcoóis	Monoterpenóides	Terpinenol-4	29,4-44,9
		Alfa – terpineol	3,5-5
		Beta – terpineol	Traços
		p-cimeno-8	1
		Cis –tuianol-e e trans-tuianol-4	Traços
	Sesquiterpenóides	Globulol	0,1-3
		Viridiflorol	0,1-1,4
Óxidos	Cubenol	0,1	
	1,8-cineol	0,5-18	
	Epóxicariofileno	Traços	
		1,4-cineol	Traços

Quadro 1: Composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Fonte: SILVA, 2004.

O padrão exigido para a comercialização internacional do óleo essencial de melaleuca é definido por duas instituições: Standards Association of Australian (AS 2782-85) e a International Standard Organization (ISO - 4730, 1996). Ambas as normativas estabelecem a qualidade comercial pelas concentrações dos seus compostos majoritários, o terpinen-4-ol e 1,8-cineol, o primeiro responsável pela atividade antimicrobiana sendo que sua concentração no óleo essencial deve ser no mínimo 30% e o segundo componente, 1,8 cineol, que possui propriedades irritantes à pele, deve ter uma concentração máxima de 15% (CASTELO, 2013).

O óleo essencial das folhas da *Melaleuca alternifolia*, tem uma longa história como antisséptico de uso tópico. Recentemente ganhou uma reputação como antisséptico seguro, eficaz e natural. Isso gerou um ressurgimento de sua popularidade e atualmente é incorporado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos de uso externo (COX, *et al.*, 2000). Além disso, o óleo reduz a taxa de reprodução de patógenos (bactérias, fungos, vírus), e intensifica a resistência contra esses agentes agressores, por esse motivo é útil nas afecções do couro cabeludo, como a caspa, e de pele, como a acne grau I e grau II (TESKE; TRENTINI, 2001). Com outras ações, o óleo essencial de melaleuca também reduziria a inflamação local talvez por diminuir a liberação de histaminas (KOH *et al.*, 2002). As propriedades anti-inflamatórias contribuem com a cura de feridas crônicas e são baseadas na supressão da produção de mediadores inflamatórios pela ativação dos monócitos (FINLAY-JONES *et al.*, 2001; HART *et al.*, 2000).

É amplamente indicado em casos de acne, onicomicoses, candidíase, herpes labial entre outros (HAMMER *et al.*, 2003) e tem incrível capacidade bactericida tanto nas espécies gram-positivas quanto nas gram-negativas, além de sua atividade antifúngica potente (SILVA, 2001). O uso de um gel para acne com óleo essencial de melaleuca a 5% demonstrou menos efeitos colaterais quando comparada ao uso de loção com peróxido de benzoíla a 5%, embora o início da ação de produto seja mais lento (BASSETT *et al.*, 1990). O efeito do pe-

róxido de benzoíla não é tão intenso e duradouro como o da melaleuca e causa maior intolerância ao produto (ALONSO, 1998). A concentração ideal para uso da melaleuca em cosméticos é de 2 a 5 % para que este seja usado com segurança (CARVALHO e ALMANCA, 2003).

Ação antibacteriana

A quantificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é indispensável na exploração de sua aplicação. Eles, tal como outros agentes antimicrobianos podem exercer os mais variados efeitos sobre a célula microbiana, quer na sua estrutura, quer no seu funcionamento. (BURT 2004, LAHLOU 2004).

Em muitos casos, a propriedade antimicrobiana se dá pela ação de constituintes monoterpenos que causam danos à membrana celular do microrganismo (COX *et al.*, 2000). O mecanismo de ação bactericida consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, conseqüente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração (CARSON *et al.*, 2006).

Segundo COX *et al.* (2000), a ação antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca pode resultar da habilidade de destruir a barreira permeável das estruturas da membrana celular de bactérias, este é um modo de ação similar aos conservantes como derivados de fenol, clorexidina e derivados do ácido parabenzóico e de desinfetantes ativos contra a membrana celular. Contudo, por possuir cerca de 100 componentes, existe a possibilidade de não ter sido pesquisado todo o potencial de atuação. Sendo assim é possível que outros elementos, ainda não avaliados, contribuam para a atividade antimicrobiana com mecanismo de ação diferente daquele já encontrado (HAMMER *et al.*, 2003).

Dentre os componentes do óleo o componente Terpinen-4-ol está presente em 30-40% da composição (CARSON *et al.*, 2006), sendo o que detêm a principal atividade antimicrobiana. O 1,8-cineole, considerado irritante da pele, pode aumentar a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos e por

isso alguns autores o consideram como detentor de efeito antimicrobiano marginal. (OLIVEIRA, *et al.*, 2011).

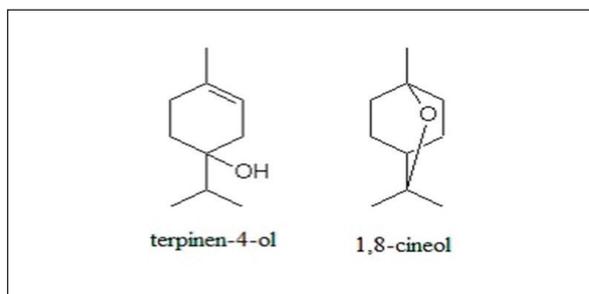


Figura 2: Principais componentes com ação antimicrobiana.

Fonte: OLIVEIRA, *et al.*, 2011.

Dados recentes mostram que o óleo de melaleuca possui amplo espectro de ação antimicrobiano, possuindo efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações (Wilkinson & Cavanagh, 2005; Kwiecinski *et al.*, 2008; Vuuren *et al.*, 2009).

Material e Método

Óleo essencial: O Ativo utilizado foi o óleo essencial puro de *Melaleuca alternifolia*, lote: 0043/13, fabricado em: 01/13 e vencimento em: 01/16, produzido pela empresa WNF (World's Natural Fragrance).

Método

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi. A linhagem de fibroblastos L929 foi submetida ao tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Após os tratamentos foi realizada uma avaliação da viabilidade celular do composto testado frente à linhagem L929.

Cultura celular

As células da linhagem L-929 foram cultiva-

das em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (1 × 10⁵ cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e realizado a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular for igual ou superior a 95%.

Avaliação da citotoxicidade (determinação do IC₅₀)

Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* foi realizada pelo método de incorporação do corante azul de tripano, onde após 48 horas de incubação o conteúdo de cada poço das culturas de fibroblastos foi recolhido em tubos de 15 mL, e centrifugados a 1500 rpm por 8 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de meio RPMI. Após isso, as soluções de células foram diluídas (1:2) em corante de azul de tripano e a contagem das células viáveis e inviáveis foi realizada em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. A soma da contagem de células totais (viáveis e inviáveis de cada poço) foi considerada como 100% de células, sendo realizados os cálculos para verificar as porcentagens correspondentes às células viáveis e as inviáveis analisadas no experimento.

Ensaio de redução MTT à formazan.

O teste de redução MTT ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]) é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um *screening* inicial de fármacos. Sua interpretação serve de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox inclui tanto mitocôndrias como o citosol. A redução do sal de MTT à formazan é realizada principalmente pela enzima succinato-desidrogenase, e resulta em cristais de formazan

insolúveis na cor violeta. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (MOSMANN et al., 1983). Assim, às células foram tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e na concentração 5×10^4 células por poço, foram adicionados 10 μ l da solução de MTT 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada,

o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa, dissolvido com 100 μ l de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas (FlexStation® 3 multimode benchtop reader) em 540 nm. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço (com droga)} \times 100}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}}$$

Teste de determinação de apoptose através da avaliação da integridade das moléculas de DNA

Para a análise qualitativa de fragmentos de DNA resultante de clivagem internucleossomal, 5×10^5 de células/mL da linhagem L929, tratada com diferentes concentrações de *Melaleuca alternifolia*, foram submetidas à extração de ácidos nucleicos segundo Sambrook & Russel, 2001. Após a extração do DNA genômico, as amostras e os padrões de bandas de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 0,8% e 1,5%, corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados e fotografados sobre luz ultravioleta usando um fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem.

Avaliação da ação antimicrobiana

Meio de Cultura Mueller - Hinton

Cepa teste

Foi utilizada uma cepa teste de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, gentilmente cedida pela empresa PROBAC do Brasil, conservada em meio Tioglicolato e repicada em meio BHI para enriquecimento. A suspensão da cepa foi realizada em solução salina (NaCl a 0,85% p/v), a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 108 UFC/mL (técnica adaptada de BAUER et al., 1966).

Avaliação da Atividade

Foi utilizado um disco contendo o antibiótico Clindamicina (controle), que é considerado o mais potente para acne devido à supressão da proliferação da bactéria *Propionibacterium acnes* nos folículos pilosos afetados, com redução da inflamação local. Seu uso é tópico e a concentração utilizada está entre 1 a 2% (COSTA e BAGATIN, 2013). Utilizaram-se discos embebidos com 25 μ l, 50 μ l e 75 μ l do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* brutos e em seguida, colocados em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton inoculado com a suspensão bacteriana descrita anteriormente, com o auxílio de “swabs” estéreis, o teste foi feito em triplicata. Após isso houve incubação das placas a 37°C por 24 horas e foram observados os halos de inibição sobre a cepa bacteriana ensaiada. Os resultados foram expressos em milímetros dos diâmetros dos halos formados ao redor dos discos (Adaptado de OLIVEIRA et. al., 2006).

Pour-plate

O objetivo da técnica de semeadura em profundidade é obter colônias isoladas. Nesta técnica 1,0 mL de suspensão de microrganismo e diferentes concentrações do ativo (25 μ l, 50 μ l e 75 μ l) foram adicionados em placas estéreis e em seguida 15 a 20 mL de ágar TSA fundido foi adicionado por cima. Essa técnica foi feita em triplicata. As placas foram suavemente submetidas a movimentos ro-

tatórios, visando uma perfeita mistura da cultura com o ágar. Nesta técnica tomou-se cuidado para não adicionar o meio em temperatura elevada sobre o inóculo, pois isto poderá matar os microrganismos.

Detalhamento da Técnica

Isolamento de micro-organismos: homogeneização e diluição seriada; junto à chama do bico de Bunsen, transferiu-se 1,0 g da amostra complexa coletada para um frasco contendo 9,0 ml de solução salina esterilizada; agitou-se vigorosamente a suspensão preparada no passo anterior e deixou por 10 minutos sob agitação de 150 rpm, de modo a obter uma suspensão homogênea da amostra, facilitando a suspensão da maior parte das células dos micro-organismos adsorvidas nas partículas da amostra;

junto à chama do bico de Bunsen, transferiu-se 1,0 mL da suspensão original (preparada acima – diluição 10^{-1}) para tubos de ensaio contendo 9,0 ml de solução salina estéril, de modo a obter a diluição 10^{-2} ; foi feita diluições sucessivas até 10^{-4} (1:10000). Foi homogeneizada a amostra em suspensão (utilizando vortex) em cada nova diluição realizada; foram realizadas placas controle em triplicata, contendo 1,0 ml de cada diluição e o meio TSA. Nas placas teste, foram plaqueados 1,0 mL de cada diluição, adicionado às concentrações de ativo em triplicata e adicionou-se o meio TSA; As placas foram incubadas a 35°C de 2 a 3 dias. Foi realizada a contagem.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p < 0.05$, para a comparação entre os grupos. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02.

Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios realizados

laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi, estão descritos abaixo.

Teste da avaliação de citotoxicidade

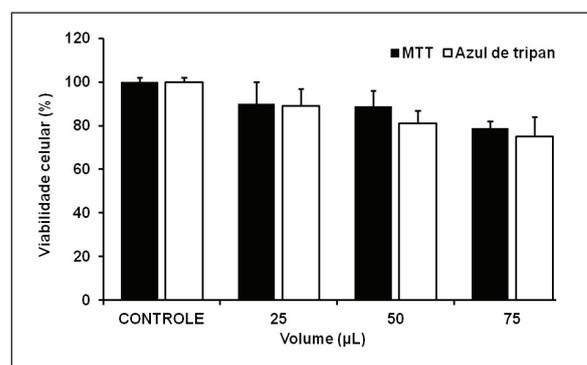


Figura 3: Viabilidade de fibroblastos L-929 obtida após tratamento com óleo essencial de melaleuca depois de 72 h de exposição. Testes realizados: teste de redução do MTT e viabilidade por azul de tripan. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e estão representados pela média e desvio padrão. Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey.

Teste de determinação de apoptose



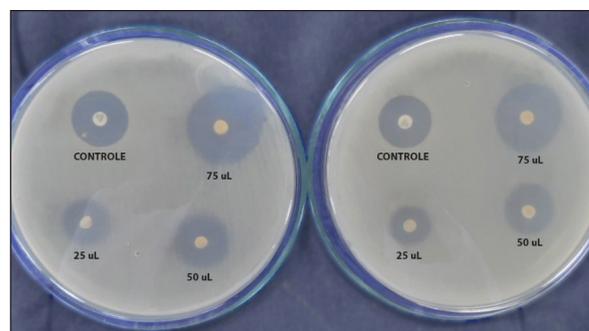
Figura 4: Corrida de eletroforese em gel de agarose para determinação da integridade das moléculas de DNA.

Teste antimicrobiano pela técnica de Mueller-Hinton

<i>P.acnes</i>	Controle	25µL	50µL	75µL
1	15 mm	14mm	17mm	19mm
2	17mm	11mm	15mm	22mm
3	13mm	12mm	11mm	18mm
Média ±	15,0 mm ± 2,0	12,3 mm ± 1,5	14,3 mm ± 3,0	19,6 mm ± 2,1

Tabela 1: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em mm).

Figura 5: Foto ilustrativa mostrando o resultado do teste de sensibilidade utilizando o meio de cultura Mueller – Hinton.

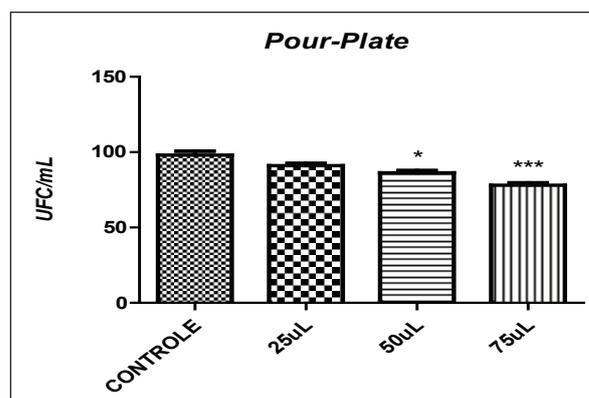


Teste antimicrobiano pela técnica de pour-plate

Cepa	UFC – Controle	25uL	50uL	75uL
<i>Propionibacterium acnes</i>	93	94	86	78
	102	90	89	75
	99	89	84	81
Média e DP (±)	98 ± 4,5	91,0 ± 2,6	*86,3 ± 2,5	***78 ± 3,0

Tabela 2: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos pela média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia - UFC).

Figura 6: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos pela média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia - UFC). Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey.



Discussão

De acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que o óleo essencial de melaleuca apresenta potencial antimicrobiano e praticamente não se mostrou citotóxico. Neste sentido, o teste de sensibilidade ao óleo essencial de melaleuca realizado através do meio Mueller Hinton, mostrou que o óleo essencial de melaleuca foi efetivo contra a cepa *Propionibacterium acnes*, mesmo não apresentando diferenças significativas em relação ao controle (clindamicina), que como dito anteriormente é um potente antibiótico com ação na *Propionibacterium acnes* (Tabela 1). Esses resultados corroboram os estudos realizados por Raman, Weir e Bloomfield em 1995, que mostraram atividade antimicrobiana contra *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; e Simões et al., em 2002, que mostraram resultados que indicam ampla ação contra uma gama de bactérias Gram positivo/negativas e contra diferentes fungos, entre eles, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypsum*. Por fim, podemos citar o trabalho de Carson et al. em 1995, onde foi testada a atividade *in vitro* do óleo essencial de melaleuca contra 66 cepas de *S. aureus*, sendo 64 delas resistentes a metilicina e observaram que todas as cepas foram sensíveis e apresentaram Concentração Inibitória Mínima de 0,312% e Concentração Bactericida Mínima de 0,625%.

Com o objetivo de verificarmos, através de outra técnica, o potencial antimicrobiano do óleo essencial de melaleuca, também foi realizado a metodologia *Pour-Plate*, e os resultados apresentados, ao contrário do teste de sensibilidade, mostraram redução significativa no número de UFC após realizarmos o tratamento com o óleo essencial de melaleuca. Vale ressaltar que o primordial no óleo essencial de Melaleuca é o teor de 1,8 cineol mais baixo possível e o de terpineol-4 mais alto possível. Pela ISO com 3% de cineol e 36% de terpineol-4 já está ótimo, sendo que o óleo estudado se enquadrado na qualidade KBA que é a máxima qualidade de Tea Tree.

Em relação à citotoxicidade, os testes realizados indicaram que as concentrações do óleo essencial de melaleuca utilizadas no trabalho não foram citotóxicas, uma vez que nem a técnica de azul de tripan e nem o MTT mostraram redução significativa na viabilidade de células L-929 (figura 3). Além disso, podemos observar na figura 4, que a extração de DNA mostrou integridade, indicando que não houve ativação de morte celular pela ausência de fragmentação do material genético. Neste sentido, alguns trabalhos mostram que a melaleuca apresenta toxicidade dose dependente, como demonstrou Söderberg e colaboradores em 1996 e Loughlin *et al*, em 2008. Deste modo, não podemos desconsiderar variáveis que podem justificar nossos resultados de citotoxicidade, como por exemplo, o tempo de exposição, que em alguns autores citados acima foi de 24h, mas com doses bem maiores do que as testadas neste trabalho. Além disso, a própria toxicidade dose-dependente deve ser levada em conta.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou uma ação antimicrobiana satisfatória sobre o *Propionibacterium acnes*, ao mesmo tempo em que não se mostrou citotóxico nas células L-929, nas concentrações testadas.

Referências Bibliográficas

- BASSETT, I. B.; PANNOWITZ, D. L.; BARNETSON, R. S. **A Comparative Study Of Tea-Tree Oil Versus Benzoylperoxide In The Treatment Of Acne**. Med. Aust., vol. 153, 1990. Pág 455.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. American Journal of Clinical Pathology, Washington, v. 45, 1966. Pág 493-496.
- BURT, S. **Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods - A Review**. International Journal of Food Microbiology, 2004. Pág. 223, 253.

- CARVALHO, J. C. J.; ALMANCA, C. C. J. **Formulário de Prescrição Fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2003. Pág 115, 117.
- CARVALHO, G. H; LEAL, P. F; MEIRELES, M. A. A. **Destilação por Arraste a Vapor de Alecrim, Camomila, Erva-Baleeira e Erva Doce: Estudo da Cinética de Extração**. XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2008.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. **Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties**. Clinical Microbiology Reviews, v.19, 2006. Pág 50, 62.
- CASTELO, A.V.M.; AFONSO, S.R.; MELO, R.R.; DEL MENEZZI, C.H.S.; CAMILO, J.; VIEIRA, R.F. **Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de Melaleuca alternifolia Cheel, na Região do Distrito Federal**. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2013.
- CORAZZA, S. **Aromacologia – Uma Ciência de Muitos Cheiros**. São Paulo: Editora SENAC, 2002. Pág 243, 412.
- COSTA, C. S.; BAGATIN, E. **Evidências sobre o Tratamento da Acne**. Centro Cochrane do Brasil e Departamento de Dermatologia da Escola Paulista de Medicina — Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp), 2013. Pág. 10.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. **O Modo de Ação Antimicrobiana do Óleo Essencial de Melaleuca Alternifolia (Tea Tree)**. Journal of Applied Microbiology. 2000. Pág 170, 175.
- FINLAY-JONES, J.; HART, P.; RILEY, T. **Anti-inflammatory Activity of Tea Tree Oil**. Nedlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 2001.
- HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F. et al. **Terpinen-4-Ol, The Main Component of The Essential Oil of Melaleuca alternifolia (Tea Tree Oil) Suppresses Inflammatory Mediator Production by Activated Human Monocytes**. Inflammation Research, v. 49, 2000. Pág 619.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. **Antifungal Activity of the Components of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil**. Appl. Microbiology. 2003. Pág 853.
- KWIECINSKI, 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, vol.33, 2008. Pág. 342 - 347.
- KOH, K. J. *et al.* **Tea Tree Oil Reduces Histamine-Induced Skin Inflammation**. British Journal of Dermatology, Austrália, vol. 147, 2002. Pág 121.
- LOUGHLIN, R.; GILMORE, B. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. **Comparison of The Cidal Activity of Tea Tree Oil and Terpinen-4-Ol Against Clinical Bacterial Skin Isolates and Human Fibroblast Cells**. Journal compilation - The Society for Applied Microbiology, 2008. Pág 428.
- MAIDEN & BETCHE. **Melaleuca alternifolia Cheel**. Plants For a Future, 2013.
- MARTINS, A. P.; NOGUEIRA, M. T.; COSTA, M. C.; SALGUEIRO L. **Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISSO**. Revista de Fitoterapia, 2011. Pag. 36 e 39.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R.N. **Estudo da Interferência de Óleos Essenciais Sobre a Atividade de Alguns Antibióticos Usados na Clínica**. Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 16, 2006. Pág 77, 79.
- OLIVEIRA, A.C.M.; FONTANA, A.; NEGRI, 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 Infeciosas de Origem Bucal**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, 2011. Pág 492, 499.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI E.; D' OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. **Determinação do Rendimento e Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Cymbopogon Citratus (DC.) Stapf em Função de Sazonalidade e Consorciamento**.

SciELO - Revista Brasileira de Farmacognosia, 2009.

SILVA, A.R. **Aromaterapia em Dermatologia Estética**. São Paulo: Roca, 2004. Pág 299, 324-5

SILVA, A. R. **Tudo Sobre Aromaterapia: Como Usa-Lá Para Melhorar sua Saúde Física, Emocional e Financeira**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca, 2001. Pág 302.

SIMÕES, R. P. *et al.* **Efeito do Óleo Essencial de Melaleuca Alternifolia Sobre a Infecção Estafilocócica**. Rev. Lecta, Bragança Paulista. 2002. Pág 143, 152.

SODERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREFC, R. **Toxic Effects of Some Conifer Resin Acids and Tea Tree Oil on Human Epithelial and Fibroblast Cells**. Elsevier Science Ireland Ltd., 1996. Pág 99.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbário Compêndio de Fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. Ltda., 2001.

VADEMÉCUM.; **Prescripción**. 4. ed. Barcelona: Masson, 2003. Pág 354.

VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. **The Antimicrobial Activity of Four Commercial Essential Oils in Combination with Conventional Antimicrobials**. Letters in Applied Microbiology, vol. 48, 2009. Pág. 440 - 446.

WALTERS, C. **Aromaterapia: Para uma Vida Saudável**. São Paulo: Könermann, 2000. Pág 90 e 91.

WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. **Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants**. Phytotherapy Research, v.19, 2005. Pág. 643 - 646.

WHO. **Monographs on selected medicinal plants**. Department of Essential Drugs and Medicines Policy, World Health Organization. 1999.