

Análise da Ação Bacteriolítica da *Melaleuca Alternifolia* nas Principais Bactérias de Interesse Médico

Analysis of Bacteriolítica *Melaleuca alternifolia* Action in Major Bacteria of Interest Medical

Gildemar José Bezerra Crispim^a; Manoela Carolina Ribeiro Nunes de Lacerda^a

^aFaculdade Anhanguera de Brasília, DF, Brasil

Resumo

Sabendo se que as bactérias possuem um grande potencial de mutação genética o que as torna resistentes a muitos antimicrobianos, sabendo se ainda que os números de antibióticos sintéticos disponíveis na farmacopeia não acompanham a evolução desta mutação genética, faz se necessário o estudo de novos compostos antimicrobianos, o objetivo deste estudo foi identificar se existe ação bacteriolítica no óleo puro e no extrato aquoso de *Melaleuca alternifolia* em diferentes concentrações, levando em consideração a literatura que descreve a *Melaleuca alternifolia* como um fitoterápico com possível ação antimicrobiana, os testes foram realizados frente às principais cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse médico. O método utilizado para realização deste experimento foi o teste de disco difusão em ágar.

Palavras-chave: Gram Positivas. Gram Negativas. Bacteriolítica.

Abstract

knowing if that bacteria have one big potential of mutation genetic the that the makes resistant the many antimicrobial known to yet what the numbers of antibiotics synthetic available in pharmacopoeia not follow the evolution this mutation genetic, make if necessary the study of new antimicrobial compounds, the objective this study was identify if there action bacteriological is the oil pure and aqueous extract in different concentrations, take in consideration the literature that describes in Melaleuca alternifolia as possible action antimicrobial the tests were performed against the major strains of Gram positive and Gram negative bacteria of medical interest. The method used for this experiment was the disk diffusion test in agar.

Keywords: Gram Positive. Gram Negative. Bacteriolítica.

1 Introdução

As bactérias surgiram na terra há bilhões de anos e para sobreviver desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos que são encontrados livres na natureza (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Mundialmente existem cada vez mais bactérias resistentes e há cada vez um número maior de estirpes resistentes a múltiplas drogas (particularmente em meio hospitalar), aumentando a mortalidade, os custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por infecções. Nos Estados Unidos, o Center for Disease Control and Prevention (CDC) estimou que anualmente cerca de dois milhões de indivíduos adquirem uma infecção enquanto internados, resultando daí noventa mil mortes (KLEVENS *et al.*, 2007).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas sintéticas já conhecidas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem durante seu processo de divisão celular e resultam de erros de cópia na sequência de bases do DNA cromossômico. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Isto

ocorre devido aos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídeos e transposons (TAVARES, 2000).

Quando um antibiótico é descoberto e introduzido no mercado, sua utilidade clínica começa a diminuir até um ponto em que há um aumento na restrição de seu uso. Esta restrição é provocada pelo surgimento de cepas resistentes (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). O fenômeno da resistência é, de fato, algo muito preocupante uma vez que existem cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos atualmente e, neste sentido, há uma forte necessidade de se produzir novas substâncias que não só tenham bom espectro de atividade, mas que possuam novos mecanismos de ação (NISHAMINY, 2005).

Com isso a medicina popular tem despertado o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares que enriquecem o conhecimento a respeito do uso terapêutico de plantas medicinais (MACIEL *et al.*, 2002). Na África, por exemplo, 80% da população dependem do uso destes medicamentos, os quais representam terapias alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001).

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), aproximadamente 80% da população mundial utilizam a medicina alternativa, principalmente medicamentos fitoterápicos, para suprir a ausência de atendimento médico

primário (ELIZABETSKY, 1997). O conhecimento popular tem trazido grande contribuição para divulgação do uso de plantas medicinais no tratamento de doenças. Nas últimas décadas tem aumentado o interesse por medicamentos alternativos, na maior parte deles proveniente de extratos naturais, desencadeando uma busca pela validação do uso desses medicamentos, visto os efeitos terapêuticos favoráveis *in vitro* e *in vivo* (CARSON, HAMMER, RILEY 2006).

Este estudo objetiva identificar a possível ação bacteriolítica do óleo e do extrato aquoso de *Melaleuca alternifolia* em diferentes concentrações sobre as cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas de principal interesse médico pelo método de difusão de disco.

2 Material e Métodos

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 *Melaleuca alternifolia*

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família *Myrtaceae*, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca alternifolia* é comumente conhecida na Austrália como “árvore de chá”, florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). As árvores de *Melaleuca alternifolia* podem atingir sete metros de altura, têm uma casca fina e as folhas longas e pontiagudas que, as folhas quando partidas, emitem um aroma forte. Podem ser cortadas após 15 meses do cultivo e recortadas a cada ano, pois o crescimento é rápido (WILLIANS, 1990).

Existem algumas evidências de que os aborígenes australianos esmagavam folhas de *Melaleuca alternifolia* para obter cataplasmas de ação antibacteriana séculos antes do conhecimento científico sobre os microrganismos (WILLIANS, 1990). Estudos iniciais sobre a atividade antimicrobiana de *Melaleuca alternifolia* foram descritos na literatura ocidental a partir de 1962 por Peña a partir de investigações com *Trichomonas vaginalis*.

O principal produto da *Melaleuca alternifolia* é o óleo essencial (TTO – Tea Tree Oil), que possui uma grande importância medicinal por ter uma comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas. É extraído da planta por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Atualmente, o TTO é empregado como agente antimicrobiano ou preventivo em escala farmacêutica ou cosmética e a indicação vai desde a utilização em lesões, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas, cremes vaginais, cremes para a pele até dentifrícios (COX *et al.*, 2001).

O óleo produzido estável e facilmente estocado, transportado e é comercializado por farmácias homeopáticas. As grandes plantações australianas têm garantido um suprimento de óleo em grande quantidade e de boa qualidade, é um óleo parcialmente solúvel em água. Para se obter solução

aquosa do óleo, é necessário adicionar agentes emulsificantes, tais como Tween 20 ou Tween 80, os quais não alteram as propriedades antimicrobianas (WILLIANS, 1990).

O TTO possui aproximadamente 100 componentes, sendo os principais o terpinen-4-ol, gama-terpieno, α -terpieno, 1,8 cineol e α -pineno (COX *et al.*, 2001)

O Terpinen-4-ol está presente em 30-40% da composição (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006) sendo o componente que detém a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana. 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; HAMMER; RILEY, 2006).

O 1,8-cineol, 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 (CARSON *et al.*, 2002).

Contudo, por possuir cerca de 100 componentes, existe a possibilidade de não ter sido pesquisado todo o potencial de atuação. É possível que outros elementos, ainda não avaliados, contribuam para a atividade antimicrobiana com mecanismo de ação diferente daquele já encontrado (HAMMER, 2003).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae* e tem uma forma esférica, fazem parte do grupo de bactérias Gram negativas. Atualmente, o *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *Staphylococcus aureus*, por ser um patógeno considerado oportunista, está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos uma vez na corrente sanguínea pode atingir qualquer órgão (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005).

O *Staphylococcus aureus*, cocos Gram positivos em forma de cachos, coagulase positivos, β -hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas. Além de imóveis, em geral não capsulados e anaeróbios facultativos (BERNARDES; JORGE; LEÃO, 2004).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *Staphylococcus aureus*, sendo a cavidade nasal do homem seu principal habitat (FRANCO; LANDGRAF, 2005) É a partir da cavidade nasal que o microrganismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos, ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo. Os portadores nasais de *Staphylococcus aureus* ao manipularem alimentos podem se tornar importante fonte de contaminação para os alimentos

(FRANCO; LANDGRAF, 2005) devido à produção de exotoxinas durante o crescimento em alimentos contaminados (CAVALCANTI, 2005)

A bacteremia pode causar infecções em sítios anatômicos distantes, como endocardites, osteomielites, pioartrites e formação de abscessos metastáticos, em particular em pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro. O *Staphylococcus aureus* é a segunda maior causa de meningites associadas a derivações ventrículo peritoneais, sendo um dos muitos agentes responsáveis por peritonite em pacientes submetidos à diálise peritoneal contínua (CAVALCANTI, 2005)

O *Staphylococcus aureus* também traz riscos para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e HIV-positivos, visto que pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais) (CARVALHO, 2005).

2.1.3 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes ou *estreptococo* beta-hemolítico Gram-positivo do grupo A de Lancefield (SCALABRIN *et al.*, 2003) que é um critério usado para classificação onde os estreptococos são classificados de acordo com a característica antigênica de polissacarídeos da parede celular, sendo divididos em 21 grupos identificados por letras que vão de A a H e de K a T (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2005).

Streptococcus Pyogenes é a espécie bacteriana mais frequentemente associada à etiologia de infecções primárias da faringe e amígdalas (SCALABRIN *et al.*, 2003). Sob o ponto de vista clínico, os *estreptococos* são reconhecidos como importantes patógenos humanos, sendo responsáveis por diversos quadros infecciosos como faringite, escarlatina, febre reumática, erisipela, impetigo contagioso e glomerulonefrite pós-estreptocócica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

As infecções primárias da faringe e amígdalas podem ocorrer em qualquer faixa etária, porém são comuns em crianças e adolescentes com idade variando entre cinco e quinze anos. O período de incubação usual da faringoamigdalite estreptocócica é de doze a vinte e quatro horas. O paciente pode apresentar febre alta e dor à deglutição, com mal-estar geral, anorexia e astenia, sintomas que principalmente em crianças podem ser acompanhados por náuseas, vômitos e dor abdominal (SCALABRIN *et al.*, 2003).

A alta incidência de infecção por *estreptococos* do grupo A no Brasil com a presença de graves sequelas não supurativas e a ameaça de surgimento de cepas multirresistentes demonstram a necessidade de um manuseio mais adequado e cuidadoso dessas bactérias e um cuidado maior quando houver o contato com pessoas infectadas, bem como a prevenção das sequelas com o tratamento correto de uma infecção suspeita clinicamente e diagnosticada

laboratorialmente (SANTOS; BEREZIN, 2005).

2.1.4 *Enterococcus spp.*

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, as colônias são, em geral, não hemolíticas, mas podem ser alfa ou beta hemolítica, catalase negativos. São necessários testes fenotípicos selecionados, como por exemplo: reações de fermentação, hidrólise da pirrolidoni-beta-naftilamida, motilidade, produção de pigmento para diferenciar as espécies de *enterococcus* (PARADELLA; KOGA-ITO; JOEGE, 2007).

Enterococcus spp. é um patógenos oportunistas que habitam a microbiota do homem e de outros animais, incluindo animais de companhia, produtores de alimentos e silvestres (AARESTRUP; BUTAYE; WOLGANG, 2002). A maior parte das infecções por *enterococcus* origina-se da microbiota normal do paciente, embora os microrganismos possam também ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (MURRAY, 2004).

O principal reservatório humano dos *enterococcus* é o trato gastrointestinal, porém ele pode ser encontrado, embora com menos frequência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (KONEMAN, 2001).

Os *enterococcus* são microorganismos comensais que frequentemente causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo e/ou que receberam múltiplos tipos de terapia antimicrobiana (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003).

Enterococcus apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos e têm adquirido novos fenótipos de resistência, destacando-se os *enterococcus* resistentes à vancomicina (WILLEMS; BONTEM, 2007).

2.1.5 *Salmonella spp.*

As bactérias Gram negativas do gênero *Salmonellas spp.* são pertencentes a família Enterobacteriaceae. Relaciona-se a pequenos bastonetes, não esporulados, anaeróbios facultativos, lactose, uréase e oxidase negativas, sendo a maioria dos sorotipos móveis devido à presença de flagelos peritríquios. São bactérias produtoras de gás a partir da fermentação da glicose e ácido sulfídrico. As *salmonellas* também são capazes de reduzir nitratos a nitritos e utilizar citratos como fonte de carbono. O agente habita o trato gastrointestinal do homem e de outros animais, sendo amplamente difundido na natureza. A patogenicidade e a virulência estão relacionadas com o tipo sorológico da bactéria (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A transmissão da *Salmonella spp.* para o homem geralmente ocorre pelo consumo de alimentos contaminados, embora a transmissão pessoa a pessoa possa ocorrer particularmente nos hospitais ou, ainda, através do contato com animais infectados, principalmente entre veterinários e

trabalhadores de granjas e fazendas (WELLS *et al.*, 2001).

A patologia decorrente da *Salmonella spp.* se dá pela transmissão fecal-oral que ocorre através de água e alimentos contaminados, e a grande incidência é encontrada em populações com grande densidade populacional, vivendo em precárias condições higiênicas sanitárias e socioeconômicas (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).

Uma ampla variedade de alimentos pode ser contaminada com a *Salmonella spp.*, pois aqueles que possuem alto teor de umidade, de proteína e de carboidratos, como carne bovina, suínos, aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas recheadas, são mais susceptíveis à deterioração (BASTI, 2006). Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais minimamente processados também podem ser veiculadores de salmoneloses (OKUKU, 2006) e essa contaminação ocorre devido ao controle inadequado da temperatura, da adoção de práticas de manipulação incorretas ou por contaminação de alimentos crus em contato com alimentos processados (SILVA, 2005).

As infecções entéricas em decorrência de outras *salmonellas*, ou também chamadas de salmoneloses, desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como principais sintomas: dores abdominais, diarreia forte, febre baixa, enjoo e vômito, alguns casos são necessária a hospitalização devido à desidratação, sendo raro os casos clínicos fatais. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas após a infecção, podendo durar os sintomas até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* e o episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos (SHINOHARA *et al.*, 2008).

2.1.6 *Klebsiella spp.*

Membros do gênero *Klebsiella*, especialmente *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, são patógenos oportunistas associados a infecções nosocomiais graves, como septicemia, pneumonia e infecções do trato urinário. (BRISSE, 2001).

Em recente estudo multicêntrico brasileiro, Gram-negativos foram os principais agentes associados à infecção de corrente sanguínea de origem hospitalar, sendo *Klebsiella spp.* o principal isolado (MARRA *et al.*, 2011). Estas espécies são agentes patogênicos oportunistas comuns no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais; podem ser encontradas em água, solos, vegetação e esgoto (BAGLEY, 1985).

As bacteremias causadas por *Klebsiella spp.* podem ocorrer após uma complicação urinária, infecções do trato gastrointestinal ou respiratório e os seus principais fatores de risco são: uso de cateter venoso central, idade avançada, internação prolongada, internação em unidade de terapia intensiva, transplante de órgãos, doença hepática crônica, diálise renal e câncer (MEATHERALL *et al.*, 2009; VINCENT, 2003).

A ocorrência de infecções causadas por espécies de

Klebsiella causam grande preocupação pela capacidade que possuem em produzir enzimas chamadas β -lactamases de espectro ampliado (*extended-spectrum* β -lactamase – ESBP) (GNIADKOWSKI, 2001). A produção de β -lactamases, entre as bactérias Gram-negativas, é o mecanismo mais importante de resistência contra antimicrobianos β -lactâmicos (SANDERS; SANDERS, 1992).

2.1.7 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885, sendo denominada inicialmente de *Bacterium coli*. Por fazer parte da microbiota da maioria dos animais e do homem, ela foi por muito tempo considerada não patogênica. No entanto, ao longo de anos de pesquisas esta enterobactéria vem sendo associada a infecções localizadas e sistêmicas tanto em seres humanos como em animais (KONEMAN *et al.*, 1997).

A *Escherichia coli* é um coco-bacilo Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, em forma de bastonetes, não esporulado, a maioria móvel e aeróbio ou anaeróbio facultativo, predominante na microbiota intestinal dos seres humanos e animais de sangue quente (KONEMAN *et al.*, 1997). É um microrganismo que coloniza tipicamente o trato gastrointestinal infantil dentro de poucas horas de vida, e dali em diante, a *Escherichia coli* e o hospedeiro obtêm benefícios mútuos, como a fabricação de vitaminas K e B (NATARO; KAPER, 1998).

A *Escherichia coli* são consideradas inofensivas, ficam confinada na luz intestinal do intestino grosso, contudo em um hospedeiro debilitado ou imunossuprimido ou quando barreiras gastrintestinais são violadas, as cepas de *Escherichia coli* mesmo as inofensivas não patogênicas podem causar uma infecção. Três infecções em geral são resultantes de cepas patogênicas de *Escherichia coli*, são as infecções do trato urinário, septicemia e diarreia (NATARO; KAPER, 1998).

2.2 Metodologia

5 mL de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, adquirido em Essencial Farmácia de Manipulação. Emulsificante Tween 80. Placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Muller Hinton e meio enriquecido Ágar Sangue. Paquímetro. Alça de platina descartável. Discos de papel filtro. Pinça estéril. Capela de fluxo laminar. Estufa bacteriológica.

Cepas das bactérias (*Staphylococcus Aureus* ATCCBAA977, *Streptococcus Pyogenes* ATCC1740513-1, *Enterococcus spp.* ATCC51299, *Salmonella ssp.* ATCC1239R, *Klebsiella spp.* ATCC13883, *Escherichia Coli* ATCC35218).

O método adotado para realização deste experimento foi o método de disco-difusão que foi idealizado por Bauer *et al.*, (1966), e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios clínicos de microbiologia no Brasil. O princípio deste método baseia-se na difusão de um antimicrobiano, impregnado em um disco de papel-filtro em uma placa de petri com meio de cultura e as cepas a serem

testadas. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM) (JORGENSEN; TURNIDGER; WASHINGTON, 1999). Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano (NCCLS, 2000).

O teste de disco-difusão é um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados (JORGENSEN, 1997).

Preparação das soluções dos óleos essenciais: Em tubo de ensaio estéril foi adicionado 0,4 mL do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, 0,04 mL de Tween 80 ilustrado na Figura 1 e 5mL de água destilada estéril, sendo agitado por 5 minutos usando-se aparelho Vortex (Fanem), obtendo-se então uma solução com concentração de 8% do óleo essencial. A partir de tal solução, utilizando o procedimento de diluição seriada, obteve-se a solução com concentração correspondente a Concentração Inibitória Mínima-CIM dos óleos essenciais ensaiados (ALLEGRIN *et. al.*, 1973).

Figura 1: Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e emulsificante Tween 80



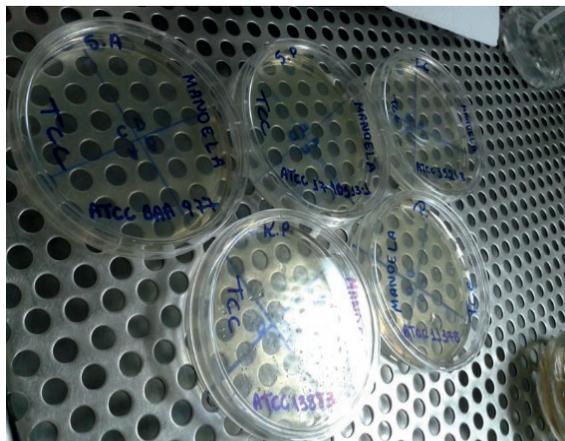
A partir destas diluições obteve-se a solução aquosa em quatro concentrações diferentes sendo de 8%, 25%, 50% e 100% como apresentado na Figura 2.

Figura 2: Diluições do óleo e extrato aquoso de *Melaleuca alternifolia*



A partir de então as bactérias foram semeadas nas placas de Petri pelo método de esgotamento de alça, em seguida os discos de papel filtro impregnados com as diferentes concentrações do extrato de *Melaleuca* e foram fixados nas placas com a ajuda da pinça estéril, depois disso as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton, onde as cepas de bactérias foram semeadas e os discos foram fixados



Além da utilização de meio de cultura Ágar Mueller Hinton que é o meio de cultura padrão para realização do teste de disco difusão, foi utilizado também um meio de cultura enriquecido que foi o meio Ágar Sangue Figura 4 para incrementar a confirmação dos resultados.

Figura 4: Ágar Sangue



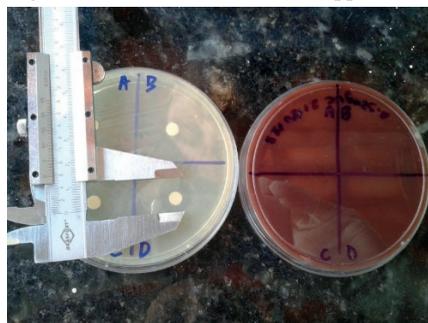
3 Resultados e Discussão

A bactéria do gênero *Enterococcus ssp.*, apresentou-se totalmente resistente em todas as concentrações das soluções aquosas do extrato de *Melaleuca* testadas e ao óleo essencial puro, não formando nenhum halo de inibição conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Cultura de *Enterococcus spp.*



Figura 8: Cultura de *Salmonella spp.*



Os meios de cultura com as cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp* apresentaram diâmetros de halos variando entre 5 mm e 12 mm nas concentrações B (25%), C (75%) e D(100%), e apresentaram se resistentes na concentrações A conforme ilustrado nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

Figura 9: Cultura de *Streptococcus spp.*

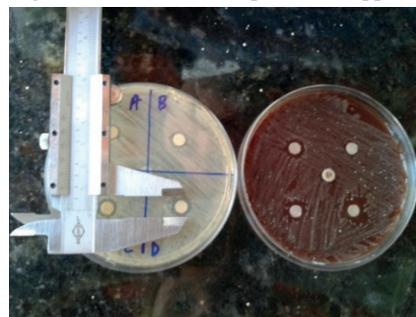


Figura 6: Cultura de *Escherichia coli*, verificação dos halos de inibição



Figura 10: Cultura de *Staphylococcus aureus*

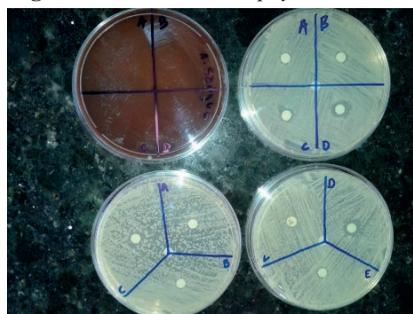


Figura 7: Cultura de *Klebsiella spp.*



As aferições dos diâmetros dos halos formados com o extrato aquoso e o óleo essencial após o crescimento das bactérias foram descritos detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1: Sensibilidade das cepas bacterianas frente à ação do óleo e extrato aquoso de *Melaleuca* em meio de cultura ágar Mueller Hinton. (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano).

Microorganismo	Concentração A 8%	Concentração B 25%	Concentração C 50%	Concentração D 100%
<i>Staphylococcus aures</i> ATCCBAA977	0 mm	0 mm	6 mm	9 mm
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC1740513-1	0 mm	0 mm	5 mm	6 mm
<i>Enterococcus spp.</i> ATCC51299	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Salmonella spp.</i> ATCC1239R	0 mm	8 mm	8 mm	12 mm
<i>Klebsiella spp.</i> ATCC13883	0 mm	0 mm	5 mm	5 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	0 mm	0 mm	5 mm	6 mm

A Tabela foi construída com base nos padrões estabelecidos pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2011)

que é responsável pela padronização dos antibiogramas. Para comparação com os halos formados pela *Melaleuca*

foi escolhido o diâmetro dos halos padrões da Ampicilina descritos pela CLSI (2011). A Ampicilina foi escolhida por ser um antibiótico eficiente no combate tanto das bactérias Gram

positivas quanto no combate das bactérias Gram negativas. A Tabela 2 descreve detalhadamente a formação do halos da Ampicilina nas bactérias utilizadas neste estudo.

Tabela 2: Halos de inibição dos microrganismos submetidos à Ampicilina

Microorganismo	Resistente	Ampicilina Intermediário	Sensível
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 28 mm	-	≥ 29 mm
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	≥ 24 mm
<i>Enterococcus spp.</i>	≤ 14 mm	-	≥ 15 mm
<i>Salmonella ssp.</i>	≤ 13 mm	14 – 16 mm	≥ 17 mm
<i>Klebsiella spp.</i>	≤ 13 mm	14 – 16 mm	≥ 17 mm
<i>Escherichia coli</i>	≤ 13 mm	14 – 16 mm	≥ 17 mm

A partir da verificação dos tamanhos dos halos formados no teste de antibiograma com a utilização do extrato de *Melaleuca alternifolia* nas diferentes formulações trabalhadas e o óleo essencial puro, em comparação a ação bacteriolítica de um antimicrobiano sintético e padrão como a Ampicilina, foram possíveis de identificar que as formulações de *Melaleuca alternifolia* não apresentaram halos inibitórios satisfatórios para serem enquadrados com potencial bacteriolítico quando comparado a antimicrobianos já utilizados contra as cepas testadas neste estudo.

Quando comparado a outros estudos, como Packer *et al.* (2007), onde resultado com o óleo essencial de *Melaleuca* apresentou atividade bacteriostática contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e os halos de inibição obtidos foram de diâmetros maiores que 10mm, diferindo assim deste estudo, talvez por ter sido abordado um método e meios de cultura diferentes aos empregados nesta pesquisa.

Porém observando a partir da conclusão de Nascimento *et al.*, (2007) a falta de um método padrão para realização de estudos com óleos essenciais é algo que dificulta a comparação entre resultados, necessitando então uma padronização de métodos, meios de cultura, emulsificantes e densidade do inóculo. Para que então estes estudos sejam realizados com mais precisão e eficiência.

4 Conclusão

As formulações de 8%, 25%, 50% e 100% não demonstraram eficácia como antimicrobiano neste estudo. Como o óleo de *Melaleuca alternifolia* também é utilizado junto com vários outros compostos, encontrados em cremes, sabonetes, como os manipulados em farmácias homeopáticas pode haver ainda algumas outras substâncias que se associe aos componentes do óleo potencializando a ação antimicrobiana da *Melaleuca alternifolia*.

Um halo de inibição que chamou atenção foi o da *Salmonella ss.* pois formou 12 mm de diâmetro quando submetido ao óleo essencial puro de *Melaleuca alternifolia*, e foi o que mais se aproximou dos tamanhos dos halos padrões

do antimicrobiano (Ampicilina), podendo talvez gerar uma ação bacteriolítica intermediária.

Estudos de casos específicos como este que testou a ação bacteriolítica do extrato aquoso em diferentes concentrações e do óleo essencial puro de *Melaleuca alternifolia* contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse médico são escassos. Fazendo se sempre necessários novos estudos contra os principais patógenos humanos. A dificuldade de se padronizar um modelo experimental também é um ponto bastante motivador e requer um amplo estudo. Tendo em vista que algumas empresas cosméticas já utilizam os compostos de *Melaleuca alternifolia* com finalidade antimicrobiana. Porém os resultados mostram que provavelmente deve ocorrer a potencialização da fórmula.

As concentrações utilizadas podem não ser as ideias para conclusão do potencial bacteriolítico da *Melaleuca alternifolia*, talvez o uso seletivo dos mais de 100 constituintes da planta amplie nosso conhecimento em relação aos efeitos bacteriolíticos ou bacteriostático.

Referências

- AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P.; WOLGANG, W. Nonhuman reservoirs of Enterococci. In: GILMORE, M.S. (Ed). *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington: ASM, 2002.
- ALLEGRI, M.; SIMÉON, M.; MAILLOS, H. *Èmulsions et applications en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier*, v.33, p.73-86, 1973.
- ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? *Bull World Health Organ.*, v.79, n.7, p.691-692, 2001.
- BAGLEY, S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control*, v.6, p.52-58, 1985.
- BARRETT, J.F. Can Biotech deliver new antibiotics? *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, n.5, p.498-503, 2005.
- BASTI, A.A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Control.*, v.17, n.3, p.83-188, 2006.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.2413-2415, 1966.
- BERNARDES, R.C.; JORGE, A.O.C.; LEÃO, M.V.P. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de pacientes

- hospitalizados em São José dos Campos. *Rev. Biociênc.*, v.10, n.1, p.73-78, 2004.
- BRISSE, S.V.J. Phylogenetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by random amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and Automated Ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V.51, p.915-924, 2001.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Reviews*, v.19, n.1, p.50-62, 2006.
- CARVALHO, C. *et al.* Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. *J. Pediatr.*, v.81, n.1, p.29-33, 2005.
- CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz. J. Infect. Dis.*, v.9, n.1, p.70-76, 2005.
- CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.9, n.1, p.56-63, 2005.
- CLSI publication M100-S21 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2011.
- CONNOR, B. A, SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infectious Dis.*, v.5, n.10, p.623-628, 2005.
- COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.492-7, 2001.
- DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress *J. Antibióticos*. v.62, n.5, p.5-16, 2009.
- ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. *Ciênc. Cultura*, v.39, n.8, p.697-702, 1997.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005.
- GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended spectrum β -lactamases producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.7, p.597-608, 2001.
- GUSTAFSON, J.E. *et al.* Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Let. Appl. Microbiol.*, v.26, p.194-198, 1998.
- HAMMER, K.A. *et al.* Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.18, p.389-392, 2003.
- JORGENSEN, J.H. Laboratory issues in the detection and reporting antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.*, v.2, p.790-792, 1997.
- JORGENSEN, J.H.; TURNIDGER, J.D.; WASHINGTON, J.A. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, R.P. *et al. Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1999, p.1526-1543.
- KLEVENS, R. *et al.* Burden of Healthcare-Associated Infections in the United States, 2002. *Pub. Rep.*, v.22, p.160-166, 2007.
- KONEMAM, E.W. *et al.* Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott, 1997.
- KONEMAN, E.W. *et al. Diagnóstico microbiológico*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova*, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J. Clin. Microbiol.*, v.49, p.1866-1871, 2011.
- MEATHERALL, B.L. *et al.* Incidence, risk factors, and outcomes of *klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am. J. Med.*, v.122, p.866-873, 2009.
- MURRAY, P. *et al. Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- NASCIMENTO, P.F.C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. Farmacognosia*, p.108-113, 2007.
- NATARO, J.B.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, p.142-201, 1998.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.
- NISHAMINY, K. Tigecycline: a new glycylcycline antimicrobial agent *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, v.63, p.1235, 2006.
- OLIVEIRA, A. P. *et al. Enciclopédia biosfera*. Goiânia: Centro Científico Conhecer, 2012.
- PACKER, J.F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev. Bras. Farmacognosia*, p.102-107, 2007.
- PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev. Odontol. UNESP*, v.36, n.2, p.163-68, 2007.
- PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. São Paulo: Makron Books, 2005.
- SANDERS, C.C.; SANDERS JUNIOR, W.E. Beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.*, v.15, p.824-839, 1992.
- SANTOS, A.G.P.; BEREZIN, E.N. Comparação entre métodos clínicos e laboratoriais no diagnóstico das faringotonsilites estreptocócicas. *J. Pediatr.*, v.81, n.1, p.23-28, 2005.
- SCALABRIN, R. *et al.* Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v.69 n.6, 2003.
- SHINOHARA, N.K.S. *et al. Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.
- SILVA JUNIOR E. A. *Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação*. São Paulo: Varela; 2005.
- TAVARES, W. Bactérias Gram positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, n.3, p.281-301, 2000.
- TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial Resistance. In: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 2003, p. 1178-1181.
- UKUKU, D.O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and recontamination with *Salmonella*. *Food Microbiol.*, v.23, n.3, p.289-293, 2006.
- VINCENT, J.L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The Lancet*, v.361, p.2068-2077, 2003.
- WELLS, S.J.; FEDORKA-CRAY, P.J.; DARGARTZ, D.A. Faecal shedding of *Salmonella* spp. By dairy cows on farmland at cull cow markets. *J. Food Protection*, v.64, n.1, p.3-11, 2001.

WILLEMS, R.J.L.; BONTEN, M.J.M. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.20, p.384-390, 2007.

WILLIAMS, L.R. *et al.* Antimicrobial activity of oil of melaleuca (tea tree oil). Its potential use in cosmetics and toiletries. *Cosmet. Aerosols Toil Aust.*, v.4, n.4, p.12-22, 1990.