

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo

Antimicrobial activity of *Melaleuca* essential oil and its incorporation into a mucocutaneous cream

DOI 10.32712/2446-4775.2020.818

Correa, Leonardo Tibiriçá¹; Nicoletti, Maria Aparecida²; De Amorim, Cledja Soares¹; Da Costa, Amanda Ramos¹; Leoni, Luís Antônio Bafille³; Munõz; Juliana Weckx Peña⁴, Fukushima, André Rinaldi^{4,5}.

¹Universidade São Judas Tadeu. Rua Taquari, 546, Mooca, CEP 03166-000, São Paulo, SP, Brasil.

²Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. FARMUSP. Avenida Professor Lineu Prestes, 580, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

³Centro Universitário das Américas (Reitoria). Rua Augusta, 1508, Centro, CEP 01305-100, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Butantã, CEP 05508-010, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências da Saúde IGESP (FASIG), Departamento de Pesquisa e Extensão. Rua da Consolação, 1025. Centro, CEP 01301-000, São Paulo, SP, Brasil.

*Correspondência: maria-nicoletti@uol.com.br.

Resumo

Óleos essenciais com atividade antimicrobiana têm despertado interesse como alternativa terapêutica. Esse trabalho teve por objetivo identificar a concentração inibitória mínima (CIM₅₀) do óleo de *Melaleuca* frente a três microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, com a finalidade de incorporá-lo em um creme O/A com atividade antimicrobiana e avaliar sua estabilidade preliminar durante 10 dias, utilizando métodos estatísticos para concluir este estudo. A metodologia utilizada foi realizada por meio de microdiluição seriada em placa de ELISA estéril. Os microrganismos foram suspensos em solução salina utilizando a escala McFarland (10⁶ para fungo e 10³ para bactéria). A CIM₅₀ correspondeu a redução em 50% do halo de crescimento na menor concentração de emulsão de óleo de *Melaleuca*. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações mínimas inibitórias para os microrganismos avaliados foram 9,0 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, 4,5 mg/mL para *Escherichia coli* e 4,5 mg/mL para *Candida albicans*. O creme desenvolvido não apresentou alterações significativas em relação à densidade e pH bem como às características físicas avaliadas. Com os resultados obtidos conclui-se que é promissor o desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas com a incorporação do óleo de *Melaleuca* como possível nova alternativa terapêutica frente aos microrganismos estudados.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. Óleo de *melaleuca*. Agentes antimicrobianos.

Abstract

Essential oils with antimicrobial activity have aroused researchers' interest for being a therapeutic alternative when properly studied. To identify the minimal inhibitory concentration (MIC₅₀) of *melaleuca* oil against three microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, when incorporated in O/W cream to evaluate its preliminary stability for 10 days, using statistical methods to complete this study. The assay was performed by serial micro-dilution in a sterile ELISA plate. The microorganisms were suspended in saline solution by using the McFarland scale (10⁶ for fungus and 10³ for bacteria). CIM₅₀ corresponded to 50% reduction of growth halo in the lowest concentration of *melaleuca* O/W cream. The minimum inhibitory concentrations for the evaluated microorganisms were 9.0 mg/mL for *Staphylococcus aureus*, 4.5 mg/mL for *Escherichia coli* and 4.5 mg/mL for *Candida albicans*. The developed cream did not show significant changes in density, pH or in its physical characteristics. The obtained results are promising for the development of pharmaceutical semi solid dosage forms with the incorporation of *melaleuca* oil as a possible new therapeutic alternative against the microorganisms studied.

Keywords: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. *Melaleuca* oil. Antimicrobial agentes.

Introdução

Escherichia coli (*E. coli*) é um dos principais microrganismos causadores de infecções hospitalares, sobretudo infecções intestinais e urinárias, em muitos países. São bactérias, em geral, anaeróbicas facultativas e Gram-negativas. *E. coli* possui ampla gama de diversidade patogênica, compreendendo cinco categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e espécies associadas a meningites, infecções extra intestinais e infecções urinárias, entretanto, é membro da microbiota intestinal normal do ser humano^[1].

As infecções do trato urinário (ITU) podem ser assintomáticas quando há apenas colonização (aumento de número) de bactérias, denominada de bacteriúria ou sintomática, de ocorrência mais comum na população, onde se divide de acordo com a localização da infecção como: cistite e apresenta disúria, polaciúria, hematúria e dor suprapúbica e lombar e, em pielonefrite, desencadeando sintomas como febre, dor na lombar e nos flancos, náuseas e vômito, havendo risco de evolução para sepse^[2,3].

Os estafilococos são cocos Gram-positivos que apresentam ampla gama de condições ambientais e considerável faixa de pH de sobrevivência. São comumente encontrados na microbiota humana do tipo comensal, entretanto, *Staphylococcus aureus* demonstra ser um patógeno oportunista. Quando instalada a infecção considera-se três categorias diferentes de doenças: superficiais (infecção supurativa em tecidos moles), profundas (disseminação sistêmica por bacteremia) e toxigênica (síndrome de produção de toxinas por ação sistêmica ou à distância)^[4].

Em estudo realizado no hospital universitário^[5] foram analisadas 512 fichas de notificação de infecção hospitalar ocorridas ao longo de 2007. Destas infecções, 20% correspondiam ao agente causador

Staphylococcus aureus, 10% *Escherichia coli* e 9% *Candida* sp. *Staphylococcus aureus* dispunha resistência a eritromicina (66,0%), oxacilina (77,3%) e penicilina (84,9%)^[5].

A candidíase, também conhecida como candidose é uma infecção oportunista causada por fungos do gênero *Candida*, sendo o mais conhecido, a espécie *Candida albicans*. Ela tem sido isolada da boca, trato gastrointestinal, orofaringe, vagina e pele de indivíduos saudáveis. Em maior frequência, a candidíase é do tipo endógena, por exemplo, doenças crônicas, neoplasias, tuberculose, uso de antibióticos, introdução de sonda, traumatismos, dentre outras em decorrência da diminuição da resistência do hospedeiro, tendo poder invasivo principalmente em pacientes debilitados (antibioticoterapia ou imunossupressores). Em nível sistêmico é grave e de difícil isolamento a partir do sangue. Atualmente trata-se com nistatina, fluconazol, anfotericina B por via oral^[6].

Fundamentação Teórica

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em relação às Práticas Integrativas e Complementares, as plantas medicinais são instrumentos importantes da assistência farmacêutica considerando que em países em vias de desenvolvimento depende delas na área de Atenção Primária à Saúde (Atenção Básica) e nos países industrializados o uso de produtos da medicina tradicional tem sido empregado por 70 a 90% da população. No Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais em cuidados com a saúde^[7].

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos^[8]. O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, incluindo, aproximadamente, 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca artemifolia* (*M. artemifolia*) é comumente conhecida como “Árvore de chá” (*Tea Tree*) florescendo em áreas de pântano. Seu óleo é extraído da planta por hidrodestilação (destilação por arraste a vapor). Possui atividade bactericida e fungicida contra diversos patógenos humanos, sendo utilizados em formulações de uso tópico^[9-11]. Apresenta como marcadores fitoquímicos: α -Terpinene, γ -Terpinene e Terpinen-4-ol^[12].

Conforme revisão de literatura^[11] realizada para a *Melaleuca artemifolia*, os estudos iniciais da atividade antimicrobiana da planta foram com a utilização de *Trichomonas vaginalis*. Atualmente, possui cerca de 100 componentes, sendo alguns utilizados como marcadores para controle de qualidade e relatados no laudo de análise emitido por fornecedores como, por exemplo, Terpinen-4-ol, o mais abundante ($\geq 30\%$) e conhecido no óleo essencial de melaleuca e que possui maior atividade antimicrobiana, induzindo perda de membrana e interferindo na integridade e fisiologia bacteriana. Outros componentes como o 1,8 cineol, que é considerado irritante à pele, aumenta a permeabilidade de membrana, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo descrito como detentor de efeito antimicrobiano marginal^[11].

Desta forma, o objetivo deste estudo foi demonstrar, por meio de teste *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM₅₀) frente aos microrganismos de interesse clínico: uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), uma Gram-negativa (*Escherichia coli*) e um fungo (*Candida albicans*) para desenvolver formulação de creme mucocutâneo com a incorporação de óleo de *melaleuca* e determinar sua estabilidade preliminar.

Materiais e Métodos

Microrganismos utilizados

Staphylococcus aureus NEWP 0023 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA263 – lote 6550 – microrganismo padrão estabilizado);

Candida albicans NEWP 0031 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA249 – lote 4785 – microrganismo padrão estabilizado);

Escherichia coli beta lactamase NEWP 0018 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA254 – lote 4213 – microrganismo padrão estabilizado);

Óleo essencial de *Melaleuca* fornecido por ENGETEC® R. Comercial S/C Ltda – especificações: lote: FRAJUN/21, *INCI name: Melaleuca alternifolia* Leaf Oil, *CAS number: 68647-79-4*, origem: Austrália. Obtido por destilação a vapor d'água da folhagem; Índice de refração 1,4801; Densidade (20 °C) 0,8990; Cineol 3,73%; α -terpinene 9,80%; α -terpineol 5,95%; γ -terpinene 20,53%; Terpinolene 3,20%; Limonene: 2,98; α -pinene: 5,15; Terpinen-4-ol 37,20% e p-Cymene 3,86%;

Placa Elisa de fundo arredondado com 96 poços, ágar CLED (Kasvi - lote 092117505), ágar Sabouraud-Dextrose (Oxoid – lote 1729730), ágar MacConkey (Kasvi – lote 010919511);

Nistatina 100.000 unidades internacionais – (UI) / mL (Suspensão Oral – Prati-Donaduzzi – medicamento genérico – lote L18F112);

Enrofloxacino 5% injetável (Baytril® – Bayer® - lote 001/14);

Caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Sigma-Aldrich);

Matérias-primas para formulação do creme, segundo *Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)*: *Aqua, Cetearyl alcohol, Glycerin, Disodium EDTA, Lactic acid, Cetareth-20, Glyceryl stearate, Caprylic/capric triglyceride, Ethylhexyl Palmitate, Isopropyl Myristate, Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Hydrogenated Vegetable Oil, BHT, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (and) phenoxyethanol, Cyclopentasiloxane, Imidazolidinyl urea.*

Preparo dos microrganismos

Foram identificados e isolados de acordo com método de diagnósticos descritos em protocolos e literatura, seguindo suas características já mencionadas anteriormente. Para crescimento e nutrição utilizou-se ágar CLED para *Staphylococcus aureus*, ágar MacConkey para *Escherichia coli* e ágar Sabouraud-Dextrose para *Candida albicans* pela técnica de esgotamento.

Preparo de soluções

Para o preparo da emulsão utilizou-se 0,8mL do óleo essencial de *melaleuca*, 4,2 mL de água e 0,05 mL de polisorbato 80 e agitado no vórtex por 5 minutos, obtendo-se uma emulsão com 16% de óleo de

melaleuca (144 mg/mL). Para controle da atividade do adjuvante, foi preparada solução contendo 0,05 mL de polisorbato 80 em 4,2 mL de água e agitado no vórtex por 5 minutos.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM₅₀)

Foi realizada por meio de microdiluição seriada em placa de ELISA estéril. Os microrganismos foram suspensos em solução salina utilizando a escala McFarland (10^6 para fungo e 10^3 para bactéria).

Na coluna 1, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10µL da suspensão de *Staphylococcus aureus*.

Na coluna 2, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10µL da suspensão de *Escherichia coli*.

Na coluna 3, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10 µL da suspensão de *Candida albicans*.

Na coluna 5, realizou-se o controle positivo. Linha A para *Staphylococcus aureus*, linha B para *Escherichia coli* e linha C *Candida albicans*, ou seja, pipetou-se 100 µL de caldo BHI e 10 µL de cada microrganismo em seu respectivo poço citado. Havendo crescimento, ou seja, formação de halo de crescimento no fundo do poço, considera-se como marcador de controle de qualidade do método a fim de verificação da viabilidade de cada microrganismo^[13-15].

Ainda nesta coluna, foi realizado o teste de controle de interferência de adjuvantes, com a finalidade de verificar se há interferência do polisorbato 80 na atividade antimicrobiana do óleo essencial de *melaleuca*. Para isto, na linha E, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de solução água + polisorbato 80 e 10 µL da suspensão de *Staphylococcus aureus*. Na linha F, repetiu-se o processo, porém trocando o microrganismo para *Escherichia coli* e na linha G para *Candida albicans*.

Na coluna 7, realizou-se o controle de esterilidade do caldo BHI, ou seja, pipetou-se somente 100 µL de caldo. Havendo ausência de crescimento de qualquer microrganismo para controle de qualidade do método, descartando interferentes e contaminações.

Na coluna 9, utilizou-se como controle negativo Nistatina e Enrofloxacino, sendo então 100 µL de caldo BHI, 100 µL de cada fármaco e 10 µL de cada microrganismo, seguindo a sequência como na coluna 5.

A diluição seriada foi realizada através de 100 µL do conteúdo ao tubo subsequente até o poço da linha H, descartando 100 µL finais a fim de igualar os volumes dos poços.

O procedimento está indicado a seguir no **QUADRO 1**.

QUADRO 1: Esquema da Placa de ELISA após pipetagem.

	1	2	3	5	7	9	10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	Controle +	Controle estéril	Controle -	Controle do Adjuvante
A	8%	8%	8%	+	∅	-	+
B	4%	4%	4%	+		-	+
C	2%	2%	2%	+		-	+
D	1%	1%	1%	+			+
E	0,5%	0,5%	0,5%	+			+
F	0,25%	0,25%	0,25%	+			+
G	0,125%	0,125%	0,125%	+			+
H	0,025%	0,025%	0,025%				

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

O **QUADRO 2** demonstra a diluição seriada segundo linha, porcentagem e concentração em mg/mL de emulsão de óleo de *melaleuca*.

QUADRO 2: Diluição seriada das concentrações da emulsão de óleo de *melaleuca*.

Linha	Concentração em %	Concentração em mg/mL
A	8%	72,0
B	4%	36,0
C	2%	18,0
D	1%	9,0
E	0,5%	4,5
F	0,25%	2,25
G	0,125%	1,125
H	0,025%	0,5625

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Após a finalização da pipetagem, cobriu-se com papel filme e colocou-se na estufa bacteriológica para incubação a 37°C por 48 horas. A CIM₅₀ correspondeu à redução em 50% do halo de crescimento na menor concentração de emulsão de óleo de *melaleuca* [13,15-17].

Preparo do creme O/A

O creme foi preparado por meio da adição de fase aquosa sobre a oleosa, sob agitação, à temperatura entre 75° a 80°C. As matérias-primas para composição do creme, bem como, a porcentagem presente e a função correspondente estão descritas a seguir (**QUADRO 3**) sendo separadas nas fases A (aquosa) e B (oleosa) com as respectivas funções. A fase C foi adicionada após o sistema ter sido emulsificado.

QUADRO 3: Formulação do creme com respectivas fases, matérias-primas, porcentual na formulação e função.

Fase	INCI*	%	Função
A	<i>Aqua</i>	69,45	Veículo
A	<i>Disodium EDTA</i>	0,10	Sequestrante
A	<i>Glycerin</i>	2,50	Umectante
B	<i>Cetearyl alcohol</i>	10,00	Espessante
B	<i>Ceteareth-20</i>	3,00	Emulsificante
B	<i>Glyceryl stearate</i>	2,50	Co-emulsificante
B	<i>Caprylic/capric triglyceride</i>	2,50	Emoliente
B	<i>Isopropyl Myristate</i>	4,00	Emoliente
B	<i>Ethylhexyl Palmitate</i>	2,00	Emoliente e modificador sensorial
B	<i>Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Hydrogenated Vegetable Oil</i>	1,30	Modificador sensorial
B	<i>BHT</i>	0,05	Antioxidante
B	<i>Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (and) phenoxyethanol</i>	1,00	Conservante
C	<i>Cyclopentasiloxane</i>	1,00	Modificador sensorial
C	<i>Imidazolidinyl urea</i>	0,60	Conservante

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. *(INCI) = Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients

A Fase A foi aquecida até 80°C e a Fase B até 75°C. Ao atingirem suas respectivas temperaturas foi vertida a Fase A sobre a B sob agitação de um agitador vertical mecânico por 5 minutos. Foi resfriado em banho de gelo, sob agitação, até atingir a temperatura de 40°C. Após resfriamento foram adicionados os componentes da Fase C e realizada a homogeneização. Foram preparados 100 g de creme.

Incorporação do óleo de *Melaleuca*

Incorporação realizada pela adição do óleo à emulsão já finalizada, sob agitação contínua até homogeneização da mistura. Em seguida, adicionou-se ácido láctico para ajuste de pH na faixa entre 4,5 e 5,0.

Teste de estabilidade preliminar

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA^[18], realizou-se o teste de estabilidade preliminar, que serve como teste de triagem para verificação da estabilidade de um produto em um curto prazo.

Para esse procedimento, a amostra manteve-se condicionada em pote de 150 g de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD). Teste de aspecto, cor e odor foram avaliados por meio da verificação se houve ou não alteração das características iniciais. A avaliação do pH foi realizada em um potenciômetro (pHmetro). Para densidade, foi utilizado um picnômetro (com o resultado da diferença da massa final e a tara do picnômetro, dividido pela capacidade deste material, chega ao valor da densidade do produto).

Inicialmente, foram anotadas especificações com as características esperadas para que fossem mantidos parâmetros de controle de qualidade durante toda a análise de estabilidade e, em seguida, realizou-se a leitura inicial já com o óleo incorporado, ou seja, as características físicas da emulsão sem a incorporação do óleo para serem consideradas como parâmetros de controle após a incorporação do óleo. Após isso, dentro do período de 10 dias foram feitos ciclos alternados diariamente de estufa (50°C ± 2°C) e freezer (-5°C ± 2°C), com análises físico-químicas diárias. Na leitura inicial, no 5º dia e no 10º dia, foram realizados esfregaços em vidro de relógio com 0,2 g de creme para melhor verificação da homogeneidade e formação de grumos (**QUADRO 4**).

QUADRO 4: Cronograma das condições diárias da amostra.

Dia	Condição da amostra
Leitura inicial	Temperatura ambiente
1º dia	Estufa
2º dia	Freezer
3º dia	Estufa
4º dia	Freezer
5º dia	Estufa
6º dia	Freezer
7º dia	Estufa
8º dia	Freezer
9º dia	Estufa
10º dia	Freezer

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Contagem de microrganismos viáveis

Utilizou-se 8,8 mL de solução salina estéril e 0,2 mL de polisorbato 80 e 1,0 g de creme, para que pudesse ser inativado o sistema conservante da formulação. Foi homogeneizado com bastão de vidro estéril e posteriormente submetido à agitação mecânica no vórtex por um minuto, resultando em uma diluição 1:10 (10^{-1} g/mL). As sucessivas diluições foram empregadas sobre mistura de solução salina estéril e polisorbato 80, transferindo-se 1 mL da mistura anterior, resultando em misturas com concentração 1:100 (10^{-2} g/mL) e 1:1000 (10^{-3} g/mL), em duplicata^[19].

Para análise microbiológica, as misturas foram semeadas em ágar Sabouraud-Dextrose, CLED e MacConkey, pela técnica de esgotamento com alça bacteriológica. Para controle de qualidade do método, também foi realizado controle negativo para os ágares e para semeadura em placa, contendo somente solução salina e polisorbato 80. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para pesquisa de bactérias e $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para pesquisa de bolores e leveduras. A viabilidade dos ágares já fora testado anteriormente quando cultivado os devidos microrganismos. A contagem foi realizada com auxílio de lupa eletrônica e em duplicata para cada diluição^[19,20]. Os resultados seguem a RDC 481/99, que estabelece o limite máximo da contagem total de microrganismos aeróbicos de 500 UFC/g^[21].

Análise estatística

Após a realização dos 10 dias de ciclos alternados, os dados foram tabulados e verificado se houve variação significativa em aspecto, cor e odor como, por exemplo, formação de grumos ou separação de fases. Para pH e densidade, foi aplicado teste estatístico de hipótese (Teste t).

Resultados e Discussão

Concentração Inibitória Mínima

Tendo controle positivo com presença de crescimento de cada microrganismo e controle de esterilidade a ausência de contaminantes, conclui-se que os resultados abaixo são fidedignos.

A determinação de CIM₅₀ se dá na redução do halo em 50%, determinando assim a dose mínima para inibir 50% da formação de colônias. Para este resultado, determina-se por meio da observação a olho nu, comparando a formação de halo entre o controle positivo e os ensaios de diluições^[13,15,17]. A seguir, estão demonstrados os resultados obtidos em mg/mL para cada microrganismo (**TABELA 1**).

TABELA 1: Resultados de MIC₅₀ em mg/mL de óleo de *melaleuca*.

Microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Concentração	9,0 mg/mL	4,5 mg/mL	4,5 mg/mL

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Em estudo de atividade antimicrobiana da emulsão incorporada com o óleo essencial, não foi observada diferença de resultados quando comparado ao óleo de *melaleuca*.

Teste de estabilidade preliminar

As **TABELAS 2 e 3** mostram os resultados das análises físico-químicas ao longo de 10 dias de análise.

TABELA 2: Resultados da estabilidade preliminar da leitura inicial ao 4º dia.

Parâmetro	Especificações	Leitura inicial	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Aspecto	Creme	N	N	N	N	N
Cor	Branco	N	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N
pH	4,5 – 5,0	4,68	4,67	4,65	4,62	4,57
Densidade (g/cm ³)	0,91 – 0,99	0,9316	0,9301	0,9318	0,9599	0,9672

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. Legenda: N – normal / sem alterações.

TABELA 3: Resultados da estabilidade preliminar da leitura do 5º dia ao 10º dia.

Parâmetro	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
Aspecto	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N
pH	4,65	4,66	4,60	4,67	4,55	4,68
Densidade (g/cm ³)	0,9692	0,9798	0,9754	0,9778	0,9798	0,9673

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. Legenda: Aspecto: N – Normal/ sem alterações / SF- Separação de fases / FG – Formação de grumos. Cor/ odor: N – Normal/ característico / LM – Levemente modificado / M – Modificado / IM – Intensamente modificado.

Observações em vidro de relógio

Leitura inicial (Tempo zero): Aspecto homogêneo característico de emulsão O/A e sem presença de grumos.

5º dia: Ausência de grumos e aspecto característico de emulsão O/A.

10º dia: Presença de pouquíssimos grumos, mas permanece aspecto característico de emulsão O/A.

A análise microbiológica foi realizada ao término da análise de estabilidade preliminar, havendo resultado inferior a 10 UFC/g para todos os ágaros (metodologia descrita anteriormente).

Após o término das análises, os valores de pH e densidade foram tabulados e aplicados média, desvio padrão e teste de hipóteses (Teste t) a fim de verificar se há variações significativas entre si, ressaltando $n = 11$ (leitura inicial ao 10º dia).

A seguir estão representados dos resultados de média, desvio padrão, graus de liberdade e o resultado do Teste t (TABELA 4).

TABELA 4: Parâmetros estatísticos para avaliação da variação de pH e densidade.

Parâmetro	pH	Densidade
Média	4,64	0,9609 g/mL
Desvio padrão	0,0452	0,0200 g/mL
Graus de liberdade	-1,812	1,812
Teste t	-8,333	1,804

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Os microrganismos demonstraram sensibilidade frente ao óleo de *melaleuca*. Entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* o resultado foi semelhante, entretanto, o microrganismo *Staphylococcus aureus* demonstrou maior resistência, sendo necessário dobrar a dosagem, o que era de se esperar, pois há crescente resistência desse microrganismo frente a agentes antimicrobianos^[22].

Mesmo havendo variação na sensibilidade, os resultados são positivos como novas possibilidades de combater estas infecções e, neste caso, frente a infecções de pele e infecções geniturinárias, utilizando o creme mucocutâneo.

Já no teste de estabilidade, concluiu-se que o creme com óleo de *melaleuca* está em conformidade segundo os critérios de avaliação do Guia de Estabilidade da ANVISA^[18], uma vez que não houve alterações significativas no aspecto, cor e odor e não houve rejeição da hipótese nula, uma vez que $t_{crit} > t_{calc}$, logo não houve variação nos valores obtidos de pH e densidade. O creme também foi considerado aprovado por conta do resultado ser inferior ao limite estabelecido pela RDC 481/99. Certamente, haverá necessidade em outra etapa do desenvolvimento, a condução de teste de estabilidade acelerada (duração de 90 dias) e teste de prateleira (2 anos).

Conclusão

O óleo de *melaleuca* mostrou ter atividade antimicrobiana frente aos microrganismos estudados. Na emulsão elaborada, de acordo com as condições estabelecidas para a realização deste estudo, a incorporação do óleo de *melaleuca* foi satisfatória considerando que a emulsão permaneceu estável com aspecto agradável para o usuário. Os resultados obtidos mostraram-se promissores para o desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas com a incorporação do óleo de *melaleuca* como possível nova alternativa terapêutica frente aos microrganismos estudados.

Agradecimentos

O grupo de autores agradece ao técnico José Maria da Costa Júnior, da Universidade São Judas Tadeu, que dispôs do seu tempo e dedicação no auxílio do preparo de meio de cultura, incubação, esterilização em autoclave, além de mais atividades necessárias ao desenvolvimento deste estudo.

Referências

1. Martinez MB, Taddei CR. Enterobacteriaceae. *In*: Trabulsi LR, Altertum F. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 35, p.293-302.
2. Heilberg IP, Schor N. Abordagem, Diagnóstico e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – (ITU). **Rev Assoc Med Bras**. Jan./mar. 2003; 49(1):109-16. ISSN 1806-9282. [[CrossRef](#)].
3. Hasenack BS, Marquez AS, Pinheiro EHT, Guilherme, RL, Frasson FT, Avelar GS. Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário? **Rev Bras Anal Clin**. 2004; 36(3):163-6. [[Link](#)].
4. McCulloch JA, Mamizuca EM. *Staphylococcus aureus*. *In*: Trabulsi LR, Althertum F. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 20, p.179-188.
5. Nogueira PSF, Moura ERJ, Costa MMF, Monteiro WMS, Brondi L. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. **Rev Enferm UERJ**. Jan./mar. 2009; 17(1):96-101. [[Link](#)].
6. Gomperitz OF, Valderez G, Paula CR. Micoses oportunistas e outras micoses: candidíases, aspergilose, mucormicose, fusariose, pneumocistose, peniciliose, tricosporonose, oculomicose e otomicose. *In*: Trabulsi LR, Alterthum F, Correa B, Paula CR. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap.70, p.601-608.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). **Cadernos de Atenção Básica, nº 31**.
8. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**. Jan./mar. 2007; 17(1):108-113. ISSN 1981-528X. [[CrossRef](#)].
9. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol**. 1998; 26:194-8. [[CrossRef](#)].
10. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother**. 2002; 46(6):1914-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
11. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev Bras PI Med**. 2011; 13(4):492-496. ISSN 1516-0572. [[CrossRef](#)].
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. **Monografia M47. Melaleuca alternifolia**. Disponível em: [[Link](#)].
13. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**. 2011; 20(52):68-73. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].

14. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn**. 2006; 16(2):197-201. ISSN 0102-695X. [\[Link\]](#).
15. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou JB. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **J Agric Food Chem**. 2001; 49(9):4168-70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
16. Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. Jan. 2009; 53(1):12-5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
17. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 ISBN 1-56238-486-4. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1ª ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52p.
19. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília. 2010; vol. 2. 546p.
20. Rosa AM, Chang MR, Sposito FLE, da Silva CG, Miyagusku L, Sversut RA et al. Análise microbiológica de xampus e cremes condicionadores para uso infantil. **Rev Cienc Farm Básica Apl**. 2015; 36(1):43-49. ISSN 2179-443X
21. Brasil. **Resolução RDC nº 481**, de 23 de setembro de 1999. Aprova “Parâmetros de Controle Microbiológico para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 15 jan. 2019.
22. Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina na América Latina. **Braz J Infect Dis**. 2010; 14(2). ISSN 1413-8670. [\[CrossRef\]](#).

Histórico do artigo | **Submissão:** 05/07/2019 | **Aceite:** 10/01/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Como citar este artigo: Correa LT, Nicoletti MA, De Amorim CS, Da Costa AR et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 26-37. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/818>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

