

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA-PR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TAYNÁ ELOISE LOPES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* CULTIVADA EM REALEZA,
SUDOESTE PARANAENSE

REALEZA-PR

2024

TAYNÁ ELOISE LOPES DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* CULTIVADA EM REALEZA,
SUDOESTE PARANAENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

REALEZA-PR

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Oliveira, Tayná Eloise Lopes de
Análise da composição química e atividade
antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca
alternifolia* cultivada em Realeza, no Sudoeste
Paranaense / Tayná Eloise Lopes de Oliveira. -- 2024.
17 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. Árvore do chá. 2. *Staphylococcus aureus*. 3.
Escherichia coli. I. Freitas, Fagner Luiz da Costa,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

TAYNÁ ELOISE LOPES DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* CULTIVADA EM REALEZA,
SUDOESTE PARANAENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Federal da Fronteira Sul
(UFFS), como requisito para obtenção do
título de Médica Veterinária.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 29/11/2024.

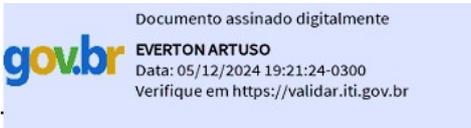
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas – UFFS

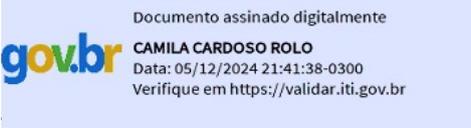
Orientador



Documento assinado digitalmente
gov.br **EVERTON ARTUSO**
Data: 05/12/2024 19:21:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Everton Artuso – UFFS

Avaliador



Documento assinado digitalmente
gov.br **CAMILA CARDOSO ROLO**
Data: 05/12/2024 21:41:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Camila Cardoso Rolo – Médica Veterinária

Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Neste momento especial, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram este trabalho de conclusão de curso possível.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador Fagner Luiz, por sua orientação, paciência e suporte ao longo de todo esse processo. Seu conhecimento e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao técnico Adriano por todo o suporte e ensinamentos durante a realização dos trabalhos em laboratório.

Agradeço também aos meus colegas que estiveram ao meu lado desde o início do curso, Luan, Paulo e Guilherme, que compartilharam momentos de aprendizado e dificuldades, dentro e fora dos laboratórios. A convivência e as trocas de ideias foram muito enriquecedoras e fizeram toda a diferença na minha formação.

Não poderia deixar de mencionar minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo apoio e encorajamento nos momentos mais desafiadores. Sem vocês, eu não estaria onde estou hoje.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja com conselhos, apoio ou inspirações. Cada um de vocês teve um papel importante na minha trajetória.

A todos, meu sincero agradecimento!

**Análise da composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de
Melaleuca alternifolia cultivada em Realeza, no Sudoeste Paranaense**

**Analysis of the chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of
Melaleuca alternifolia cultivated in Realeza, in the Southwest of Paraná**

Tayná Eloise Lopes de Oliveira¹, Fagner Luiz Da Costa Freitas^{1*}

RESUMO

A pesquisa avaliou os efeitos antibacterianos do óleo essencial de melaleuca contra cepas padrões de *S. aureus* e *E. coli*. A planta foi cultivada no município de Realeza, PR, tendo seu óleo essencial extraído por meio da técnica de arraste a vapor e sua composição cromatográfica analisada por cromatógrafo de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Nas condições experimentais supracitadas, o OEM apresentou rendimento de 1%, 22 componentes químicos e quimiotipos terpinen-4-ol, α -terpineno e γ -terpineno quando obtido no outono pela técnica de arraste a vapor. A avaliação microbiológica evidenciou susceptibilidade bacteriana ao OEM dependente da cepa envolvida nos testes laboratoriais. No caso do *S. aureus*, as CIMs e CBMs variaram de 2,08% a 10,41% e 3,13% a 12,5%, respectivamente. Para as cepas de *E. coli*, os valores de CIMs e CBMs variaram de 6,25% a 20,83% e de 12,5% a 20,83%, respectivamente. É de suma importância que técnicas biotecnológicas sejam desenvolvidas para otimização da eficácia dos OEs frente aos microrganismos que apresentem CIMs e CBMs elevados.

Palavras-chave: Árvore do chá. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The study evaluated the antibacterial effects of tea tree essential oil against standard strains of *S. aureus* and *E. coli*. The plant was grown in the city of Realeza, PR, and its essential oil was extracted using the steam distillation technique and its chromatographic composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Under the afore mentioned experimental conditions, the OEM presented a yield of 1%, 22 chemical components and chemotypes terpinen-4-ol, α -terpinene and γ -terpinene when obtained in the autumn by the steam distillation technique. The microbiological evaluation showed bacterial susceptibility to the OEM depending on the strain involved in the laboratory tests. In the case of *S. aureus*, the MICs and MBCs ranged from 2.08% to 10.41% and 3.13% to 12.5%, respectively. For *E. coli* strains, MIC and MBC values ranged from 6.25% to 20.83% and from 12.5% to 20.83%, respectively. It is extremely important that biotechnological techniques be developed to optimize the efficacy of EOs against microorganisms that present high MICs and MBCs.

Keywords: Tea tree. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*.

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, CEP: 85770-000, Realeza, PR, Brasil.

*E-mail: fagner.freitas@uffs.edu.br. Autor para correspondência

INTRODUÇÃO

A *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae*), é uma espécie de árvore nativa da costa subtropical nordeste australiana, encontrada em toda a América do Sul e no Oeste da Índia^{1,2}. A planta floresce, principalmente, em áreas pantanosas ou próximas a rios e pode atingir cerca de sete metros de altura, possui um tronco esbelto com casca fina, suas folhas são longas, estreitas e pontiagudas, sendo comumente conhecida como “árvore de chá” e “tea tree”³.

O uso terapêutico da planta têm seus primeiros relatos pelos povos aborígenes australianos Bundjalung, do Norte de Nova Gales do Sul, que inalavam folhas esmagadas da planta para curar resfriados e tosses, além de utilizar a infusão das suas folhas para dores de garganta, afecções de pele e feridas⁴.

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários das plantas extraídos em forma de líquido, naturais, aromáticos e voláteis, que podem ser obtidos de várias partes das plantas, principalmente, folhas e flores⁵. O óleo essencial de melaleuca (OEM) possui atividade antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoária e antitumoral^{4,6,7}, sendo utilizado na formulação de fármacos e cosméticos indicados para infecções de vias aéreas, pele (tínea e acne), orais (herpes labial e candidíase oral), vaginais (candidíase), lesões e queimaduras^{1,3}, ou ainda como antissépticos e repelentes^{6,1}.

O OEM contém mais de 100 componentes, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos, sendo o terpinen-4-ol a substância mais abundante^{6,8}, presente em 30-40% de sua composição^{4,3}. As propriedades antibacterianas do OEM são atribuídas principalmente ao terpinen-4-ol e sua potência varia de acordo com o microrganismo, sendo as bactérias gram-positivas mais suscetíveis que as gram-negativas^{5,2}.

Nas últimas décadas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* têm sido responsáveis pelo maior número de surtos de casos e óbitos em escala global. Para mitigar os riscos à saúde e as repercussões econômicas associadas à emergência desses patógenos, a adoção de alternativas antibacterianas naturais surge como uma abordagem promissora para o controle da incidência de bactérias patogênicas⁹.

A bactéria *S. aureus* é uma espécie de bactéria pertencente à família *Micrococcaceae* spp., gram-positiva, possui formato de cocos e arranjo tipo “cacho de uvas”, imóveis, anaeróbios facultativos, geralmente não capsuladas, são coagulase positivos, β -hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias

pigmentadas⁸. Possui vários fatores de virulência, incluindo a formação de biofilmes, que podem conferir resistência a antibióticos mais potentes como a vancomicina e a meticilina⁸. É um microrganismo comensal da pele, porém oportunista, está relacionado com diversos tipos de infecções em animais e humanos, sendo a segunda maior causa de meningite³.

A bactéria *E. coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae* spp., é gram-negativa, em forma de bacilo, maioria são móveis, aeróbias ou anaeróbias facultativas e não esporuladas. Este grupo de bactérias colonizam o intestino dos mamíferos logo após o nascimento sem causar danos, sendo comensal e participando da síntese de vitamina K e B, porém em situação de imunossupressão ou de violação das barreiras gastrointestinais, mesmo as cepas não patogênicas podem causar infecções. As cepas patogênicas de *E. coli* são microrganismos de importância na etiologia de infecções hospitalares podendo causar infecção urinária, gastroenterites e septicemia³.

Frente a crescente resistência bacteriana a antibióticos e o potencial antibacteriano do OEM, faz-se necessário estudos científicos sobre o cultivo e a colheita da planta, cromatografia do óleo essencial, validação terapêutica e sua aplicabilidade clínica. Além disso, há poucos estudos sobre as variáveis que podem afetar os aspectos qualitativos e quantitativos do OEM em território brasileiro.

Diante do exposto, esse trabalho analisou a composição fitoquímica do OEM e a sua atividade antibacteriana em cepas padrões de *S. aureus* e *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e colheita de plantas medicinais

O trabalho foi realizado no período compreendido entre Junho/2022 a Julho/2024, na UFFS, *Campus Realeza*, PR, Brasil. As mudas de melaleuca (*M. alternifolia*) foram instaladas em 5 linhas com 50 m de comprimento, 1,5 m entre plantas e 1,5 m entre linhas. O solo foi adubado, semestralmente, com 10Mg ha⁻¹ de matéria orgânica constituída por cama de aviário, tendo adubação complementar após a poda (30 kg ha⁻¹). A colheita foi realizada por meio de poda manual com 90 dias durante o período de inflorescência.

Figura 1 – Cultivo de *Melaleuca alternifolia* no Setor de Áreas Experimentais da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, sudoeste paranaense, Brasil.



Fonte: Autor (2023)

Extração do óleo essencial, Densidade Relativa e Análise Cromatográfica

A massa vegetal fresca foi submetida à técnica de destilação por arraste a vapor para obtenção do óleo essencial. A densidade relativa do OEM foi realizada em triplicata pela divisão da massa pelo volume (Densidade = massa/volume) a 20 °C, conforme a metodologia ISO 279:1998. O OE foi analisado com cromatógrafo de fase gasosa Agilent MSD 5977, acoplada a espectrometria de massas.

Culturas e microrganismos

Foram usadas duas cepas padrões de *Staphylococcus aureus*: NP0038 e NP0023; quatro cepas padrões de *Escherichia coli*: NP0022, ATCC25922, LB25922 e IC, provenientes oriundos do Laboratório de Pesquisas NB2 da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, PR.

Padronização do Inóculo

As culturas previamente estocadas em ultrafreezer (-85°C) em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) glicerinado (60%) foram reativadas e enriquecidas em BHI. Posteriormente foram transferidas para caldo Mueller Hinton (CMH) e padronizadas para turbidez equivalente 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos (teste de disco-difusão)

O teste de disco-difusão, também conhecido como antibiograma, foi realizado

conforme metodologia desenvolvida por Kirby-Bauer de 1975, e preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute¹⁰. O supramencionado teste, tem como princípio básico a difusão do composto em teste na superfície de um ágar a partir de um disco impregnado com o mesmo, fornecendo resultados qualitativos ao categorizar as cepas bacterianas em suscetíveis, intermediárias ou resistentes¹¹. É um método físico, onde o meio de cultura sólido contendo o microrganismo a ser testado é desafiado pela substância biologicamente ativa, formando um halo de inibição de crescimento do microrganismo¹². Os seus resultados também são utilizados para orientar a terapia antimicrobiana adequada na clínica médica e veterinária¹³.

Para tal, o inóculo com o microrganismo a ser desafiado foi padronizado em 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e foi semeado em toda extensão da placa contendo Ágar Mueller-Hinton (AMH). Discos brancos estéreis com 6 mm de diâmetro contendo 10µL do OEM, assim como os discos de controle positivo e negativo, foram alocados no meio de cultura, respeitando distância adequada. O controle positivo foi realizado com discos PEN10 (Penicilina G. 10UI) e a TET30 (Tetraciclina 30 mcg); o controle negativo foi realizado com discos brancos estéreis contendo 10µL de água destilada estéril.

Para maior credibilidade, os testes foram realizados em triplicata. A incubação foi realizada a temperatura de 36 °C, durante 24 horas. A leitura foi realizada por meio de um paquímetro digital (Vonder, Brasil) e comparada com valores padronizados nos manuais¹⁰ para indicação de cepas bacterianas sensíveis (halo de inibição > 8 mm), intermediárias (6 – 8 mm) ou resistentes (< 6 mm) ao OEM.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM é definida como a menor concentração de um composto para inibir o crescimento de um determinado microrganismo, é um parâmetro farmacodinâmico quase hegemônico e muitas vezes o único usado para projetar a antibioticoterapia¹⁴.

É conhecido que o método de preparação do inóculo, tipo de meio, tamanho do inóculo, temperatura e tempo de incubação podem influenciar nos valores de CIM, devido a isso houve padronização do teste conforme as diretrizes do Clinical Laboratory Standards Institute com modificações¹⁰.

Para a determinação da CIM, foram utilizadas placas de 96 poços, composta por oito linhas indicadas em ordem alfabética de A-H e doze colunas numeradas de 1-12,

utilizando três linhas de doze poços para cada cepa de bactéria, conferindo em três triplicatas para cada cepa. Cada placa comportou duas cepas bacterianas. Foram pipetados 100µL de caldo BHI em cada um dos poços utilizados de nº1-12, 100µL de OEM a 50% nos poços nº2, onde foram realizadas diluições seriadas até poço nº11, em que cada poço contém metade da concentração do OEM do poço anterior. Posteriormente, foram pipetados 10µL da cepa bacteriana nos poços 1-11. Sendo assim, os poços da coluna nº1 foram utilizados como o controle positivo para o inóculo e a coluna nº12 foi utilizada como controle negativo conferindo esterilização do meio de cultura.

Após diluições e pipetagem do inóculo ajustado a 0,5 na escala McFarland, a absorbância foi medida em espectrofotômetro na densidade óptica (D.O.) de 625 nm para obtenção da absorbância inicial. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiano durante 24 horas a 36 °C com posterior leitura em espectrofotômetro com D.O 625nm.

A CIM foi representada pela diferença na absorbância do OEM na leitura final em comparação a inicial no espectrofotômetro. Tal diferença indica o crescimento e consequentemente a viabilidade da cepa. Para uma confirmação da CIM, foi utilizado a resazurina como indicador de crescimento. Quando a resazurina (azul) não for reduzida a resorufina (rosa) fica constatado o efeito inibitório e quando o corante sofreu modificação para a cor rosa, indicou uma reação de óxido-redução evidenciando a viabilidade celular; a mudança de coloração do azul para rosa foi registrada como crescimento bacteriano^{15,16}. Os procedimentos foram realizados em triplicata e o resultado se deu por média aritmética simples.

A CBM é a estimativa mais comum para avaliar a atividade bactericida e é definida como a menor concentração de um composto capaz de produzir 98% - 99,99% de efeito letal quando comparado a população microbiana inicial¹⁷. O teste do CBM foi realizado a partir dos poços onde não houve crescimento no CIM. Alíquotas com 10µL foram semeadas em ágar Mueller Hinton (AMH), seguido de incubação a 35± 2°C/24 h (triplicata). Após incubação foram enumeradas as unidades formadoras de colônias (UFC). A concentração mais baixa na qual não houve crescimento bacteriano visível em ágar foi considerado o CBM.

RESULTADOS

O OEM apresentou rendimento de 1%, densidade de 0,890 g mL⁻¹ e 22 (vinte e dois) componentes químicos: α-tujeno, α-pineno, β-tujeno, β-pineno, β-mirceno, α-

felandreno, α -terpineno, p-cimeno, limoneno, eucaliptol (1,8 cineol), γ -terpineno, fenchona, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -gurjuneno, β -cariofileno, aromandendreno, aloaromadendreno, viridifloreno, δ -cadineno, cubeneno e óxido de cariofileno.

Tabela 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) cultivado no município de Realeza, sudoeste paranaense, e colhidas no outono, Brasil 2023.

Constituintes químicos	Área relativa (%)
Cubeneno	0,12
Óxido de Cariofileno	0,17
β -Tujeno	0,33
β -Cariofileno	0,34
α -Gurjuneno	0,38
Aloaromadendreno	0,45
α -Felandreno	0,58
β -Pineno	0,77
β -Mirceno	0,79
Viridifloreno	1,02
α -Tujeno	1,27
δ -Cadineno	1,3
Aromandendreno	1,31
α -Terpineol	2,07
Eucaliptol	2,19
Limoneno	2,24
p-Cimeno	3,16
α -Pineno	3,17
Fenchona	4,22
γ-Terpineno	21,81
α-Terpineno	24,71
Terpinen-4-ol	26,91
Total	99,31%

Em relação às concentrações encontradas de cada componente químico na amostra de OEM, o terpinen-4-ol foi o componente que obteve a maior concentração (26,91%), seguido pelo α -terpineno (24,71%) e γ -terpineno (21,81%).

Todas as cepas bacterianas foram sensíveis ao OEM no teste disco-difusão e seguiram para a microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM).

A Tabela 2 apresenta os valores de CIM e CBM do OEM contra as cepas testes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No caso do *S. aureus*, as CIM's e CBM's variaram de 2,08% a 10,41% e 3,13% a 12,5%, respectivamente. Para as cepas de *E. coli*, os valores de CIM e CBM variaram de 6,25% a 20,83% e de 12,5% a 20,83%, respectivamente.

A cepa gram-positiva mais sensível ao OEM foi a *S. aureus* NP0038 apresentando

CIM de 2,08% e CBM de 3,13%. As cepas LB25922 e a IC foram as duas cepas de *E. coli* mais sensíveis ao OEM, ambas apresentando CIM de 6,25% e CBM de 12,5%.

Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OEM, expressos em porcentagem (%) e $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, contra cepas padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, Realeza, Estado do Paraná, Brasil, 2024.

Microrganismos	CIM		CBM	
	%	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	%	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Cepas de <i>S. aureus</i>				
NP0023	10,41	92650	12,5	112500
NP0038	2,08	18510	3,13	27850
Cepas de <i>E. coli</i>				
NP0022	9,37	83450	17,71	127600
LB25922	6,25	55625	12,5	111250
ATCC25922	20,83	185380	20,83	185400
IC	6,25	55625	12,5	111250

DISCUSSÃO

O OEM utilizado no presente estudo apresentou 22 componentes químicos com destaque para maior quantidade de componentes terpênicos, principalmente, o terpinen-4-ol (26,9%) que, somado ao γ -Terpineno (21,81%) e α -Terpineno (24,71%), representaram 73,42% da composição. É importante ressaltar que a Organização Internacional de Padronização (ISO)¹⁸ preconiza que o OEM apresente, no mínimo, 15 componentes químicos com predominância de terpinen-4-ol (35 a 48%), sendo notório que o OEM testado apresenta qualidades compatíveis com as normativas internacionais, exceto para o teor de terpinen-4-ol que apresentou menor porcentagem quando comparado com a ISO¹⁸. Entretanto, se considerarmos as concentrações dos três componentes majoritários, veremos que o OEM avaliado no presente estudo apresentou valores superiores (73,42%) aos autores supracitados nos quais apresentaram concentrações variando entre x e y%. Trata-se de um resultado relevante, tendo em vista que estes componentes terpênicos apresentam ação antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiprotozoária, antitumoral, diaforética, expectorante e inseticida^{7,2,9}.

Embora tenha uma vasta extensão, o território brasileiro apresenta poucos estudos relacionados ao cultivo e extração do OEM, sendo a maior parte das pesquisas desenvolvidas com OEs comerciais de origem internacional. Na análise de doze amostras de óleo essencial no trabalho realizado por Castelo *et al.* (2013)¹, no Distrito Federal – Brasil, foram identificados os seguintes compostos como principais: terpinen-4-ol (36,6%), γ -terpineno (18,2%), α -terpineno (7,1%), p-cimeno (5,5%), α -terpinoleno (3,0%), e α -

terpineol (2,5%), eucaliptol (1,4%), limoneno (1,1%).

A composição química do OEM depende do método de extração utilizado e da região de cultivo das amostras, porém variações ambientais que ocorrem tanto ao longo do ano quanto ao decorrer do dia, tais como mudanças na taxa de umidade relativa do ar, intensidade da luz solar ou concentração dos nutrientes do solo podem afetar a produção de óleos essenciais alterando a concentração de seus compostos^{1,2}.

No artigo publicado por Castelo *et al.* (2013)¹, é elucidado que o deficit hídrico diminui a produção de biomassa e, conseqüentemente, diminui o rendimento do óleo, sendo os períodos mais úmidos e com pluviosidade mais alta, aliados ao fato da espécie ser de áreas pantanosas, as melhores condições para a produção do OEM. Desta forma, é possível que a extração do OEM no outono seja o responsável pela concentração reduzida de terpinen-4-ol (26,9%), anteriormente mencionado nesta discussão, sendo necessário estudos que relacionem a composição química do OEM com as diferentes estações do ano na área utilizada para o cultivo da planta.

No trabalho realizado na província chinesa por Zhang *et al.* (2018)², os principais componentes do OEM foram o terpineno-4-ol (31,11%), γ -terpineno (25,30%) e α -terpineno (12,70%).

A atividade antimicrobiana do OEM é conferida pelo terpinen-4-ol, que devido a sua forte hidrofobicidade, interage com os lipídeos da membrana dos microrganismos patogênicos² e induz a inibição da respiração bacteriana, a perturbação na integridade estrutural da membrana celular, e também a indução de vazamento de íons potássio, interferindo na fisiologia bacteriana e resultando na morte celular^{3,5}. Entretanto, não podemos desconsiderar os demais constituintes do OEM que, por menor que sejam suas concentrações, são fundamentais para uma ação sinérgica e efetiva contra os microrganismos^{4,19}.

Os nossos resultados evidenciaram que a susceptibilidade da bactéria ao OEM depende da cepa envolvida nos testes laboratoriais. Isto pode ser observado nas duas cepas testes de *S. aureus*, nas quais apresentaram valores de CIMs, completamente distintos, sendo a cepa NP0038 mais sensível ao OEM quando comparado com a cepa NP0023. O mesmo foi observado para as cepas de *E. coli* LB25922 e IC que apresentaram maior sensibilidade quando comparado com as cepas NP0022 e ATCC25922. Em relação aos efeitos bactericidas, nota-se que a maior CBM obtida para as cepas de *S. aureus* (12,5% NP0023) foi igual a menor CBM obtida para *E. coli* (LB25922 e IC). As bactérias gram-positivas são mais suscetíveis aos agentes antimicrobianos, pois possuem apenas uma

camada exterior facilitando a interação entre agentes externos com a membrana plasmática, tornando-as mais frágeis, entretanto, as gram-negativas possuem uma membrana adicional de proteção da membrana plasmática interior, com mais lipopolissacarídeos tornando-as mais resistentes¹⁹. A diversidade de compostos químicos do OEM reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência dos microrganismos, tendo em vista a necessidade de várias mutações simultâneas para superar as ações antimicrobianas dos seus componentes contra a parede bacteriana⁴.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais supracitadas, o OEM oriundo de plantas cultivadas no município de Realeza, sudoeste paranaense, apresenta rendimento de 1%, 22 componentes químicos e quimiotipos terpinen-4-ol, α -terpineno e γ -terpineno quando obtido no outono pela técnica de arraste à vapor. A avaliação microbiológica evidenciou susceptibilidade bacteriana ao OEM dependente da cepa envolvida nos testes laboratoriais. No caso do *S. aureus*, as CIMs e CBMs variaram de 2,08% a 10,41% e 3,13% a 12,5%, respectivamente. Para as cepas de *E. coli*, os valores de CIMs e CBMs variaram de 6,25% a 20,83% e de 12,5% a 20,83%, respectivamente. É de suma importância que técnicas biotecnológicas sejam desenvolvidas para otimização da eficácia dos OEs frente aos microrganismos que apresentem CIMs e CBMs elevados.

REFERÊNCIAS

1. Castelo, A. V. M.; Afonso, S. R.; Melo, R. R.; Del Menezzi, C. H. S.; Camillo, J.; Vieira, R. F. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, v. 8, n. 1, p. 143–147, **2013**. DOI:10.5039/agraria.v8i1a2397. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119025752013>. Acesso em: 9 jul. 2024.
2. Zhang, X.; Guo, Y.; Guo, L.; Jiang, H.; Ji, Q. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. *BioMed Research International*, v. **2018**, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/2396109>. Acesso em: 9 jul. 2024.
3. Crispim, G. J. B., & Lacerda, M. C. R. N. de. Análise da Ação Bacteriolítica da *Melaleuca Alternifolia* nas Principais Bactérias de Interesse Médico. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, [S. l.], v. 18, n. 2, **2015**. DOI: 10.17921/1415-6938.2014v18n2p%p. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26042164001>. Acesso em: 9 jul. 2024.
4. 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, n. 1, p. 50–62, 1 jan. **2006**. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.50-62.2006>. Acesso em: 9 jul. 2024.
5. Oliva, A.; Costantini, S.; De Angelis, M.; Garzoli, S.; Božović, M.; Mascellino, M. T.; Vullo, V.; Ragno, R. High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 23, n. 10, p. 2584, **2018**. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23102584>. Acesso em: 9 jul. 2024.
6. Kwieciński, J.; Eick, S.; Wójcik, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, n. 4, p. 343–347, abr. **2009**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.028>. Acesso em: 9 jul. 2024.
7. Pazyar, N.; Yaghoobi, R.; Bagherani, N.; Kazerouni, A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. *International journal of dermatology*, v. 52, n. 7, p. 784-790, **2012**. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05654.x>. Acesso em: 9 jul. 2024.
8. Cordeiro, L.; Figueiredo, P.; Souza, H.; Sousa, A.; Andrade-Júnior, F.; Medeiros, D.; Nóbrega, J.; Silva, D.; Martins, E.; José Barbosa-Filho, J.; Lima, E. Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**; 21(12):4531. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21124531>. Acesso em: 9 jul. 2024.
9. Puvača, N.; Milenković, J.; Coghill, T. G.; Bursić, V.; Petrović, A.; Tanasković, S.; Pelić, M.; Pelić, D. L.; Miljković, T. Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Selected Pathogenic Bacteria: In Vitro Study. *Antibiotics*. **2021**; 10(5):546. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050546>. Acesso em: 9 jul. 2024.
10. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That

Grow Aerobically. 12th ed. CLSI standard M07. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; **2024**.

11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*.– Brasília: Anvisa, **2013**.
12. Collins, C. H. *Microbiological methods*. 7. ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, **1995**.
13. Balouri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, v. 6, n. 2, p. 71-79, **2016**.
14. Udekwu, K. I.; Parrish, N.; Ankomah, P.; Baquero, F.; Levin, B. L. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 4, p. 745–757, 1 abr. **2009**. Acesso em: Jan. 06, 2024. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn554>.
15. Reller, L. B.; Weinstein, M.; Jorgensen, J. H.; Ferraro, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, **2009**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/647952>>. Acesso em: Jan. 06, 2024. doi: 10.1086/647952.
16. Schumacher, A.; Vranken, T.; Malhotra, A.; Arts, J. J. C.; Habibovic, P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 37, p. 187-208, **2018**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>>. Acesso em: Jan. 09, 2024. doi: 10.1007/s10096-017-3089-2.
17. CLSI. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A, Wayne, PA, USA, **1999**.
18. International Organization for Standardization (ISO) 4730:2017. Disponível em: <<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/69082/302bafb843a64a95b8c74676e282d921/ISO-4730-2017.pdf>>.
19. Carmo, M, C.; Leão, K. A. Análise Comparativa Da Atividade Antimicrobiana Do Óleo Essencial De Melaleuca (*Melaleuca linariifolia*) Obtido De Diferentes Fornecedores. *Recima21*, v. 5, n. 3, p. e535018–e535018, 9 mar. **2024**. Disponível em: <https://doi.org/10.47820/recima21.v5i3.5018>. Acesso em: 9 jul. 2024.