

Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócicaRoberta Pessoa Simões¹Francisco Carlos Groppo²Adilson Sartorato³Fernando de Sá Del Fiol⁴Thales Rocha de Mattos Filho⁵Juliana Cama Ramacciato⁶Marili Villa Nova Rodrigues⁷

Resumo: Este trabalho teve por objetivo testar a atividade antimicrobiana, *in vitro* e *in vivo*, do óleo de *Melaleuca alternifolia* (*MA*). Foram feitos testes de concentração inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas para estafilococos sensíveis e resistentes a penicilina. As concentrações de (*MA*) utilizadas foram 8, 4, 2, 1, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 e 0,00625%. Após a determinação dos resultados *in vitro*, 18 ratos receberam, subcutaneamente, quatro implantes de esponjas de poliuretano. Após 14 dias, dois dos tecidos granulomatosos resultantes foram infectados com *S. aureus* ATCC25923 (sensível a penicilina). Dois dias após, os animais foram divididos em 3 grupos (n = 6) que receberam em dose única vo: amoxicilina 50 mg/kg, (*MA*) 700 mg/kg/ e NaCl 0,9% 1 mL/animal (controle). Após 6 horas, dois tecidos não infectados e o soro sanguíneo de cada animal foram submetidos ao teste microbiológico para determinação da concentração dos antimicrobianos. Os tecidos infectados foram submetidos à contagem de colônias. A CIM para os estafilococos foi 0,1% e CBM entre 0,1% e 0,4%. As concentrações de amoxicilina (\pm e.p.m.) foram: tecidual = 2,8 μ g/g (\pm 1,1) e sérica = 5,4 μ g/mL (\pm 0,94). Não foram observados halos de inibição no grupo-controle e (*MA*). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre o número de *S. aureus* (ufc/g \pm e.p.) dos grupos amoxicilina ($1,5 \cdot 10^3 \pm 470$), (*MA*) ($1,6 \cdot 10^4 \pm 7,5 \cdot 10^3$) e controle ($2,9 \cdot 10^4 \pm 9,5 \cdot 10^4$). Assim, concluiu-se que o (*MA*) tem propriedades antimicrobianas *in vitro* sobre cepas de estafilococos resistentes e *in vitro/in vivo* sobre o estafilococo sensível às penicilinas.

Palavras-Chave: Óleo de *Melaleuca alternifolia*; Amoxicilina; Antimicrobianos.

Effect of *Melaleuca alternifolia* over staphylococcal infection

Abstract: The aim of the present study was to test the antimicrobial activity of the tea tree oil (*Melaleuca alternifolia-MA*), both *in vitro* and *in vivo* models. Minimal inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) against penicillin-susceptible/resistant staphylococci strains were obtained. The oil concentrations were 8, 4, 2, 1, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 and 0,00625%. *In vivo* model used 18 rats which had previously received four polyurethane sponges subcutaneously in their backs. After 14 days, two granulomatous tissues were infected with *S. aureus* ATCC25923 (penicillin-susceptible strain). Two days later, the animals were divided into three groups (n = 6): amoxicillin 50 mg/kg/po, (*MA*) 700 mg/kg/po, and NaCl 0.9% 1 mL/rat/po (control). After six hours, two non-infected tissues and serum were submitted to microbiological assay to determine serum and tissue antimicrobial concentrations. Infected granulomatous tissues were removed and submitted to microbial counting. Staphylococci showed MIC = 0.1% and MBC ranging from 0.1% to 0.4%. Amoxicillin concentration (\pm s.e.m.) was 5.4 μ g/mL (\pm 0.94) for serum and 2.8 μ g/g (\pm 1.1) for tissue. No antimicrobial activity was observed for oil and control groups during microbiological assay. Statistically significant differences were observed ($p < 0.05$) among amoxicillin ($1.5 \cdot 10^3 \pm 470$), (*MA*) ($1.6 \cdot 10^4 \pm 7.5 \cdot 10^3$), and control ($2.9 \cdot 10^4 \pm 9.5 \cdot 10^4$) *S. aureus* counts (cfu/g \pm s.e.). In conclusion, *M. alternifolia* oil might have antimicrobial properties against staphylococci strains, in *in vitro* and *in vivo* models.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*; Tea tree oil; Amoxicillin; Antimicrobial agents.

¹ Doutoranda do curso de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

² Professor adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

³ Doutorando em Química Analítica no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

⁴ Professor doutor e coordenador do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade de Sorocaba.

⁵ Professor titular do Departamento de Ciências Fisiológicas

da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

⁶ Doutoranda em Química Analítica no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

⁷ Doutoranda em Química Analítica no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

Endereço: Av. Limeira 901 – Bairro Areião – Piracicaba-SP
CEP 13414-903

Tel.: (019) 4312 5308 – fax (019) 4312 5218

E-mail: simoesjr@uol.com.br

Introdução

As árvores de *Melaleuca alternifolia*, da família das mirtáceas (*Myrtaceae*), podem atingir sete metros de altura, têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte. Podem ser cortadas após 15 meses do cultivo e recortadas a cada ano, pois o crescimento é rápido. Podem sobreviver ao fogo e às inundações, sendo o óleo produzido estável e facilmente estocado e transportado. As grandes plantações australianas têm garantido um suprimento de óleo em grande quantidade e de boa qualidade (Willians et al., 1990).

O óleo obtido das folhas pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cineol), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol (Altman, 1989) que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana. O comitê australiano de padronização estabelece que o óleo deve conter quantidades de cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30% para que tenha eficácia mínima como anti-séptico (Australian Standard As 2782-85).

Esses níveis mínimos e máximos são indicados principalmente porque o cineol é um conhecido irritante da pele e o terpinen-4-ol é apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes. O óleo é considerado como tendo qualidade superior quando contém entre 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinen-4-ol (Willians et al., 1990).

Existem evidências que os aborígenes australianos esmagavam folhas de *M. alternifolia* para obter cataplasmas de ação antibacteriana séculos antes do conhecimento científico sobre os microrganismos (Willians et al., 1990).

Brand et al. (2001) observaram que os componentes do óleo podem suprimir a produção de superóxidos pelos monócitos, mas não pelos neutrófilos, fato que sugere que o óleo tem um potencial para regulação seletiva destas células durante a inflamação. Hart et al (2000) mostraram a habilidade dos componentes aquosos do óleo em suprimir a produção, *in vitro*, de agentes pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina (IL-1 β , IL-8, IL-10) e prostaglandina E2 (PGE2).

O óleo da *M. alternifolia* não mancha, tem boas propriedades de penetração tecidual e é compatível com sabões, sendo considerado um solvente poderoso. Penfold, em 1929, foi o primeiro a detectar as suas propriedades antimicrobianas. É ativo contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas/negativas e fungos. A CIM contra os patógenos mais comuns situa-se entre 0,5 a 1% (Altman, 1989).

Testes contra *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium gypsum* revelaram

uma atividade antimicrobiana significativa contra as cepas, exceto ao *E. floccosum*, sugerindo que o óleo pode ser útil no tratamento de infecções fúngicas da pele (Concha et al., 1998).

Carson et al. (1995) testaram a atividade *in vitro* do óleo contra 66 cepas de *S. aureus*, sendo 64 delas resistentes a metilicilina (MRSA). Observaram que todas as cepas foram sensíveis e apresentaram CIM de 0,312% e CBM de 0,625%.

O *S. aureus* é o mais importante patógeno humano dentre os estafilococos, embora faça parte da microbiota normal humana (Carney et al., 1985; Waldvogel, 1990). Frequentemente é isolado de infecções em feridas pós-cirúrgicas, as quais podem possibilitar o desenvolvimento de infecções sistêmicas (Koneman, 1992).

Os objetivos deste trabalho foram observar o efeito antimicrobiano, *in vitro*, da *M. alternifolia* sobre cepas de estafilococos sensíveis ou não a penicilina e observar, *in vivo*, o efeito de uma solução aquosa de óleo de *M. alternifolia* a 7% sobre a infecção estafilocócica induzida em ratos, comparando-o à amoxicilina.

Material e Método

O extrato de *M. alternifolia* utilizado para os estudos foi importado da Austrália, sendo obtido por uma farmácia de manipulação (Laboratório de Manipulação da Rede Drogal). Sua composição foi analisada através de cromatografia gasosa (cromatógrafo Kovatz 1M, com temperatura de 240°C, gás hélio, fluxo 1 mL/min, coluna DB1 e biblioteca de compostos NIST98) no Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da Unicamp (CPQBA-Unicamp), para o controle de qualidade do óleo (Willians et al., 1990).

Determinação da CIM

Foram utilizados os seguintes estafilococos:

- S. aureus* ATCC 25923
- S. aureus* ST79/741
- S. aureus* NCTC 9789
- S. aureus* DK3177
- S. aureus* FAR 10
- S. aureus* RN9

Os estafilococos foram mantidos em meio de infuso de cérebro-coração (BHI - Difco Co), em incubadora a 37°C.

Para a obtenção da CIM, a concentração dos microrganismos foi 10⁶ ufc/mL. No ensaio da CIM foram utilizados 14 tubos de ensaio com 5 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB - Difco Co), para cada uma das cepas utilizadas.

Em 12 tubos foram acrescidas concentrações progressivas de *M. alternifolia*, sendo o 12º tubo usado como controle (com a menor concentração do óleo,

mas sem inóculo). O 13^a tubo foi usado como controle positivo de crescimento, isto é, sem o óleo, porém com o inóculo e o 14^a usado como controle negativo, isto é, sem o óleo e sem o inóculo. As concentrações utilizadas foram 8, 4, 2, 1, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 e 0,00625%. O ensaio foi feito em triplicata.

Após a adição do óleo, os 11 primeiros tubos (inclusive o controle positivo) receberam 250 µL de um mesmo inóculo contendo 10⁶ ufc/mL.

Todos os tubos foram acondicionados em incubadora a 37°C de temperatura, durante 18 horas. Decorrido esse período, os tubos foram examinados visualmente para comprovar a presença de turvação. O primeiro tubo onde não foi observada turvação foi considerado como tendo a concentração inibitória mínima.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Dos tubos que não se mostraram turvos foram retiradas alíquotas de 5 µL que foram depositadas em placas de Petri contendo ágar sal-manitol (Difco Co). A primeira concentração que não permitiu o crescimento de nenhuma colônia sobre a superfície do ágar foi considerada como a CBM₁₀₀, ou seja, a concentração capaz de matar todos os microrganismos.

Infecção Estafilocócica em Animais

Para observar o efeito do óleo sobre a infecção estafilocócica foi utilizado um modelo experimental (Gropo et al., 2000), sendo utilizada a amoxicilina para comparação da eficácia antibacteriana do óleo.

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus* – albinus, Wistar. S. P. F.****) adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 150 e 200 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais permaneceram cerca de uma semana para adaptação recebendo ração balanceada comercial (Purina) e água *ad libitum*.

Discos de esponjas de poliuretano, com 12 mm de diâmetro por 5 mm de altura, foram obtidos por meio da utilização de um perfurador e esterilizados em autoclave. Os tecidos granulomatosos foram obtidos por meio do implante de quatro desses discos de esponja no tecido subcutâneo, no dorso dos animais.

Decorridos 14 dias da implantação nas esponjas posicionadas caudalmente, foi introduzido 0,5 mL de uma suspensão bacteriana de 10⁸ ufc de *S. aureus* ATCC25923/mL. Esse procedimento foi efetuado em todos os animais, sendo esse dia considerado como dia zero da infecção. Após dois dias, os animais foram separados em 3 grupos distintos, de seis animais cada um. Aos animais do grupo 1 foi administrada uma

suspensão de amoxicilina (50 mg/kg), do grupo 2, óleo de *M. alternifolia* a 700 mg/kg e àqueles do grupo 3 (controle) foi administrado 1 mL de uma solução de cloreto de sódio a 0,9%/kg. Todas as administrações foram em dose única por via intragástrica. Após seis horas da administração, os tecidos granulomatosos foram retirados.

Para correlacionar os diâmetros dos halos de inibição produzidos pelas amostras sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com *S. aureus* ATCC25923 e a concentração dos antimicrobianos em estudo, foi elaborada uma curva de regressão. Discos de papel esterilizados contendo concentrações (em µg/10 µL) de 0,03, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 13,0 e 15,0 do antimicrobiano foram dispostos, após secagem em estufa a 37°C por 1 hora, em placas contendo MHA inoculado com 10⁸ ufc/mL de *S. aureus* ATCC25923.

Previamente ao sacrifício por meio de deslocamento cervical, uma rápida indução anestésica com éter etílico foi induzida, amostras de sangue foram obtidas e, após retração do coágulo e centrifugação durante 10 min a 3.500 rpm, alíquotas de 10 µL do soro sanguíneo resultante foram depositadas em discos de papel de filtro esterilizado. Estes foram posicionados em placas contendo ágar Mueller-Hinton, previamente inoculadas com 10⁸ ufc de *S. aureus* ATCC25923. Os halos de inibição formados após 18 horas de incubação, em aerobiose a 37°C, foram medidos.

Imediatamente após a remoção do sangue do animal, os tecidos granulomatosos não contaminados foram retirados e posicionados em placas contendo ágar Mueller-Hinton, previamente inoculadas com 10⁸ ufc de *S. aureus* ATCC25923. Após 18 horas de incubação, os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro.

As outras duas amostras posicionadas caudalmente, contaminadas previamente, foram colocadas cada uma em um tubo de ensaio diferente, contendo 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Após pesagem e dispersão em um sonicador (Vibra Cell 400w, Sonics & Materials Inc), as amostras foram diluídas (10 e 100 vezes) e alíquotas de 10 µL foram dispersas em placas contendo ágar sal-manitol. Todas as placas eram levadas à estufa a 37°C durante 18 horas e as colônias resultantes foram contadas manualmente.

As concentrações sérica e tecidual foram calculadas com base na equação da curva de regressão. As médias do número de colônias resultantes das infecções divididas pelo peso do granuloma correspondente (ufc/g).

As médias do número de colônias resultantes das infecções e as concentrações sérica e tecidual foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, com auxílio de um programa de computador (Bioestat for Windows, versão 1.0).

Resultados

A Figura 1 e Tabela 1 mostram, respectivamente, o cromatograma e a constituição (pela comparação com a biblioteca de compostos do aparelho) do óleo de melaleuca utilizado neste estudo.

A Tabela 2 mostra a CIM e CBM para os microrganismos estudados.

Em todos os animais foi possível observar a formação do tecido granulomatoso, sendo verificado o desenvolvimento da infecção induzida somente naqueles tecidos que receberam o inóculo de *S. aureus*.

Na Figura 2 podem ser observadas as médias (\pm erro padrão) dos pesos úmidos dos tecidos granulomatosos. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os pesos úmidos dos tecidos infectados contra o tecido não infectado. Entre os tecidos infectados dos animais submetidos aos tratamentos também puderam ser observadas diferenças significativas. No entanto, os animais tratados com amoxicilina não diferiram dos animais tratados com o óleo e nem daqueles do grupo controle ($p > 0,05$).

A curva de regressão (Figura 3) foi traçada pela correlação entre as médias de diâmetros de halo de inibição e contra o logaritmo das concentrações de amoxicilina.

A equação obtida da curva foi $y = 3,2103 \text{ Ln}(x) + 24,169$, com coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,988$, onde $y =$ diâmetro do halo de inibição (mm) e $x =$ quantidade de antimicrobiano (μg). Essa relação é válida para diâmetros de halo de inibição entre 12 e 32,8 mm.

Na Figura 4 podem ser observadas as médias das concentrações tecidual e sérica da amoxicilina. O óleo de *M. alternifolia* e o controle não exibiram halos de inibição, não sendo, portanto, representados no gráfico.

A Figura 5 mostra as médias das contagens de ufc/g nos grupos de estudo. A amoxicilina reduziu cerca de 18 vezes o número de microrganismos da infecção-controle e o óleo reduziu o número em aproximadamente 1,7 vezes. Tanto o grupo tratado com a amoxicilina quanto aquele tratado com óleo foram diferentes entre si e do grupo-controle ($p < 0,05$).

Discussão

Para que tenha eficácia mínima como anti-séptico, o óleo de melaleuca deve apresentar uma percentagem de cineol (agente irritante) abaixo de 15% e de terpinen-4-ol (agente antimicrobiano) acima de 30% (Australian Standard AS 2782-85). Os valores comprovados pela cromatografia gasosa indicam que o óleo utilizado neste estudo poderia ser considerado como de qualidade superior (Willians et al., 1990).

A eliminação de estafilococos MRSA tem incluído a aplicação de agentes tópicos anti-sépticos

(Kauffman et al., 1993; Naguib et al., 1993). Neste aspecto, os resultados obtidos com os ensaios *in vitro* sugerem a eficácia do óleo de *M. alternifolia* como agente anti-séptico e desinfetante sobre cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes (MRSA).

Os valores de CIM observados no presente estudo sobre os estafilococos resistentes ou não a penicilina são concordantes com outros estudos prévios (Walsh & Longstaff, 1987; Altman, 1989; Carson et al. 1995).

A implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) ou poliuretana como agente desencadeador de tecido granulomatoso, no dorso de animais, tem sido um método utilizado para estudar fármacos anti-inflamatórios (Vizioli, 1973; Andrade, 1980) e antimicrobianos (Groppo et al., 2000; Baglie et al., 2000); além disso, sua morfologia e seqüência de formação já foram bem estudadas (Gevartosky, 1984; Mattos Filho, 1990), tornando-o um bom modelo e, por isso, escolhido para este trabalho.

O período de 14 dias de maturação do tecido granulomatoso foi determinado pelos achados de Groppo et al. (2000), que não encontrou diferenças estatisticamente significantes observando nas concentrações de amoxicilina, em tecidos granulomatosos induzidos em ratos, em períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de evolução da lesão.

O presente trabalho optou por provocar a infecção estafilocócica no tecido granulomatoso para proporcionar uma superfície adequada aos agentes patogênicos, uma vez que existem evidências de que, tanto estes agentes quanto a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão bacteriana, requerem uma superfície para exercer sua atividade (Lorian, 1989).

O baixo desvio padrão (menos de 10% do valor da média) observado com relação aos pesos dos tecidos granulomatosos dos diversos grupos de estudo indica uma variação pequena com relação à média, assegurando confiabilidade aos dados relacionados ao peso tecidual. Provavelmente, como apontado por Groppo et al. (2000) e Baglie et al. (2000), o fato de um só operador ter atuado na retirada desses tecidos foi responsável pela pequena diferença observada.

Como observado por Amato-Neto et al. (1985) e Montgomery (1991), um dos principais aspectos necessários ao sucesso da terapia antimicrobiana é o conhecimento da sensibilidade do agente etiológico. O microrganismo utilizado no ensaio *in vivo* teve sua sensibilidade à amoxicilina comprovada pela literatura (Philips et al., 1991; Koneman et al., 1992; Baglie et al., 2000). Antes de ser utilizada neste ensaio, a cepa teve sua pureza e sua sensibilidade novamente avaliadas, confirmando os achados anteriores.

O método microbiológico vem sendo muito utilizado, embora haja outras metodologias para a determinação da concentração de amoxicilina (British

Pharmacopoeia, 1988; US Pharmacopoeia, 1990; Devani et al., 1992; Krauwinkel et al., 1993; Charles & Chulavatnatol, 1993). Este método é comparável aos ensaios com equipamentos tidos como mais precisos, como a cromatografia líquida de alta performance (HSU & HSU, 1992; Moore et al., 1996). Assim, a utilização do método microbiológico ocasionou mensurações dos níveis de amoxicilina com precisão suficiente para o propósito deste trabalho. Entretanto, o método não mostrou eficácia em determinar as substâncias antimicrobianas oriundas do óleo.

A lise significativa nas células bacterianas provocada pela amoxicilina não foi traduzida em um menor peso tecidual. Seria possível entender esse fenômeno tomando como princípio que os antimicrobianos sozinhos não conseguem erradicar a infecção, mas apenas causar uma redução no número de microrganismos viáveis (Montgomery, 1991; Andrade, 1999). Embora após seis horas da administração do antimicrobiano fosse verificada uma diminuição significativa do número de bactérias viáveis, os mecanismos de defesa do hospedeiro, provavelmente, não haviam completado a remoção dos microrganismos mortos, aumentando assim o peso tecidual. Em contrapartida, o óleo de melaleuca, além de reduzir o número de microrganismos, ainda reduziu o peso tecidual. Esse fenômeno poderia ser em virtude de uma possível atividade antiinflamatória do óleo, como observado previamente (Brand et al., 2001; Hart et al., 2000).

As concentrações sérica e tecidual da amoxicilina observadas foram similares àquelas observada por Baglie et al. (2000) sob condições metodológicas também similares. Esse autor observou 4 e 2,67 $\mu\text{g/g}$, após 4 e 6 horas da administração de uma dose única de 40 mg/kg em ratos, respectivamente. As concentrações séricas nesses mesmos períodos (9,62 e 9,28 $\mu\text{g/mL}$) também apresentaram similaridade. As concentrações

séricas e teciduais resultantes situaram-se, ainda, acima da concentração inibitória mínima para *S. aureus* sensíveis a penicilina, que é da ordem de 0,06 a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Baglie et al., 2000).

Em humanos, o estudo da farmacocinética da amoxicilina, após uma única dose de 40 mg/kg mostrou concentrações plasmáticas, após 4 e 6 horas, na faixa de 10,7 e 3,7 $\mu\text{g/mL}$ (Dajani et al., 1994), dados similares aos encontrados no presente estudo.

As observações de Baglie et al. (2000) acerca da proporcionalidade entre as concentrações sérica e tecidual se repetiram no presente estudo, pois pôde ser verificada uma relação diretamente proporcional entre as mesmas.

Apesar de ter resultado em um número pequeno de ufc/mL, a utilização da amoxicilina nas doses empregadas não foi capaz de reduzir totalmente o número de microrganismos, erradicando a infecção. Esse fato ocorreu porque, em áreas onde a infecção está contida pelos mecanismos de defesa do organismo, as bactérias multiplicam-se em velocidade extremamente lenta, dificultando a ação das penicilinas que necessitam da divisão celular para atuar (Montgomery, 1991; Andrade, 1999). O mesmo fato poderia ser aplicado ao óleo de melaleuca.

Foi possível concluir que o óleo de melaleuca tem propriedades antimicrobianas *in vitro* sobre cepas de estafilococos resistentes e *in vitro/in vivo* sobre o estafilococo sensível às penicilinas.

Agradecimentos

Ao prof. dr. Douglas Kernodle que doou as cepas de referência, produtoras de beta-lactamases e resistentes a metilina (MRSA).

TABELA 1 – Elementos componentes do óleo

TABLE 1 – The oil components

| <i>Pico</i> | <i>Substância</i> | <i>Área do pico</i> | <i>% da área</i> |
|-------------|--------------------------------|---------------------|------------------|
| <i>1</i> | alfa thujeno | 7712714 | 0,55 |
| <i>2</i> | alfa pineno | 20002350 | 1,42 |
| <i>3</i> | alfa terpineno | 83249552 | 5,92 |
| <i>4</i> | 1 metil 4-1 metil etil benzeno | 64121071 | 4,56 |
| <i>5</i> | 1,8 cineol | 48775574 | 3,47 |
| <i>6</i> | gama terpineno | 224383620 | 15,95 |
| <i>7</i> | alfa terpinoleno | 31717949 | 2,25 |
| <i>8</i> | terpinen-4-ol | 717128700 | 50,97 |
| <i>9</i> | alfa terpineol | 50359663 | 3,58 |
| <i>10</i> | alfa gurjuneno | 4870053 | 0,34 |
| <i>11</i> | trans cariofileno | 7092865 | 0,5 |
| <i>12</i> | + aromadendreno | 22574822 | 1,6 |
| <i>13</i> | delta cadineno | 38799407 | 2,75 |

TABELA 2 – CIM e CBM para os microrganismos estudados

TABLE 2 – MIC and MBC to the studied microorganisms

| Microrganismos | CIM % | CBM % |
|---|--------------|--------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0,1 | 0,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ST79/741 | 0,1 | 0,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 9789 | 0,1 | 0,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> DK3177 | 0,1 | 0,4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FAR 10 | 0,1 | 0,4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN9 | 0,05 | 0,1 |

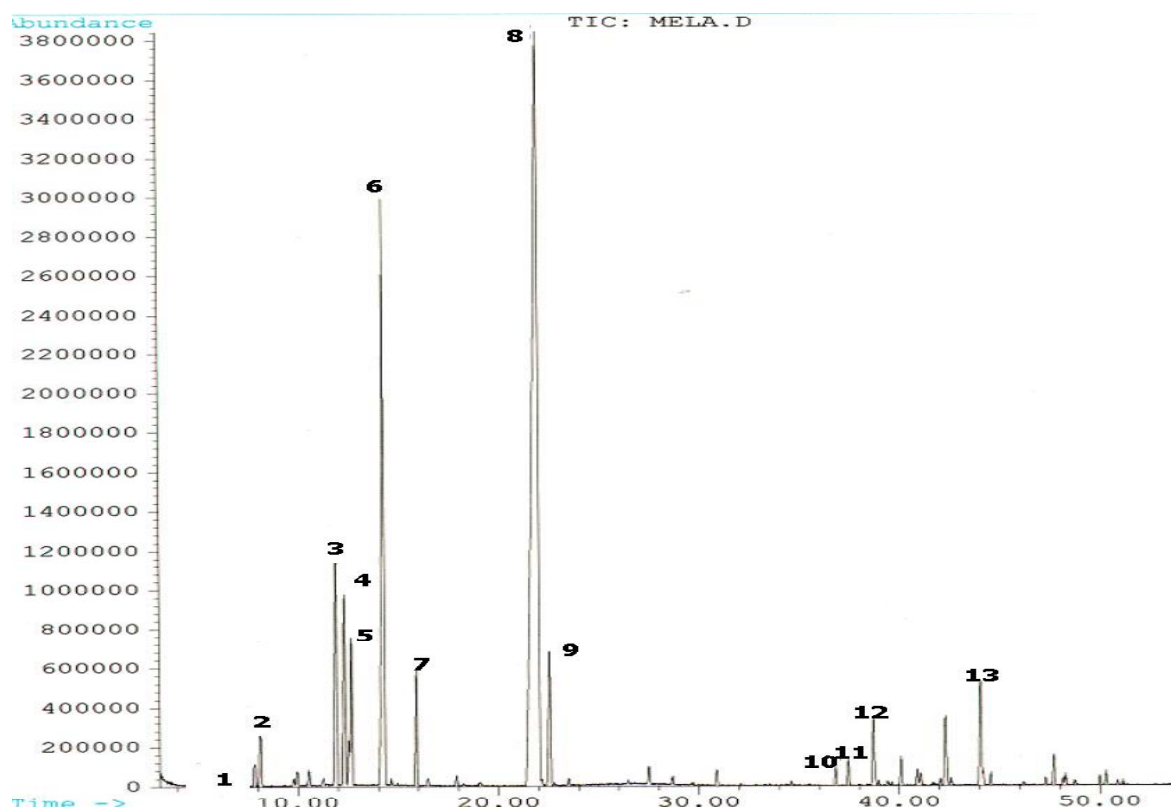
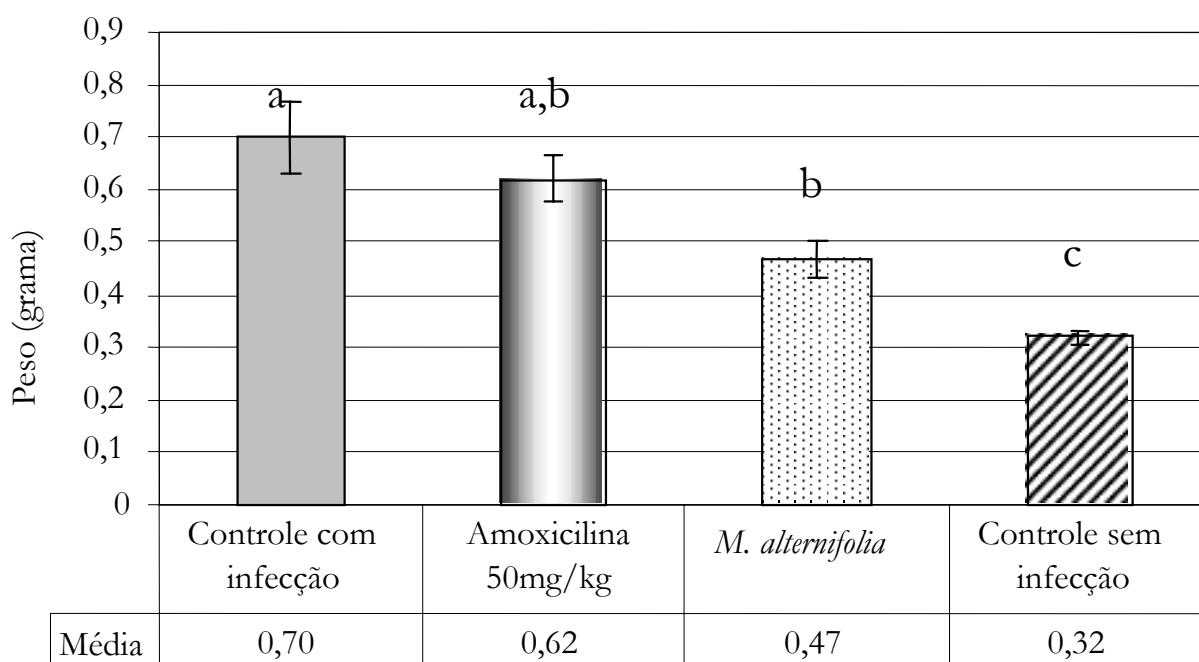


FIGURA 1 – Cromatograma do óleo de melaleuca utilizado

FIGURE 1 – Tea tree oil chromatogram



As barras representam as médias +/- e. p. m. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes

FIGURA 2 – Médias dos pesos (em g) dos tecidos granulomatosos

FIGURE 2 – Weight average (g) of granulomatous tissues

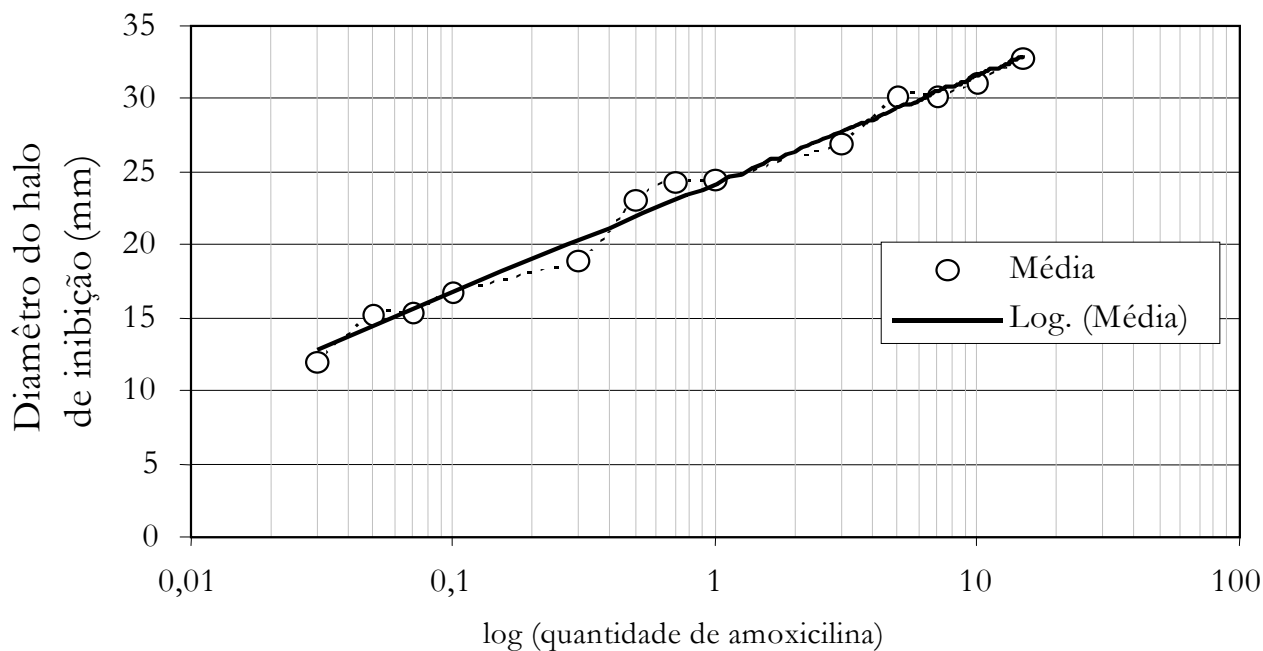
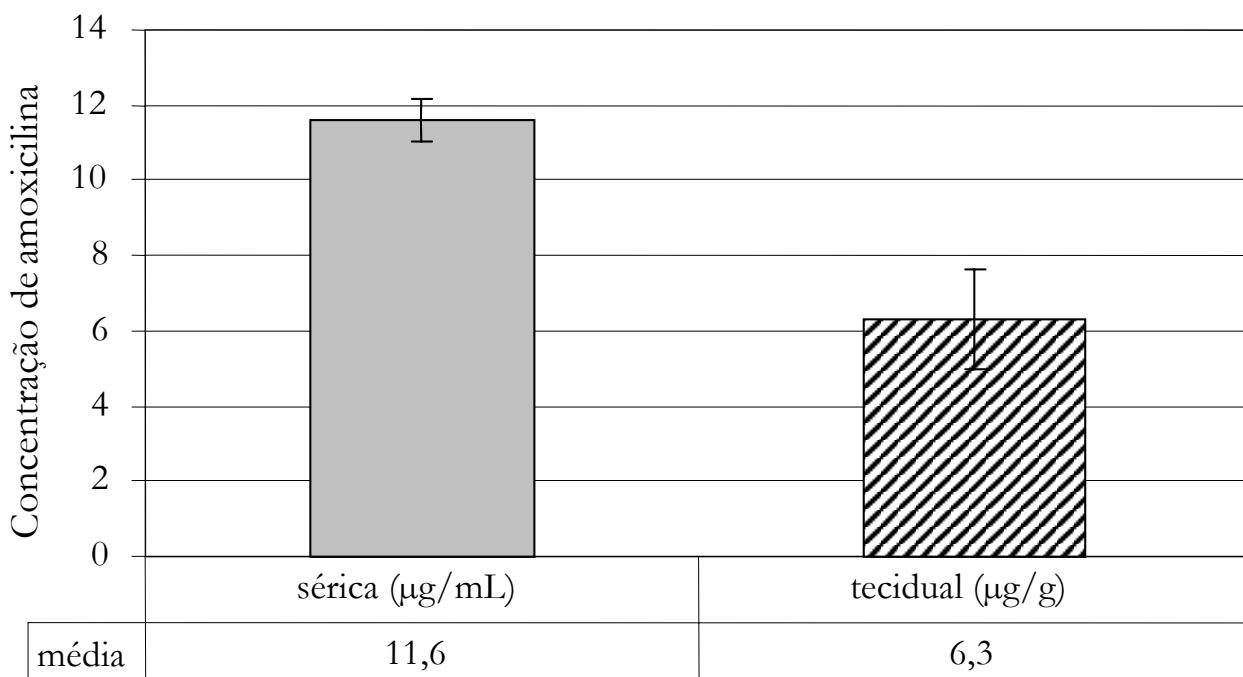


FIGURA 3 – Curva de regressão

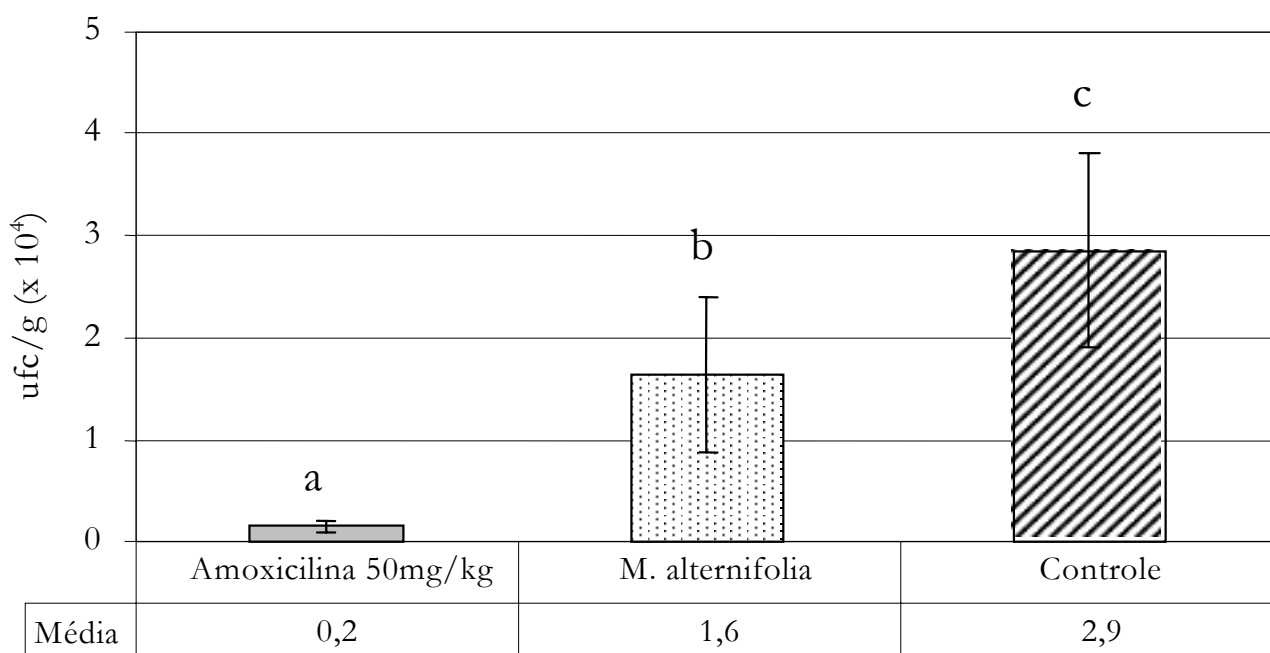
FIGURE 3 – Regression Curve



As barras representam as médias +/- e. p. m.

FIGURA 4 – Concentrações tecidual e sérica de amoxicilina

FIGURE 4 – Serum and tissue amoxicillin concentration average



As barras representam os erros padrões máximo e mínimo. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes.

FIGURA 5 – Médias das contagens de ufc/g de tecido, nos grupos de estudo

FIGURE 5 – Count average of ufc/g tissue in all groups

Referências Bibliográficas

- ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil – a natural antiseptic. *Aust. J. Biotech.*, v. 3, n. 4, p. 247-248, 1989.
- AMATO-NETO, V. et al. *Antibióticos na prática médica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1985.
- ANDRADE, E. D. *Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias*. 1980. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- ANDRADE, E. D. *Terapêutica medicamentosa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1999.
- AUSTRALIAN STANDARD AS 2782-85. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type. 1995. In: ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil - a natural antiseptic. *Aust. J. Biotech.*, v. 3, n. 4, p. 247-248, 1989.
- BAGLIE, S.; GROppo, F. C.; MATTOS F^o, T. R. Tissue pharmacokinetic of amoxicillin. An experimental design in rats. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 4, n. 4, p. 197-203, 2000.
- BRAND, C. et al. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. *Inflamm. Res.*, v. 50, n. 4, p. 213-9, 2001.
- Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 20, n. 2, p. 143-152, jul./dez. 2002
- BRITISH PHARMACOPOEIA. Her majesty's stationary office. London, v. 1, p. 31-32, 1988.
- CARNEY, D. N. et al. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* in patients with cancer: report on 45 cases and a review of the literature. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v. 4, n. 1, p. 1-12, 1985.
- CARSON, C. F. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 35, n. 3, p. 421-4, 1995.
- CHARLES, B.; CHULAVATNATOL, S. Simple analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection. *Biomed. Chromatogr.*, London, v. 7, n. 4, p. 204-207, 1993.
- CONCHA, J. M., MOORE, L. S., HOLLOWAY, W. J. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil against various pathogenic organisms. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, v. 88, n. 10, p. 489-92, 1998.
- DAJANI, A. S.; BAWDON, R. E.; BERRY, M. C. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? *Clin. Inf. Dis.*, Chicago, v. 18, n. 2, p. 157-160, Feb. 1994.

- DEVANI, M. B.; PATEL, I. T.; PATEL, T. M. Spectrophotometric determination of amoxicillin and its dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 10, n. 5, p. 355-358, May 1992.
- GEVARTOSKY, I. M. *Estudo histológico dos efeitos de três drogas antibióticas sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos, por meio da implantação de esponja*. 1984. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- GROPPPO, F. C.; MATTOS F^o, T. R.; DEL FIOLO, F. S. Bioassay of amoxicillin in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 23, n. 9, p. 1033-1035, 2000.
- HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.*, v. 49, n. 11, p. 619-26, 2000.
- HSU, M. C.; HSU, P. W. High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 36, n. 6, p. 1276-1279, June 1992.
- KAUFFMAN, C. A. et al. Attempts to eradicate methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a long term care facility with the use of mupirocin ointment. *Amer. Journal Med.*, v. 94, p. 371-8, 1993.
- KONEMAN, E. W. et al. *Introduction to diagnostic microbiology*. 2. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1992.
- KRAUWINKEL, W. J. J.; KAMERMANS-VOLKERS, N. J.; ZIJTVELD, J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, v. 617, n. 2, p. 334-338, Aug. 1993.
- LORIAN, V. *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the culture medium. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 27, n. 11, p. 2403-2406, 1989.
- MONTGOMERY, E. H. Antibióticos antibacterianos. In: NEIDLE, E. A.; YAGIELA, J. A. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 412-446.
- MOORE, T. D. et al. Stability of amoxicillin-clavulanate in bactec medium determined by high-performance liquid chromatography and bioassay. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 34, n. 5, p. 1321-1322, 1996.
- NAGUIB, M. H.; NAGUIB, M. T.; FLOUMOV, D. J. Mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a veterans hospital. *Chemotherapy*, v. 39, p. 400-4, 1993.
- PHILIPS, I. et al. A guide to sensitivity testing. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 27, p. 1-50, 1991 [Supplement D].
- UNITED STATES PHARMACOPOEIA XXII. The national formulary XVII, Rockville, p. 80-84, 1990.
- VIZIOLI, M. R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. *Acta anat.*, Basel, v. 85, n. 3, p. 358-377, 1973.
- WALDVOGEL, F. A. *Staphylococcus aureus*. In: MANDELL, G. L. et al. *Principles and practice of infectious diseases*. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1990.
- WALSH, L. J.; LONGSTAFF, J. The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. *Periodontology*, v. 8, p. 11-15, 1987.
- WILLIAMS, L. R. et al. Antimicrobial activity of oil of melaleuca (tea tree oil). Its potential use in cosmetics and toiletries. *Cosmet. Aerosols Toiletries Aust.*, v. 4, n. 4, p. 12-22, 1990.