

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*



ISSN: 2316-2317

Revista Eletrônica Multidisciplinar FACEAR

Amanda Piovezan Freitas¹; Franciely Vanessa Ribas²; Suzana Carstensen³

Faculdade Educacional de Araucária

RESUMO

A onicomicose é uma infecção causada principalmente por fungos dermatófitos e por espécies de *Candida sp.* provocando lesões nas unhas. Uma grande maioria dos óleos essenciais possui propriedade antifúngica, dentre a variedade dos óleos existentes destaca-se o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, que possui em sua composição o terpinen-4-ol o principal composto responsável pela propriedade fungicida. O objetivo deste trabalho consiste em avaliar a ação antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca* aplicando-o em um creme hidratante utilizando diferentes concentrações e submetendo-o a testes de estabilidade, análise físico-química e microbiológica. Deste modo, avaliamos a possibilidade do uso do óleo de *Melaleuca* para o tratamento de onicomicose causadas por fungos, dentre eles o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* e a levedura *Candida albicans*. Observamos uma eficácia considerada em todos os testes realizados com o óleo de *Melaleuca* comprovando a atividade fungicida deste óleo e o propondo como uma alternativa para o tratamento de onicomicoses.

Palavras chave: Onicomicose; *Melaleuca alternifolia*; *Trichophyton mentagrophytes*; *Candida albicans*

ABSTRACT

Onychomycosis is an infection caused mainly by *dermatophytes* and *Candida sp.* species causing damage to the nails. A large majority of the essential oils have antifungal properties, among the variety of existing oils highlights the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, which has in its composition the terpinen-4-ol the main compound responsible for the fungicidal property. The objective of this study is to evaluate the antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca* applying it in a moisturizer using different concentrations and subjecting it to tests of stability, physico-chemical and microbiological analysis. Thus, we evaluated the possibility of using oil of *Melaleuca* for the treatment of onychomycosis caused by fungi, among theres the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* and the yeast *Candida albicans*. We observed an efficacy considered in all tests with the oil of *Melaleuca* demonstrating the fungicidal activity of this oil and proposing it as an alternative for the treatment of onychomycosis.

Keywords: Onychomycosis; *Melaleuca alternifolia*; *Trichophyton mentagrophytes*; *Candida albicans*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais estão presentes nas plantas aromáticas e são extraídos de flores, folhas, cascas, caules e frutos através da técnica de arraste a vapor, tendo grande aplicação na perfumaria, cosmética e alimentos, alguns já conhecidos são utilizados como coadjuvantes em medicamentos (BIZZO *et al.*, 2009 e NOVACOSK e TORRES, 2006).

Podem ser classificados como substâncias voláteis e hidrofóbicas, que em sua maioria estão relacionados com o papel de defesa contra micro-organismos e predadores, função essencial para a sobrevivência vegetal em seu ecossistema.

Essas substâncias possuem princípios ativos com propriedades antissépticas, antibacterianas, refrescantes, anti-inflamatória, antifúngicas, anestésicas entre outras, ativos estes responsáveis por diversas aplicações terapêuticas (SIANI *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura, cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas. Sua atuação principal é sobre a membrana celular dos fungos, comprometendo sua estrutura, alterando a fluidez e permeabilidade interferindo na respiração celular (PEREIRA *et al.*, 2009 e LIMA *et al.*, 2006).

1.2. *Melaleuca Alternifolia*

A *Melaleuca alternifolia* é uma planta nativa da Austrália conhecida também como *Tea tree* (árvore do chá), tem a casca fina, folhas longas e pontiagudas que emitem um forte aroma quando partidas. Produz um óleo essencial com propriedades antifúngicas, anti-inflamatória, antisséptica, cicatrizante entre outras (SIMÕES *et al.*, 2002).

Devido às suas propriedades curativas, o óleo essencial de *Melaleuca* foi usado por tribos aborígenes durante milhares de anos. As folhas desta planta eram esmagadas juntamente com lama, obtendo assim uma pasta onde era aplicada no tratamento de cortes e infecções da pele. Atualmente vem sendo muito utilizada para diversos tipos de afecções cutâneas, sobretudo as provocadas por fungos e bactérias como micoses de unha, frieiras, furúnculos, candidíase, psoríases, acnes etc. (HAMMER *et al.*, 2003 e AZEVEDO, 2010).

O óleo essencial da *Melaleuca* é obtido por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor das folhas e tem como principais componentes os terpenos (pineno, terpineno e cimeno). Dentre os componentes encontrados, dois apresentam maior destaque, o terpinenol (terpinen-4-ol) considerado o principal constituinte para sua eficácia antimicrobiana que deve estar acima de 30% em sua composição e o composto 1,8-cineol abaixo de 15%, pois o cineol é um conhecido irritante da pele conforme estabelecido pelo comitê australiano de padronização (CASTRO *et al.*, 2005, SIMÕES *et al.*, 2002).

Hammer *et al.* (2002) relacionou a ação fungistática e fungicida frente a dermatófitos e fungos filamentosos. Em 2004 e 2012, Hammer *et al.* observaram a ação do óleo de *Melaleuca* sobre a *Candida albicans* e outros patógenos constatando que os componentes contidos no óleo são capazes de alterar a permeabilidade e a fluidez da membrana dos microrganismos. Estas modificações, provavelmente, estão relacionadas com as ligações dos terpenos aos ácidos graxos da membrana lipídica, gerando instabilidade nas membranas celulares fúngicas, além de acúmulo de trealose intracelular.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

Como esses organismos são permeáveis ao óleo, os principais efeitos encontrados são a inibição da respiração celular e a alteração na estrutura e na integridade de sua membrana, bem como vazamento do material intracelular. Isso leva à morte dos fungos e das bactérias, além de inibir o processo de crescimento e auxiliar na eliminação das doenças (HAMMER *et. Al.*, 2003; AZEVEDO, 2010).

1.3. Os Fungos

Os fungos podem ser encontrados em diferentes substratos, fazendo reciclagem de matérias da natureza, no solo, em vegetais, água e em animais, apresentam uma alta capacidade de adaptação a ambientes hostis. Além de estarem presente na microbiota residente, colonizando o indivíduo sem causar doença (TORTORA *et al.*, 2005 e TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Quando os fungos encontram condições favoráveis ao seu crescimento, como calor, umidade, baixa imunidade ou uso de antibióticos sistêmicos por longo prazo, estes fungos se reproduzem e passam então a causar a doença (LIMA 2008).

A sua identificação pode ser feita tanto de maneira macroscópica como microscópica. Em se tratando da identificação macroscópica os bolores apresentam vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, cotonosas, pulverulentas, celebriforme, veludosa, penugenta entre outras. As leveduras apresentam colônias cremosas e com os mais diversos tipos de pigmentos. Para se colonizarem é necessário que encontrem substratos com os nutrientes necessários para que cresçam, dessa forma é que deterioram vários materiais e ocasionam micoses aos seus hospedeiros. Qualquer infecção de origem fúngica é chamada de micose, que geralmente, devido à velocidade de reprodução desses organismos são caracterizadas por apresentarem uma longa duração (TORTORA *et al.*, 2005 e TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

1.4. Onicomicoses

Onicomicose é o termo usado para referenciar as infecções fúngicas das unhas. Outro termo que apresenta o mesmo significado é a *Tinea unguium* onde a invasão dermatofítica das unhas, apresenta um difícil tratamento e afeta mundialmente mais de 8% da população em geral. A queratina substancia que forma as unhas é o principal nutriente dos fungos dermatófitos (MARTINS 2009).

A infecção é causada por leveduras e fungos filamentosos, pode ocorrer por contato com animais, no solo ou por alicates e tesouras contaminadas. As unhas dos pés são as mais afetadas, devido o ambiente úmido escuro e aquecido encontrados dentro dos sapatos que favorece o crescimento do fungo. As onicomicoses causadas por dermatófitos diferenciam-se das causadas por leveduras pela forma do comprometimento das unhas (LACAZ *et al.*, 2002).

1.5. Dermatófitos

Os dermatófitos são um grupo de fungos que apresentam a capacidade de invadir os tecidos queratinizados (pele, pêlos e unhas) do homem e dos animais com a habilidade de degradar a queratina e transforma-la em nutriente para seu crescimento. Entre os causadores de onicomicoses os dermatófitos mais comuns são *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

São divididos em antropofílicos, são adaptados ao homem, provocam pouca ou nenhuma reação inflamatória. Os zoofílicos possuem preferência por animais, mas que quando atacam ao homem provocam reação inflamatória de média intensidade. Enquanto que os geofílicos são caracterizados pela inflamação que produzem no homem de tendência à cura espontânea (WEITZMAN E SUMMERBELL, 1995).

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

Esses grupos de fungos são causadores de aproximadamente 90% das onicomicoses dos pés, e as leveduras por 50% das infecções nas unhas das mãos. De 90% dos casos de infecções dos pés o fungo *Trichophyton mentagrophytes* é responsável por 20% (MARTINS 2009).

Os fungos penetram na unha previamente doente de forma voluntária, começam comprometendo a parte distal em direção à parte proximal da unha e é essa característica que diferencia a onicomicose causada por dermatófitos. Uma vez que as leveduras compromete primeiramente a prega ungueal proximal (LIMA *et al.*, 2008, TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

1.6. *Trichophyton mentagrophytes*

Os *Trichophyton mentagrophytes* é a espécie responsável pela segunda ou terceira causa de dermatofitose no homem, dentre elas a onicomicose. É a mais comum nas infecções dos pés, unhas e raramente do couro cabeludo. Possui como características principais colônias de desenvolvimento rápido com maturação por cerca de 6 a 11 dias após ser semeado, apresentam aspecto algodinoso, branco, com reverso de cores variadas (MARTINS *et al.*, 2005).

É possível observar em microscópios os macroconídios cilíndricos, multisseptados, de paredes lisas e finas, dispostos em cachos ou em forma de lágrima ou gota e em maior quantidade, microconídios redondos, ovais ou piriformes (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

1.7. Leveduras

O termo levedura deriva da palavra latina *levare*, associada ao característico crescimento rápido. Possuem formato esférico ou oval, são maiores que as bactérias com tamanho entre 5-8 µm, se multiplicam por brotamento ou cissiparidade e que geralmente não apresentam filamentos com micélio. Por serem constituintes da microbiota normal de mucosas, peles e anexos, as leveduras eram consideradas agente contaminante sem importância clínica, porém, atualmente tem-se observado que são responsáveis por um número expressivo de casos de onicomicoses (LACAZ, 1973).

1.8. *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são quase sempre responsáveis pela infecção de onicomicoses não dermatofítica, nessas infecções a *Candida albicans*, é a de maior número de casos. Em indivíduos imunodeprimidos essa levedura tem uma maior facilidade de penetrar na unha normal causando uma séria infecção (LACAZ *et al.*, 2002).

A onicomicose causada pela *Candida albicans* inicia-se com uma infiltração da prega ungueal com um inchaço (paroníquia), a pele fica fina, vermelha e com uma leve descamação, podendo sair pus quando o edema é pressionado, provocando dor intensa quando a pele entra em contato com a água. As alterações secundárias podem ser provocadas por achatamento e amolecimento da unha que pode vir a cair (SOUZA 2008).

Essas infecções são relativamente frequentes em mulheres que mantem maior contato com a água devido às atividades exercidas em ambiente doméstico, como por exemplo, em cozinhas e lavanderias. Nos homens a infecção pode ocorrer em maior quantidade em jardineiros, manipuladores de frutas entre outros com atividade que propicia a penetração dos fungos (LACAZ *et al.*, 2002 e LIMA 2008).

Mediante ao exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar a capacidade fungicida de um creme hidratante utilizando diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca* frente aos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e a *Candida albicans*.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

Seguindo as normas estabelecidas pelo guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) foi/foram realizadas análises de estabilidade sob o aspecto físico-químico e microbiológico do produto.

2. METODOLOGIA

Para este trabalho foi utilizado o óleo essencial de Melaleuca doado pela empresa Beraca, que é líder no fornecimento de ingredientes naturais e orgânicos disponibilizando para as indústrias cosmética e farmacêutica insumos sustentáveis de alta performance e eficácia comprovada.

A escolha deste óleo se deve pelas diversas propriedades dentre elas a ação antifúngica descrita em literatura. Os experimentos de estabilidade e análises microbiológicas foram realizados na empresa Bayonne Cosméticos LTDA (Racco) pelas acadêmicas. Paralelamente as amostras foram enviadas para teste de atividade fungistática e teste de desafio (Challenge test), realizados em empresas terceirizadas.

2.1. Avaliação da atividade Fungicida do óleo essencial de Melaleuca frente aos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*.

Para avaliar a propriedade fungicida as amostras do creme hidratante contendo as concentrações de 3, 5 e 10% do óleo essencial de Melaleuca foram enviadas para o laboratório da Ecolyzer para realizar análises microbiológicas específicas para os fungos *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

A técnica empregada pelo laboratório foi a atividade fungistática, baseada na introdução da amostra no centro de uma placa de Petri, contendo meio ágar glicosado a 2% juntamente com o inóculo do microrganismo alvo. As placas foram incubadas por 07 dias e observa-se a presença ou ausência do halo de inibição. O objetivo do ensaio é verificar a eficácia do produto frente aos microrganismos, quanto a sua ação fungistática, ou seja, avaliar se a substância teste é capaz de inibir a proliferação de fungos. Para esta técnica o laboratório da Ecolyzer utilizou a metodologia seguindo o protocolo da INCQS/FIOCRUZ descrito na tabela abaixo.

TABELA 01: METODOLOGIA ATIVIDADE FUNGISTATICA DO LABORATORIO ECOLYZER
Atividade Fungistática

Fundamentos do Ensaio	O Ensaio baseia-se na introdução do produto testado em uma Placa de Petri com Agar sólido. Este meio de cultura contém o microrganismo alvo que em
------------------------------	---

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

	contato com o produto, poderá formar um halo de inibição de crescimento.
Microrganismos testados	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> e <i>Candida albicans</i>
Procedimento	Preparar o microrganismo teste; Preparar o meio de cultura sólido, aguardar resfriar e adicionar o microrganismo teste; Transferir a mistura para Placas de Petri e aguardar solidificar; Identificar as placas com as informações necessárias; Fazer um orifício no centro da placa ou depositar a amostra na superfície do meio de cultura inoculado com o microrganismo teste; Incubar a 26± 1°C por 7 dias; Realizar leitura após incubação.
Expressão de Resultados	Os resultados são obtidos através da observação da ausência de crescimento ao redor do local onde foi depositada a substância teste.
CrITÉRIOS de Aceitação	Consideram-se aceitas as amostras cujos resultados apresentem um halo de inibição de crescimento ao redor da amostra.

FONTE: LABORATÓRIO ECOLYZER

2.2. Avaliação da atividade fungicida e bactericida do óleo de Melaleuca com Teste de desafio (*Challenge test*)

Conforme determinado no guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA, enviamos o creme contendo a concentração de 3, 5 e 10% do óleo essencial de Melaleuca para uma análise de teste de desafio (*Challenge test*) para avaliar a resistência do creme contra bactérias, bolores e leveduras.

Este teste de desafio foi realizado pelo laboratório L.C.Q.Pq. (Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa) utilizando o protocolo da USP conforme descrito na tabela abaixo.

TABELA 02: METODOLOGIA DO TESTE DE DESAFIO DO LABORATÓRIO L.C.Q.PQ.

Método	USP XXXII
Organismos teste	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538), <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027),

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739), <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) e <i>A. brasiliensis</i> (ATCC 16404)
Inóculo (UFC/g ou mL)	Cultura pura 10 ⁵ a 10 ⁶
Numero de inoculações	1
Intervalos de contagem	7,14,21 e 28 dias
Critérios de aprovação	Bactérias: redução de 2 log no 14 ^o dia. Não aumentar até o 28 ^o dia. Bolors e Leveduras: não aumentar a contagem inicial no 14 ^o e 28 ^o dia.

FONTE: TABELA 15 DO GUIA ABC DE MICROBIOLOGIA 4^o EDIÇÃO

Este método consiste na contaminação proposital do produto com micro-organismos específicos e avaliação da amostra em intervalos de tempo definidos com o objetivo de avaliar a eficácia do sistema conservante, irritação e toxicidade. O teste de desafio apresenta uma importância não somente sob o aspecto microbiológico, mas também auxilia na determinação do prazo de validade do produto.

2.3. Avaliação da estabilidade do óleo de Melaleuca aplicado em uma base de creme hidratante.

Seguindo o guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA realizamos o teste de estabilidade do creme hidratante aplicando o óleo essencial de Melaleuca nas concentrações de 3, 5 e 10%, adicionando 200mL de cada formulação em frascos de vidro fechado, os quais foram armazenados em estufas com temperaturas de 5°C, 37°C, 45°C e 50°C, em exposição solar e temperatura ambiente durante um período de 90 dias, onde foram realizada análises físico-química e microbiológica (em duplicata) no início em 07, 15, 30, 60 e 90 dias.

Os parâmetros avaliados dependem das características de cada formulação, mas geralmente são avaliados o aspecto, cor e odor, pH, viscosidade e densidade. A amostra deve ser analisada em relação ao padrão (temperatura ambiente) a fim de avaliar as características e sinais de instabilidade, onde pode ser classificado como normal, separado, precipitado, turvo, sem alteração, levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo.

As análises microbiológicas foram realizadas com base no guia ABC de Microbiologia, que tem como parâmetros controle microbiológico para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que segue a RDC 481/1999 da ANVISA, onde os limites aceitáveis para produtos do Grupo II de micro-organismos totais aeróbios são de:

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

10³UFC/g ou mL respeitando um limite máximo de 5,0x10³ UFC/g ou mL e ausência para: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e fecais em 1g ou 1mL.

A metodologia utilizada para a análise de mesófilos totais foi à semeadura em meio sólido por profundidade ou *Pour Plate*. Para a análise de bactérias patogênicas foi utilizada a técnica de pré-enriquecimento e semeadura por esgotamento em meio seletivo.

2.4. Pour plate

No interior do fluxo laminar pesamos 10g da amostra em um frasco contendo 90mL de caldo estéril TSB (Tryptic Soy Broth), transferimos 1mL desta mistura para 72 placas de petri. Adicionamos em 36 placas aproximadamente 20mL do ágar TSA (Tryptic Soy Agar) e fez-se o mesmo em 36 placas do ágar Saboraud (SB) e incubou-se em estufa a 36°C, por 48 horas para bactérias (TSA) e 168 horas (SB) para bolores e leveduras, em estufa a 25°C ± 1°C. Após esse período realizamos leitura verificando a presença ou ausência de crescimento.

2.5. Verificação de crescimento de bactérias patogênicas

Para verificação utilizamos 03 placas de cada meio de cultura (ágar Vogel & Johnson para *Staphylococcus aureus*, ágar Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa* e ágar MacConkey para *Escherichia coli*.) seguindo o método de esgotamento e incubando por no mínimo 24-48 horas a 35°C (±2). Após esse período foi realizado leitura verificando a presença ou ausência de crescimento.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. Resultado da análise Atividade Fungistática

No estudo da avaliação da atividade fungistática realizado pelo laboratório da empresa Ecolyzer, o óleo essencial de *Melaleuca* mostrou uma boa ação fungicida frente aos micro-organismos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*. Apenas na concentração de 3% do óleo que a ação foi insatisfatória para *Candida albicans*, onde apresentou um baixo poder de inibição como pode ser observado na tabela abaixo.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

TABELA 03: RESULTADO DO TESTE DE ATIVIDADE FUNGISTÁTICA.

Concentração do Óleo de Melaleuca	10%	5%	3%
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>Candida albicans</i>	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório

FONTE: LAUDO DE ANÁLISE ECOLYZER

A resistência da *Candida albicans* sob a concentração do creme contendo 3% do óleo pode ter sido apresentada pela baixa concentração do mesmo insuficiente para inibi-la ou até mesmo pelas condições ambientais como, por exemplo, umidade e temperatura no envio da amostra, tendo como consequência o favorecimento do crescimento da levedura.

Segundo os critérios de aceitação do laboratório Ecolyzer, a amostra é considerada satisfatória quando for observada a ausência de crescimento microbiano ao redor da preparação.

3.2. Resultado do Teste de desafio (*Challenge test*)

O teste de eficácia de conservante é realizado com objetivo de determinar o tipo e a concentração satisfatória necessária do conservante para a formulação do produto, e devem ser utilizados conforme o estabelecido na resolução 162/01 da ANVISA. Porém existem outras substâncias usadas em formulações cosméticas que também possuem ação conservante, mas não estão incluídas nesta lista, como por exemplo, alguns álcoois e muitos óleos essenciais.

No teste realizado pelo laboratório L.C.Q.Pq os resultados demonstraram que o óleo essencial de Melaleuca foi eficaz para a redução de crescimento dos micro-organismos testados, nas três diferentes concentrações utilizadas, conforme observado no resultado da tabela abaixo.

**TABELA 04: RESULTADO DO TESTE DE DESAFIO DO LABORATÓRIO L.C.Q.PQ.
TESTE DE EFICÁCIA DO PODER CONSERVANTE – CHALLENGE TEST**

	Microorganismos utilizados	
	Bactérias	Bolores e Leveduras
Temperatura utilizada para o teste: 22,5 ± 2,5°C	<i>Staphylococcus aureus</i> – ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ATCC 9027 <i>Escherichia coli</i> – ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> - ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> - ATCC 16404

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

<p>Concentração do óleo utilizada de 10%</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Bactérias viáveis (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>) acima de 99,90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, seguida de redução contínua até a finalização do ensaio.</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Leveduras acima de 90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, permanecendo assim até a finalização do ensaio.</p> <p>Houve redução de Bolores (<i>Aspergillus brasiliensis</i>) acima de 90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, e após o 7º dia da reinoculação a redução foi de 87% seguida de redução contínua até a finalização do ensaio.</p>
<p>Concentração do óleo utilizada de 5%</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Bactérias viáveis (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>) acima de 99,90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, seguida de redução contínua até a finalização do ensaio.</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Leveduras acima de 90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, permanecendo assim até a finalização do ensaio.</p> <p>Houve redução de Bolores inferior a 90% (77,5%) da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, e após o 7º dia da reinoculação, a redução foi de 39% seguida de redução contínua até a finalização do ensaio.</p>
<p>Concentração do óleo utilizada de 3%</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Bactérias viáveis (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>) acima de 99,90% da contagem inicial, a partir do 7º</p>	<p>Após 02 (duas) inoculações consecutivas:</p> <p>Houve redução de Leveduras acima de 90% da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, permanecendo assim até a finalização do ensaio.</p>

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

	(sétimo) dia, seguida de redução continua até a finalização do ensaio.	Houve redução de Bolores inferior a 90% (8,3%) da contagem inicial, a partir do 7º (sétimo) dia, e após o 7º dia da reinoculação houve aumento na população seguida de redução continua até a finalização do ensaio.
--	--	--

FONTE: LAUDO DE ANÁLISE DO LABORATÓRIO L.C.Q.PQ.

De acordo com os resultados observados na tabela e com os critérios da USP XXXII, o conservante é efetivo no produto quando houver redução de bactérias viáveis, Bolores e Leveduras da contagem inicial seguida de redução continua permanecendo assim até a finalização do ensaio. Levando todos os aspectos necessários, podemos concluir que o óleo essencial de *Melaleuca* apresentou também uma eficácia em se tratando de conservante.

3.3. Resultado do teste de estabilidade e análise microbiológica

Com relação a estudos de estabilidade, as amostras submetidas em todas as condições de armazenamento (5°C, 37°C, 45°C e 50°C, solar e temperatura ambiente) se mostraram estáveis durante todo o período de avaliação (90 dias), mantendo seu aspecto inicial, ocorrendo apenas leves alterações na viscosidade e no pH em temperaturas elevadas, não comprometendo a integridade do produto. Alterações estas consideradas normais dentro dos parâmetros aceitáveis das especificações técnicas descritos no guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA.

Durante o período de avaliação da estabilidade do produto foram realizadas análises microbiológicas (em duplicata) de acordo com o método descrito, dando-se início no dia 04/08/14 e finalizando no dia 04/11/14 completando 90 dias de estabilidade. Na tabela abaixo pode-se verificar o resultado geral das análises microbiológicas:

TABELA 05: RESULTADO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Concentração 3% óleo de Melaleuca					
Ambientes	Aeróbios totais	Bolores e Leveduras	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ambiente	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Luz solar	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Geladeira	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 37°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 45°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

Estufa 50°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Concentração 5% óleo de Melaleuca					
Ambientes	Aeróbios totais	Bolores e Leveduras	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ambiente	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Luz solar	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Geladeira	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 37°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 45°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 50°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Concentração 10% óleo de Melaleuca					
Ambientes	Aeróbios totais	Bolores e Leveduras	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ambiente	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Luz solar	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Geladeira	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 37°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 45°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência
Estufa 50°C	<01 UFC	<01 UFC	Ausência	Ausência	Ausência

FONTE: O PRÓPRIO AUTOR

Um produto cosmético é considerado estável quando nenhuma das propriedades físico-química (aspecto, cor, odor) e microbiológica originais não é alterada além do especificado durante o período de prazo de validade determinado, segundo especificações descritas no Guia da ANVISA.

A partir dos testes realizados, os nossos dados confirmam com os já descritos por Hammer *et al* em 2004, confirmando o óleo essencial de Melaleuca como um produto com atividade antifúngica e bactericida. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que óleo se mostrou eficiente na resistência contra as bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), bolores (*Aspergillus brasiliensis*) e pelos principais agentes causadores da onicomicose o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* e a levedura *Candida albicans*.

As onicomicoses são enfermidades que não se curam espontaneamente, necessitando estabelecer um tratamento, apesar deste tipo de tratamento ser prolongado e muitas vezes sem sucesso. Entretanto, existem poucos trabalhos publicados que demonstram testes eficazes para tratar este tipo de infecção. Com base nessas informações iniciamos uma serie de testes com o óleo essencial de Melaleuca devido suas propriedades descritas em literatura, dentre elas a ação antifúngica.

Para estudos futuros sugerimos que sejam realizados testes *in vivo* utilizando métodos complementares disponíveis no diagnostico da onicomicose, uma vez que os tratamentos implicam alto custo e tempo.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

4. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi comprovada a efetividade da atividade fungicida das formulações contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca* sobre os micro-organismos testados, dentre eles os principais causadores de onicomicose, o *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*.

Diante das análises microbiológicas realizadas, verificou-se que o creme hidratante se encaixa perfeitamente nos parâmetros, pois apresentou ausência de qualquer crescimento microbiológico tanto de bactérias, bolores e leveduras quanto de bactérias patógenas, nas três concentrações testadas. Dentre estas, a formulação contendo 5% do óleo de *Melaleuca* foi a que apresentou um melhor desempenho, levando em consideração o custo e benefício, podendo ser indicada como a possibilidade de seu uso para o tratamento de onicomicoses.

Sendo assim, pode-se concluir que os objetivos desejados nesta pesquisa foram plenamente alcançados.

Agradecimentos

A empresa Racco Cosméticos que contribuiu para realização desta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº481, de 23 de setembro de 1999, Parâmetros para Controle Microbiológico de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001, Lista de Substâncias de Ação Conservante Permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

AZEVEDO, S.M.A. <<http://www.lemnisfarmacia.com.br/oleo-de-melaleuca-tea-tree-oil-um-poderoso-antisseptico-germicida-e-fungicida-natural/>> acesso dia 23 de agosto de 2014.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A. M.C.; REZENDE, C.M., - **Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas** - Quim. Nova, Vol. 32 nº 3, p. 588-594, 2009

CASTRO, C.; SILVA, M.L.; PINHEIRO A.L.; JACOVINE, L.A.G.; **Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.** Revista Árvore, vol. 29(2): p.214-243 março/abril, 2005.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5º edição – Brasília – 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

GUIA ABC DE MICROBIOLOGIA - Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. - ABC Associação Brasileira de Cosmetologia. 4º Edição, 2014 - Editora Pharmabooks. Catalogação (CDD 668.5 – Tecnologia de Perfumes e Cosméticos)

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V., **In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002; 50:195-199

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V., **Antifungal activity of the oil components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree)** - Journal of Applied Microbiology 2003, 95, 853–860.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V., **Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility** - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, February 2012 V.56:2 p.909-915.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - **Roteiro de aulas práticas micologia – microbiologia básica** - curso medicina. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/grad/arquivos/pdf_sys/med2009_micologia.pdf>. Acesso em 21 de setembro de 2014.

LACAZ, C.S. **Micologia Medica.** 5ª Edição. Instituto Nacional do Livro/M.E.C., Editora Sarvier, São Paulo, 1973.

LACAZ CS, MARTINS JEC, PORTO E, VACCARI E. M. H, MELO N. T., **Micologia Médica – fungos patogênicos, micologia medica e micoses.** 9º Edição. São Paulo. Editora Savier. 2002.

LIMA, IGARA O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.MARIA P.; SOUZA, E.L.; **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*** - Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(2): p.197-201, Abril/Junho 2006.

LIMA, K.M.; DELGADO, M.; REGO, R.S.M.; CASTRO, C.M.M.B.; ***Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomicose em paciente HIV positivo: Co-resistencia *IN Vitro* aos Azólicos** - Revista de Patologia Tropical Vol. 37 (1): 57-64. jan.-abr. 2008.

LITERATURA TÉCNICA BERACA, 2014 - BERA OIL MELALEUCA

MARTINS, G.G.; **Terapêutica de onicomicoses humanas: epidemiologia, manifestações clínicas e uso clínico de antifúngicos.** 2009. 89f. Monografia (Pós-Graduação em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 2009.

Atividade fungicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* aplicado em um creme hidratante para o controle dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*

MARTINS, J.E.C.; MELO, N.T.; HEINS, E. MARIA – **Atlas de micologia médica Vaccari**, Editora Manole 2005.

NOVACOSK, R.; TORRES, R.S.L.A. **Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*), CEDRO (*Juniperus virginiana*), TOMILHO (*Thymus vulgaris*) E CRAVO (*Eugenia caryophyllata*)** - Revista Analytica N°21: p. 36-39, Fevereiro/Março 2006.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N., LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** Revista Brasileira de Farmacognosia/ Brazilian Journal of Pharmacognosy 16 (1): p.77-82 Janeiro/Março, 2006.

PEREIRA, C.S.; BELO, R. S. A.; KHOURI, S.; CARDOSO, M. A. G. **Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica utilizando óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*.** Ciencia & Ética, O Paradigma do século XXI - XIII INIC, IX EPG E III INIC JR. UNIVAP, outubro/2009.

REFERÊNCIA ECOLYZER - INCQS/FIOCRUZ - **Método para Avaliação das Atividades Bacteriostática e Fungistática de Saneantes e Substâncias Preservativas.** In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: 25 de junho de 2012 - Revisão 07 - Seção 4.3. (65.3210.006)

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S.; **Óleos Essenciais, potencial anti-inflamatório** - Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento Vol.3 nº16, p.39-43, 2000.

SIMÕES, R.P.; GROppo, F.C.; SARTORATO, A.; DEL FIOl, F.S.; FILHO, T.R.M.; ROMACCIATO, J.C.; RODRIGUES, M.V.N. **Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica.** Revista Lecta, Bragança Paulista, v.20 (2), p. 143-152, julho/dezembro 2002.

SOUZA, C.M.D. **Apostila de Microbiologia II** – curso biomedicina. Universidade Católica de Goiás.

TORTORA, G. J.; FUNKE, R. B.; CASE. C. L. – **Microbiologia 8º edição**- Porto Alegre; Editora Artimed 2005.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F.; **Microbiologia 4º edição.** São Paulo. Editora Atheneu, 2004.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. **The dermatophytes. Clinical Microbiology Reviews**, v.8 (2) p. 240-259, 1995.