



EFETIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

EFFECTIVENESS OF MELALEUCA ESSENTIAL OIL ON *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Christinne da Costa Epifânio, Lilian Eiko Maekawa, Paula Sena da Mata

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito bactericida do óleo essencial de melaleuca sobre cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Sendo utilizado o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração bactericida mínima. Em uma placa de 96 poços foram feitas diluições seriadas do óleo de melaleuca nas concentrações de 22,5%, 11,25%, 5,62%, 2,8%; 1,4% e 0,7% diluídos em etanol absoluto e adicionados suspensão de 10^6 céls/ml de *E. faecalis* em cada poço preparado. Em seguida foram levadas em estufa a 37°C por 24h. Após, o conteúdo dos poços foi semeado em placas de Petri contendo BHI Ágar, e foram incubadas em estufa a 37°C por 24h. Após este período, foi verificado como resultado, que não houve crescimento bacteriano somente na concentração de 22,5%, sendo esta a concentração bactericida mínima, apresentando crescimento bacteriano nas demais concentrações testadas.

Palavras-chave: Óleo de Melaleuca; *Enterococcus faecalis*; Necrose Pulpar.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the bactericidal effect of tea tree essential oil on standard strain of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The broth microdilution method was used to determine the minimum bactericidal concentration. Serial dilutions of tea tree oil were made in a 96- well plate in concentrations of 22,5%, 11,25%, 5,62%, 2,8%; 1,4% and 0,7% diluted in absolute ethanol and a suspension of 10^6 cells/ml of *E. faecalis* added to each prepared well. Then they were taken in an oven at 37°C for 24h. Afterwards, the contents of the wells were sown in Petri dishes containing BHI Agar and were incubated at 37°C for 24h. After this period, it was verified as a result, that there was no bacterial growth only in the concentration of 22,5%, this being the minimum bactericidal concentration, showing bacterial growth in the other tested concentrations.

Keywords: Tea Tree Oil; *Enterococcus faecalis*; Dental Pulp Necrosis.

INTRODUÇÃO

Por ser um sistema aberto do corpo, a cavidade oral é exposta a um intenso contato com diversos tipos de bactérias contidas no meio externo, presentes no ar, água e alimentos, além das que compõe a microbiota residente, sendo as principais dos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* e *Propionibacterium*, situadas em diferentes estruturas da boca, como mucosa bucal, dentes, palato duro e mole, fissuras supra e subgingivais, amígdalas e língua, que por sua vez, concentram a maior quantidade e diversidade de bactérias (MACHADO *et al.*, 2018).

Essas bactérias costumam viver de forma simbiótica com o hospedeiro, sendo capaz de ser alterada e se tornar patogênica de acordo com as variações de pH, anatomia das estruturas da boca, nutrientes e água disponível, potencial de oxirredução, condições sistêmicas do hospedeiro, fluxo salivar e seus componentes antimicrobianos, podendo ser contabilizadas aproximadamente 10^8 a 10^{11} bactérias/ml de biofilme, segundo Tulio *et al.* (2018).

Esses microrganismos acessam a cavidade pulpar, se proliferando e causando infecções com conseqüente necrose pulpar decorrentes de cáries dentárias, restaurações de má qualidade, traumatismos com fraturas dentais, assim necessitando de tratamento endodôntico, onde o sucesso pretendido dependerá diretamente da eliminação ou diminuição dessas bactérias (MACHADO, 2018).

Foi constatado que em infecções secundárias endodônticas, são verificadas bactérias que não pertencem a microbiota oral, como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Stapylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, sendo levadas ao sistema de canais durante o tratamento endodôntico principalmente por quebra de cadeia asséptica por isolamento absoluto inadequado, manutenções de dentes abertos para drenagem, tecido cariado remanescente, perda de material restaurador (ALVES *et al.*, 2012), falhas durante o preparo químico-mecânico e na qualidade e limite da obturação (MURAD 2013), sendo observadas nessas infecções o predomínio de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, como a *Enterococcus faecalis* que é a bactéria mais prevalente em até 90% dos casos dessas infecções persistentes, e é encontrada nove vezes mais em sistemas de canais radiculares já tratados do que os não tratados (MACHADO, 2018).

Rocha *et al.* (2018) apontam as causas das infecções endodônticas persistentes sendo causadas por bactérias residuais das infecções primárias e secundárias, que não foram totalmente eliminadas durante o preparo químico cirúrgico realizado no tratamento endodôntico.

Murad (2013) aponta que a bactéria *Enterococcus faecalis* é a mais prevalente da microbiota endodôntica resultando em casos de insucessos de tratamentos endodônticos.

Estas por sua vez são cocos fermentativos, não esporulados, facultativamente anaeróbios, possuindo característica Gram-positiva, sendo uma bactéria comensal do trato gastrointestinal e suas células podendo medir de 0,5 a 1µm em diâmetro, se apresentando únicos, em pares ou em cadeias curtas, geralmente alongadas, com

aptidão para se adaptar às diversas condições críticas quando expostas a situações de estresse (NACIF *et al.*, 2020).

Essas bactérias do gênero *Enterococcus* são consideradas mais resistentes a ação dos agentes antimicrobianos empregados em Endodontia, por possuírem características de potencial de virulência que facilitam a entrada aos tecidos do periápice através da união das células do hospedeiro e das matrizes extracelulares por substâncias que congregam proteínas de superfície enterocócica (ESP), gelatinase, toxina citolisina, produção superóxido e cápsulas polissacarídeas. Por sua vez, essas proteínas contribuem para a formação de biofilme por *Enterococcus faecalis*, o que resulta na resistência de medicações à base de hidróxido de cálcio, que é utilizado como medicação intracanal durante o tratamento endodôntico (ALVES *et al.*, 2012).

Devido a isso, pelo potencial de resistência dos microrganismos a tratamentos convencionais, tem sido despertada a ânsia por novas alternativas de medicamentos e a busca pela validação de seu uso, tendo os efeitos terapêuticos favoráveis em pesquisas *in vitro* e *in vivo*, sendo sua maioria originada de extratos naturais, juntamente com o conhecimento popular que traz importante contribuição na disseminação do uso das plantas como tratamento de doenças.

Compostos de origem vegetal, como os óleos essenciais, são frequentemente empregados em tratamentos medicinais, entre eles o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), que é uma planta pertencente à família das mirtáceas (Myrtaceae), da ordem Myrtales, possuindo cerca de 140 gêneros e mais de 3.000 espécies, que em sua maior parte se constitui de plantas arbóreas e se distribuem em regiões subtropicais e tropicais, encontradas na Austrália e América do Sul. Seu óleo possui significativo efeito antimicrobiano (ZHANG *et al.*, 2018), anti-inflamatório (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e antiviral (GAROZZO *et al.*, 2009), utilizado por suas características aromáticas e medicinais, em formulações cosméticas e farmacêuticas (MONTEIRO *et al.*, 2013).

Na atualidade, o óleo de melaleuca é utilizado como antimicrobiano ou agente preventivo em nível farmacêutico ou cosmético, seu uso é recomendado em lesões, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas, cremes vaginais, cremes para a pele, bem como na área odontológica, em dentifrícios (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Assim, a ampla diversidade de plantas com efeitos benéficos aos tratamentos na Medicina e na Odontologia, faz com que pesquisas sejam realizadas com objetivo

de apresentar cada vez mais resultados que possam ser utilizados como coadjuvantes aos tratamentos clínicos convencionais na Odontologia.

Objetivo

Este presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca sobre *Enterococcus faecalis* e determinar a concentração bactericida mínima.

METODOLOGIA

O microrganismo utilizado foi a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), semeado em placas de Petri contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI Ágar) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) contendo 10^8 céls/ml de acordo com a escala de McFarland. Foram realizadas diluições seriadas até a suspensão 10^6 céls/ml.

A substância utilizada no experimento foi o óleo essencial de melaleuca (Figura 1) (Phytoterápica, São Paulo, SP, Brasil), conhecido como “Tea Tree” ou “árvore do chá”, cujo sua extração se dá pelo método da destilação por arraste de vapor das folhas, tendo seu efeito antimicrobiano desenvolvido diretamente pelo seu componente químico principal 4-terpineol.

Foram realizadas diluições do óleo de melaleuca em etanol absoluto, resultando em uma substância homogênea contendo 90% de óleo e 10% de etanol, com a finalidade do óleo desenvolver a capacidade de atravessar a membrana plasmática da bactéria e assim desenvolver seu efeito antimicrobiano.

Figura 1 – Óleo essencial de melaleuca utilizado na pesquisa.



Fonte: phytoterapica.com.br

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da CBM foi utilizado o método de microdiluição em caldo.

A Figura 2 ilustra a montagem da microplaca de 96 poços. A cor lilás representa o grupo experimental nas concentrações decrescentes de 22,5%, 11,25% e 5,62%. A cor amarela representa o controle da suspensão de *E. faecalis*. A cor azul representa o controle do meio esterilizado e a cor vermelha o controle do etanol.

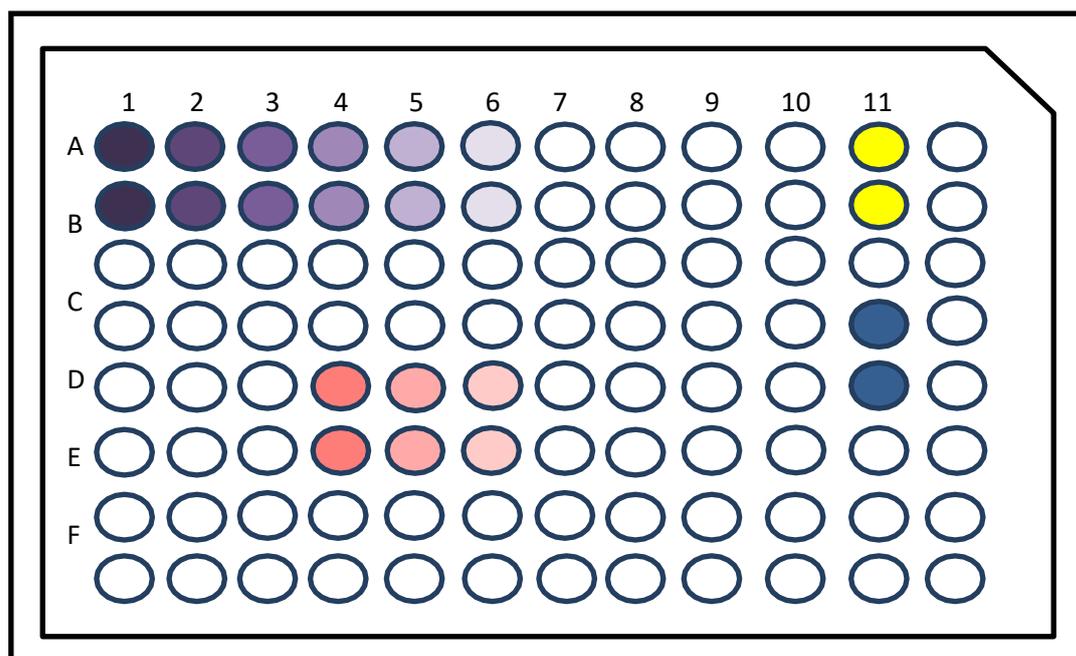
Em placas de 96 poços, na linha A (Figura 1), foram depositados 100 μ L do caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e 100 μ L do óleo essencial de melaleuca, na concentração de 90% diluído em 10% de etanol. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e transferido 100 μ L para o poço seguinte da mesma linha, repetindo-se este procedimento, para obter uma concentração decrescente do material, chegando a menor concentração de 0,7%. Os 100 μ L finais foram desprezados. A coloração da mais forte para a mais fraca ilustra a concentração decrescente dos grupos experimentais.

Em seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão padronizada (1×10^6 céls/ml) de *E. faecalis*. As concentrações finais do óleo nos poços foram de 22,5%, 11,25%, 5,62%, 2,8%; 1,4%; 0,7%. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C.

Após 24 horas, as placas de Petri pequenas (60x15mm) foram semeadas com *E. faecalis* e incubadas em estufa a 37° C por 24 horas e após este período foi verificado se houve crescimento bacteriano nas placas. A CBM foi definida como a menor concentração do óleo testada, capaz de impedir o crescimento microbiano.

O experimento foi realizado em duplicata.

Figura 2 – Montagem da placa de 96 poços para o experimento



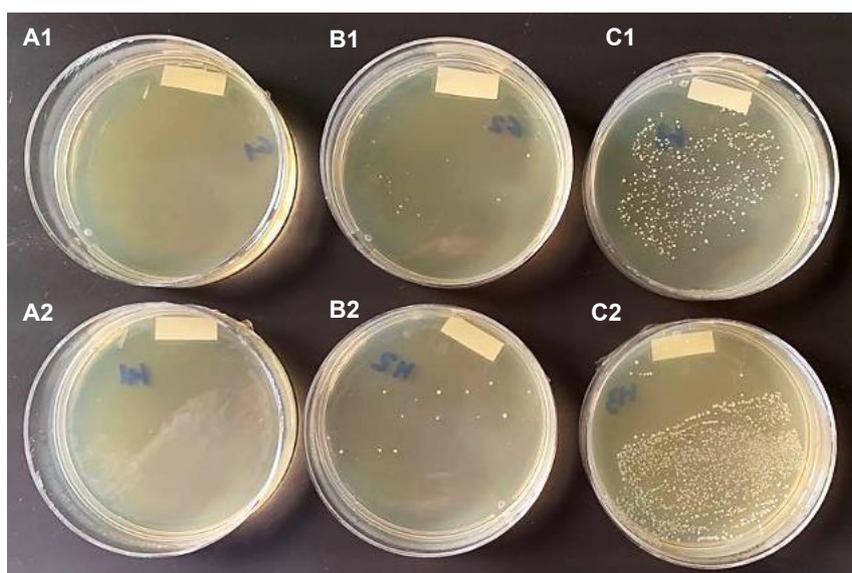
Legenda: lilás – grupo experimental (concentrações 22,5%; 11,25%; 5,62%; 2,8%; 1,4%; 07%); amarelo – controle da suspensão de *E. faecalis*, azul – controle do meio esterilizado, vermelho – controle do etanol.

RESULTADOS

A Figura 3 apresenta os resultados em duplicata de amostra da atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca sobre a cultura de *Enterococcus faecalis*. Frente aos resultados, pode-se observar que o óleo essencial de melaleuca apresentou atividade antimicrobiana somente na concentração de 22,5% (A1 e A2), ou seja, não houve crescimento bacteriano, demonstrando a presença de crescimento bacteriano nas demais concentrações testadas de 11,25% (B1 e B2); 5,62% (C1 e C2); 2,8% (D1 e D2); 1,4% (E1 e E2); 07% (F1 e F2); respectivamente, da esquerda para a direita (Figuras 3 e 4).

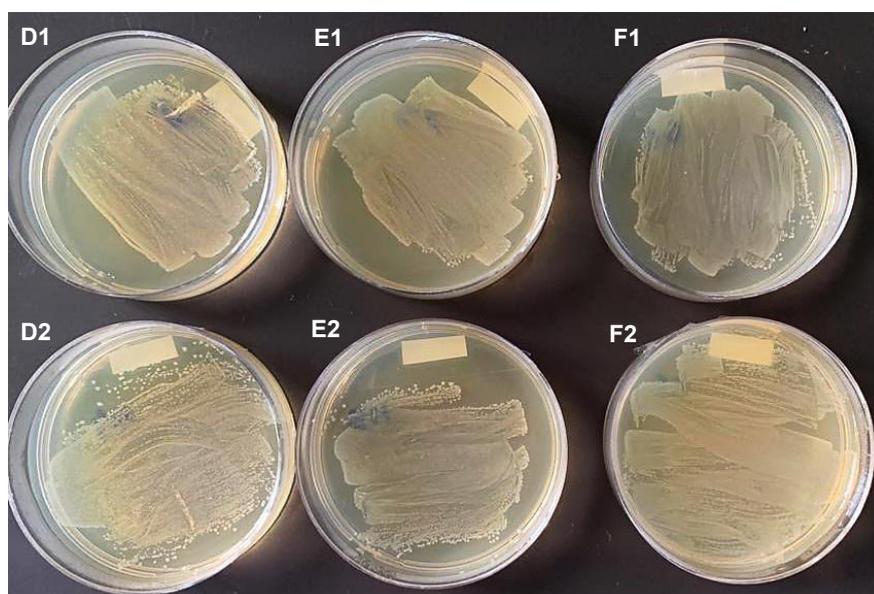
Portanto, neste estudo, a concentração bactericida mínima do óleo essencial de melaleuca foi de 22,5%.

Figura 3 - Resultado da atividade antimicrobiana nas concentrações do óleo 22,5%;11,25%; 5,62% - (respectivamente, da esquerda para direita).



Legenda: Concentrações do óleo em 22,5% (A1 e A2); 11,25% (B1 e B2); 5,62% (C1 e C2).

Figura 4 - Resultado da atividade antimicrobiana nas concentrações do óleo 2,8%;1,4%; 0,7% - (respectivamente, da esquerda para direita).



Legenda: Concentrações do óleo em 2,8% (D1 e D2); 1,4% (E1 e E2); 0,7% (F1 e F2).

DISCUSSÃO

A bactéria *E. faecalis* devido a sua estrutura, alta capacidade de resistência e sobrevivência aos tratamentos endodônticos, é alvo constante de várias pesquisas na procura por uma medicação antimicrobiana intracanal que apresente efetividade contra a mesma (NACIF *et al.*, 2010).

Segundo Oliveira *et al.* (2011) o óleo essencial de melaleuca que já é amplamente utilizado em diversas especialidades médicas por sua conhecida ação antimicrobiana, também se apresenta bastante eficaz quando utilizado na Odontologia.

Um estudo realizado por Hammer *et al.* (2008) afirmaram que células de *E. faecalis* retiradas de lesões endodônticas apresentou baixa resistência ao óleo de melaleuca. Outro estudo semelhante realizado por Papadopoulos *et al.* (2006), apontou a atividade antimicrobiana satisfatória do óleo de melaleuca sobre *Pseudomonas aeruginosa*, em concentração de 2,0%, sendo essa concentração bem abaixo da que foi utilizada neste presente estudo.

May *et al.* (2000), realizaram um estudo sobre amostras de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, que são resistentes a antibióticos como metilicina (MRSA), glicopeptídeo (GRE) e gentamicina, avaliando a ação antimicrobiana de dois tipos de óleo de melaleuca em diferentes concentrações, sendo um óleo padrão contendo um teor de 34,8% de terpinen-4-ol e 5,5% de cineol, e o outro óleo clone 88 contendo um teor de 43,1% de terpinen-4-ol e 1% de cineol, apresentando como resultado que em menos de 60 minutos o óleo teve a capacidade de inativar todas as bactérias testadas, salvo o *Staphylococcus aureus*, com destaque para o óleo clone que apresentou melhor atividade antimicrobiana comparado ao óleo padrão, sendo considerada essa atribuição devido ao maior teor do componente terpinen-4-ol.

Bem como, Oliveira *et al.* (2011) testaram a eficiência do óleo de melaleuca sobre outros microrganismos como *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e reconheceram

a atividade antimicrobiana satisfatória do óleo de melaleuca na concentração mínima inibitória e concentração bactericida mínima de 0,25% e 0,5% respectivamente.

O óleo essencial de melaleuca comprova boa capacidade antimicrobiana, agindo sobre a bactéria de forma a romper a integridade da membrana celular, causando o extravasamento do material intracelular, levando ao bloqueio da sua respiração. Essa capacidade de rompimento da membrana celular é devido ao componente terpinen-4-ol que está presente de 30 a 40% na composição do óleo, sendo o principal componente responsável pela atividade antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas para avaliar a ação antimicrobiana de outras substâncias, como o hidróxido de cálcio, sobre *E. faecalis*, demonstram resultados insatisfatórios pois o microrganismo presente no canal se mostrou mais resistente ao medicamento, tendo a necessidade da substância possuir um contato direto e se difundir no interior dos túbulos dentinários para desempenhar sua atividade microbiana. Essa resistência é associada a bomba de prótons dessa bactéria que a permite sustentar níveis apropriados de pH intracitoplasmático (NACIF *et al.*, 2010).

Segundo Nacif *et al.* (2010) foram realizadas pesquisas avaliando a ação antimicrobiana da clorexidina gel a 2% como solução irrigadora em dentes infectados e extraídos, após obturação endodôntica, sobre o *E. faecalis*, e mostram que na totalidade dos grupos experimentais houve resíduos de células da bactéria *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários mesmo depois de 60 dias da obturação dos canais, dessa forma é possível concluir que essa substância não se mostra eficaz na eliminação dessa bactéria.

O óleo de melaleuca dispõe por volta de 100 componentes, sendo seus principais o terpinen-4-ol, gama-terpieno, α -terpieno, 1,8-cineol e α -pineno, devendo ter em sua composição uma quantidade mínima de 30% de Terpinen-4-ol e no máximo 15% de cineol para desenvolver uma atividade antisséptica, segundo o comitê australiano. O componente 1,8-cienol é um irritante da pele e é considerado o responsável do efeito antimicrobiano marginal, pois ele aumenta a permeabilidade da membrana e favorece a entrada dos outros agentes antimicrobianos. Devido ao grande número de componentes do óleo de melaleuca, é possível que todo o seu potencial efeito antimicrobiano não tenha sido estudado, podendo ser atribuído a sua

atividade antimicrobiana também a outros componentes dos que já foram encontrados (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Diante da limitação deste estudo e dos resultados obtidos foi possível verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca, sendo assim, motivo de mais estudos *in vitro* e *in vivo* que possam estabelecer e definir protocolos clínicos em relação a concentração ideal e segura na sua utilização na clínica odontológica.

CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos neste presente estudo, pode-se concluir que o óleo essencial de melaleuca na concentração 22,5% apresentaram efeito bactericida sobre a bactéria *Enterococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Regis A. A.; SAMPAIO, Felipe C.; GUEDES, Orlando A.; ALENCAR, Ana H. G.; ESTRELA, Cyntia R. A.; ESTRELA, Carlos. Suscetibilidade do *E. faecalis* e *S.aureus* a vários antimicrobianos. **Revista Odontológica do Brasil-Central**, Goiânia, v. 21, n. 56, p. 426-429, 2012.
- MACHADO, Alessandra Barbosa Ferreira; APOLÔNIO, Ana Carolina Morais. **Microbiologia Bucal e Aplicada**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 12.
- MACHADO, Felipe Paiva. **Infecções endodônticas primária x secundária: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico, sinais e sintomas**.2018.Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, São José dos Campos, 2018.
- MAY, J.; CHAN, C. H.; KING, A.; WILLIAMS, L.; FRENCH, G. L. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.45, p.639-43, Maio 2000.
- MONTEIRO, Maria Helena D. A.; MACEDO, Heloísa W. de; JUNIOR, Arley da Silva. PAUMGARTTEN, Francisco J. R. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de Melaleuca L. (MyrtaceaeJuss.). **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, v. 8, n.1, p. 1-72, Jan-Mar 2013.
- MURAD, Cristiana Francescutti. Análise da diversidade microbiana em infecções endodônticas

persistentes. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UERJ**. Rio de Janeiro, s.n; 2013.

NACIF, Marcia Christina André Moreira; ALVES, Flávio Rodrigues Ferreira. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Revista Brasileira de Odontologia**. Rio de Janeiro, v. 67, n. 2, p.209-14, julho/dezembro, 2010.

OLIVEIRA, A. C. M; FONTANA, A.; NEGRINI, T.C.; NOGUEIRA, M.N.M.; BEDRAN, T.B.L.; ANDRADE, C.R.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P; Emprego do óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.4, p. 492-499, 2011.

ROCHA, Thais Aparecida de França; CERQUEIRA, Joana Dourado Martins; CARVALHO, Érica dos Santos. Infecções endodônticas persistentes: causas, diagnóstico e tratamento. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 78-83, Jan./Abr. 2018.

TULIO, Karoline de S. C.; STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, Roberta T.; DIRSCHNABEL, Acir J.; SCHUSSEL, Juliana L.; WASILEWSKI, José Henrique S.;

KRELLING, Andrea; BELTRAME, Olair C.; MARTINS, Carla R. W.; SASSI, Laurindo Moacir. Alterações no perfil da microbiota bucal durante permanência na UTI: colonização por patógenos respiratórios potenciais. **Revista Archives of Health Investigation**, Curitiba, Paraná, v.7, n.9, p. 351-357, Jun 2018.

ZHANG, Xiaofeng; GUO, Yanjun; GUO, Liying; JIANG, Hui; JI, Qianhua. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Melaleuca alternifolia Essential Oil. **BioMed Research International**, China, v. 2018, p. 8, Maio 2018.

GAROZZO, A; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FUENERI, P.M.; BISIGNANO, G.;

CASTRO, A. *In vitro* antiviral activity of Melaleuca alternifolia essential oil. **Letters in Applied Microbiology**, Catania, Itália, v. 49, p. 806 – 808, Maio 2009.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. Frequencies of resistance to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and rifampicin in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Enterococcus faecalis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p.170-3, Agosto 2008.

PAPADOPOULOS, Chelsea J.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V.; HAMMER, Katherine A. Susceptibility of Pseudomonas to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and components. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.449-51, Agosto 2006