

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

AMANDA FONTANA

**Eficácia do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre bactérias  
cariogênicas e sua citotoxicidade sobre cultura de queratinócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise M. P. Spolidorio

Araraquara  
2011

AMANDA FONTANA

**Eficácia do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre bactérias  
cariogênicas e sua citotoxicidade sobre cultura de queratinócitos**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Mayer

Araraquara, 13 de outubro de 2011.

## **DADOS CURRICULARES**

AMANDA FONTANA

<b>Nascimento</b>	06/12/1983, São Paulo, SP
<b>Filiação</b>	Márcia Baldrighi Adão Mangolin Fontana
<b>1999-2002</b>	Técnico em prótese dentária pela EMEFM Derville Allergretti
<b>2005-2008</b>	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP
<b>2009</b>	Estágio de Atualização em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP
<b>2009-2011</b>	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontopediatria, nível Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP



# Dedicat6ria

## DEDICATÓRIA

A Deus

Pela fé, esperança e força concedida em todos os momentos. Agradeço sempre e em todo lugar por tudo;

Aos meus pais, Adão e Márcia

As palavras são poucas para expressar tamanho amor e admiração que tenho por vocês. Obrigada pelo apoio incondicional, amizade, carinho e paciência. Vocês são minha base e exemplo de vida;

À minha irmã, Luana

Minha melhor amiga que como tal me proporciona momentos de grande alegria e cumplicidade. Agradeço pelo seu companheirismo, apoio e inúmeros conselhos;

Ao Samuel (Samuhka)

Por todo amor, carinho e paciência. Obrigada pela motivação e a paz de tuas palavras. Você torna minha caminhada muito mais feliz.

**Amo muito vocês!**

# Agradecimientos



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio pela orientação, amizade e atenção em todos os momentos. Obrigada pela motivação, na confiança recebida e na liberdade e apoio nas decisões tomadas. Agradeço diariamente pela Mestre paciente que proporcionou anos de trabalho prazerosos e de ótima convivência.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, representados pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon;

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representada pela Chefe de Departamento Profa. Dra Lídia Parsekian Martins e pelo Vice-Chefe Prof. Dr. Fábio Cesar Braga de Abreu e Lima;

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr /UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fabio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri

Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto (Tuka) e Rita de Cássia Loiola Cordeiro pela convivência e os ensinamentos adquiridos;

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Profa. Dra. Josimeri Hebling e Prof. Dr. Edson Alves de Campos;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa por nos disponibilizar o uso do Laboratório de Patologia Experimental em várias etapas deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade pela iniciativa deste trabalho seguida de sua colaboração;

À Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro (Tia Elisa) e Profa. Dra. Josimeri Hebling (Tia Jô) pela atenção, paciência e amizade. Agradeço os ensinamentos na área de Odontopediatria e Pacientes Especiais e conselhos e atenção dadas a este trabalho. Obrigada pela ótima convivência em meio a “pontos negativos” e “pesadelos” sempre com muita alegria, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Paulo Jorge Marques Cordeiro do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, por realizar a análise de cromatografia gasosa.

À Profa. Dra. Marcia Graeff da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, pela análise de microscopia confocal de varredura a laser.



Ao Dr. Manuel Marcos Cunha Quattrer e a Acecil Central de Esterilização Ltda, por nos disponibilizar a esterelização por meio de óxido de etileno.

Aos professores e alunos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese pela atenção e disponibilidade de uso de equipamentos e materiais que sempre nos foi concedida;

A Profa. Dra. Regina Maria Sposto por ter me iniciado no mundo científico e ser sempre tão atenciosa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (2009/11939-0) e auxílio pesquisa (2009/54190-0) para realização deste trabalho;

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos;

Aos funcionários da Biblioteca Marley, Ceres, Odete, Silvia, Adriano, Eliane, Dileide, Maria e Inês por estarem sempre dispostos a nos ajudar;

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Thania, Odete, Soninha, Totó, Pedrinho e Diego, por nos auxiliarem sempre e em especial à Dulce pelas conversas e risadas;

A secretária do Departamento de Fisiologia e Patologia, Silvana por nos atender sempre com muita eficiência, paciência e carinho;

Aos funcionários Aurelúcia, Marquinhos e Paulo da seção de esterilização, pela alegria, atenção e disposição que sempre nos atenderam;

Aos funcionários da portaria e seguranças D. Nôemia, Sr. Nunes, Jea, Nilton, Eliseo, Anderson, Prado, Rodrigo, Michael e André por fazerem das minhas inúmeras entradas e saídas, inclusive aos de finais de semana e feriado, sempre “Bem-Vindas”;

As funcionárias Claudinha e Lena pelas conversas diárias fazendo minhas manhãs mais alegres;

Aos amigos e funcionários José Antônio (Zé), Juliana e as técnicas Aline, Carina, Natalia e Sabrina pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho sempre com muita alegria, paciência e disposição;

Aos amigos da Pós-Graduação em Odontopediatria Ana Paula Turrioni, Beatriz Ferraz, Camila Fragelli, Luciana Bianchi, Margareth da Mata, Natalia Apolináio de Lima, Thalita Boldieri, Débora Scheffel, Fabiano Jeremias, Juliana Feltrim, Leticia Vargas, Marco Aurélio Paschoal, Márcia Tanaka, Marília Correia, Ana Luisa Oliveira, Camila Fávero, Elcilaine Azevedo, Hérica Ricci, Manuel Restrepo, Cristiane Silva, Marcela Tagliani, Cármen Coldebella, Nancy Sacono e Simone Mastrantonio, pela troca de aprendizado e ótimo convívio social;

Às queridas amigas de turma de Mestrado “As Uvinhas”, Margareth, Beatriz, Natália, Ana Paula, Camila, Thalita e Luciana pelos momentos de trocas de experiências, apoio e amizade;

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental pelos momentos de alegria e aprendizado, Ana Paula Ribeiro, Nancy Sacono, Diana Soares, Fernanda Vargas, Camila Fávero, Fernanda Basso, Ana Paula Turrioni, Luciana Bianchi, Carolina Pratti, Carolina Chaves e Pedro Paulo Chaves de Souza;

À Família Laboratório de Microbiologia, Nicole Nogueira, Marília Correia, Felipe Toledo e Telma Bedran pelo ótimo convívio diário. *“Um brinde ao Laboratório de Microbiologia”... sempre!;*

Às alunas de iniciação científica, Ester Bordini e Renata Francisconi por serem ótimas alunas facilitando o trabalho de ensino científico além da ótima convivência. Em especial, a Renata, por me ajudar diretamente com esta pesquisa;

Aos amigos de Pós-Graduação que ajudaram diretamente para a realização deste trabalho: Marília (este trabalho também é seu, minha “esteticista” favorita!), Nicole e Fernanda Basso (professoras de cultura de células), Ana Carolina Mascarenhas (companheira dos primeiros dias de laboratório), Norberto B. de Faria (sanou muitas dúvidas do MCVL); Nancy (pela ajuda, ensinamentos e companhia de finais de semana e feriados), e minha grande amiga Karen Altieri (que incansavelmente me ajudou durante a parte microbiológica);

Aos meus sogros Ivan e Lara, que foram muito mais que revisores de inglês e português desta dissertação. São a minha família, que como tal supriram todo carinho e apoio enquanto a família de sangue estava longe;

À minha querida “Bolha”, Luana, Aline, Simoni e Pâmella pela amizade e apoio não importando a distância e ao Joel, meu cunhado, pelo incentivo;

Aos meus anjos, Vó Neusa, Vó Tetê e Vô Nelson por cada oração e carinho;

E à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

PREFÁCIO .....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT .....	21
INTRODUÇÃO.....	24
PROPOSIÇÃO .....	29
CAPÍTULO 1 .....	31
CAPÍTULO 2 .....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
REFERÊNCIAS .....	83
APÊNDICES .....	92

# Prefácio



## **PREFÁCIO**

Esta dissertação será apresentada na forma de dois artigos intitulados:

**Artigo 1 - “Eficácia do óleo de *Melaleuca alternifolia* sob bactérias cariogênicas”** - Será submetido para publicação no *Archives of Oral Biology*.

**Artigo 2 - “Efeito citotóxico do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre cultura de queratinócitos”** - Será submetido para publicação no *Toxicology in Vitro*.



Resumo



Fontana A. Eficácia do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre bactérias cariogênicas e sua citotoxicidade sobre cultura de queratinócitos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo geral deste trabalho, dividido em dois estudos, foi avaliar in vitro o efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) sobre as bactérias *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) e *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) e seu possível efeito citotóxico sobre cultura de queratinócitos (HaCat). **Materiais e Métodos:** No estudo 1, a análise antimicrobiana foi avaliada em 3 fases: 1. Identificação da CIM e CBM do TTO nas concentrações de 0.25% a 2% sobre os microrganismos na forma planctônica, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo; 2. Análise do metabolismo celular dos microrganismos em SSB (biofilme monoespécie) e DSB (biofilme multiespécie), formados em placa de cultura celular, tratados com diferentes concentrações de TTO, por meio de ensaio de XTT; 3. Análise do metabolismo celular dos microrganismos em DSB formado sobre blocos de esmalte e dentina e submetidos às seguintes soluções: TTO 2%, clorexidina 0.12% (controle positivo) ou PBS (controle negativo) pelo tempo de 60 s, por meio de ensaio de XTT e análise das imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). No estudo 2, a análise citotóxica de diferentes concentrações de TTO foi realizada sobre células HaCat usando diferentes tempos de contato (60 s, 2 h e 60 s, com recuperação de 24 h), por meio do ensaio de MTT para avaliação da atividade metabólica. Os dados obtidos apresentaram distribuição não normal e, portanto,

foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância de 5%.

**Resultados:** Na análise antimicrobiana, para ambos, *S.mutans* e *L.acidophilus*, os valores de CIM e CBM foram 0.5% e 1 %, respectivamente. Os valores de densidade óptica (DO) referentes ao metabolismo bacteriano, obtidos pelo ensaio de XTT, apresentaram diferença estatisticamente significativa para *S. mutans* SSB, em concentrações de TTO de 0.25 a 2%, e para *L. acidophilus* SSB, na concentração de 2% ( $p < 0.05$ ). Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa para DSB ( $p > 0.05$ ). Quando DSB sob blocos de esmalte e dentina foram expostos a diferentes soluções, os valores de DO apresentaram diferença estatisticamente significativa para o TTO 2% ( $p < 0.05$ ), porém com menor efeito de diminuição de metabolismo que a CHX 0.12% ( $p < 0.05$ ). As imagens obtidas por meio da MCVL concordam com os dados do ensaio de XTT, indicando que o TTO aumentou o número de bactérias mortas sobre a superfície dos blocos. Na análise da citotoxicidade, os valores de DO referente ao metabolismo celular, obtidos pelo teste de MTT, apresentaram diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos controle negativo e todas as concentrações de TTO para exposição de 2 h e a partir da concentração de TTO 0.5% para as exposições de 60 s e 60 s com recuperação de 24 h. Ambos, controle positivo e CHX 0.12%, não apresentaram diferença estatística ( $p > 0.05$ ).

**Conclusão:** Apesar de apresentar baixo efeito antimicrobiano comparado a CHX 0.12%, o TTO mostrou ser capaz de reduzir o metabolismo de bactérias cariogênicas e não apresentar toxicidade em baixas concentrações e em curto tempo de exposição.

**Palavras-chave:** Óleo de *Melaleuca*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, queratinócitos.

Abstract



Fontana A. Efficacy of *Melaleuca alternifolia* oil against cariogenic bacteria and cytotoxicity on keratinocytes culture [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## **ABSTRACT**

**Objective:** The aim of this research, divided in two studies was to evaluate in vitro the effect of oil of *Melaleuca alternifolia* (TTO) against bacteria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) and its cytotoxic effect on keratinocyte cells (HaCat). **Materials and Methods:** In study 1, the antibacterial analysis was evaluated in 3 phases: 1. Identification of MIC and MBC of TTO (0.25% to 2%) on the microorganisms in the planktonic form using the broth microdilution technique; 2. Analysis of cellular metabolism of microorganisms in SSB (monospecies biofilm) and DSB (multispecies biofilm) formed in cell culture plate and treated with different concentrations of TTO, using XTT assay; 3. Analysis of cellular metabolism of microorganisms in DSB formed on blocks of enamel and dentin and submitted to the following solutions: 2% TTO, 0.12% chlorhexidine (positive control) or PBS (negative control) for 60 s, using XTT assay. Images obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM) were analyzed, too.. In study 2, the cytotoxic analysis of different concentrations of TTO was performed on HaCat cells at different contact times (60 s, 2 h, 60 s, with recovery of 24 h) was using the MTT assay to evaluate metabolic activity. The data showed non-normal distribution and therefore were used the nonparametric tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. All statistical tests were considered at a significance level of 5%.

**Results:** In the antibacterial analysis, for both *S. mutans* and *L. acidophilus*, the values of MIC and MBC were 0.5% and 1% respectively. The values of optical density (OD) for the bacterial metabolism, obtained by the XTT assay showed statistically significant for *S. mutans* SSB, at concentrations of TTO 0.25 to 2%, and for *L. acidophilus* SSB, at concentration of TTO 2% ( $p < 0.05$ ). However, there was no statistically significant difference in DSB ( $p > 0.05$ ). When DSB on blocks of enamel and dentin were exposed to different solutions, the OD values showed statistically significant difference for the TTO 2% ( $p < 0.05$ ), but with less reduction of the metabolism than with CHX 0.12% ( $p < 0.05$ ). The images obtained by CLSM agree with the data from the XTT assay, indicating that the TTO has increased the number of dead bacteria on the surface of the blocks. In the analysis, of cytotoxicity OD values or the cell metabolism, obtained by MTT test, showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the control and all concentrations of TTO for exposure of 2 h and for the concentrations between of 0.5% and 2% for TTO exposures of 60 s and 60 s to recovering 24 h. Both positive control and 0.12% CHX showed no statistical difference ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** Although TTO results were not so good as the results with 0.12% CHX, TTO reduced the metabolism of cariogenic bacteria and presented low toxicity at low concentrations and in short exposition times.

**Keywords:** Tea tree oil, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, keratinocytes.

# Introdução

## Geral





## INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dental continua sendo considerada uma das doenças bucais mais prevalentes, apesar dos métodos de prevenção utilizados<sup>7, 17</sup>. É causada pela interação de multifatores, sendo os microrganismos presentes no biofilme o fator de maior importância para o início e progressão da doença<sup>19, 42</sup>.

O biofilme é uma estrutura complexa e dinâmica que se desenvolve pela colonização sequencial e ordenada da superfície dentária por várias bactérias orais, organizando-se funcionalmente no interior de uma matriz extracelular de polissacarídeos<sup>32, 40</sup>. O desenvolvimento do biofilme ocorre inicialmente pela adesão das células bacterianas planctônicas (colonizadores primários) à película adquirida sobre a superfície dental e posterior co-agregação de outros microrganismos (colonizadores secundários), havendo comunicação metabólica e troca genética inter e intra-espécies<sup>29, 30, 40</sup>. Uma importante consequência clínica dessa organização é que os microrganismos em biofilme tornam-se menos suscetíveis aos antimicrobianos do que quando em forma planctônica<sup>36, 41, 51, 53</sup>.

O frequente consumo de carboidratos fermentáveis pode levar a constantes quedas de pH no biofilme, gerando aumento nas proporções de espécies acidúricas e acidogênicas como os estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Os estreptococos do grupo mutans (particularmente *Streptococcus mutans*) e os *Lactobacillus* spp. são bactérias gram-positivas com alto potencial cariogênico. Com o desequilíbrio ecológico do biofilme, há o aumento na proporção dessas espécies, levando a uma produção cada vez maior de ácido, o que promove a

desmineralização dos tecidos duros dentários tornando-os mais susceptíveis ao aparecimento de lesões de cárie<sup>19, 42</sup>.

O controle do biofilme bacteriano é essencial para a manutenção da saúde bucal por meio de procedimentos mecânicos de remoção do biofilme cariogênico, da adequação da dieta e o do uso de produtos com flúor<sup>57</sup>. Considerando a importância do controle do biofilme e as dificuldades dos indivíduos para realizar adequada higiene bucal<sup>54</sup>, é válido e necessário associar, aos procedimentos tradicionais, métodos químicos como coadjuvantes para o controle do biofilme<sup>10, 18</sup>.

Dentre os agentes antimicrobianos, a clorexidina é aceita como o padrão-ouro para a prevenção ou tratamento de doenças bucais. Geralmente é mais eficaz contra microrganismos gram-positivos, incluindo os estreptococos do grupo mutans, que são particularmente sensíveis à clorexidina. Porém, a frequente utilização dessa substância não é aconselhável devido aos efeitos colaterais locais, como a pigmentação de dentes, restaurações e próteses, ulceração da mucosa oral, alteração e percepção gustativa<sup>48, 60</sup>.

Novos agentes antimicrobianos orais têm estimulado a pesquisa com produtos de origem natural. Uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos<sup>45</sup>. Diversos estudos apresentam efeito antimicrobiano in vitro desses produtos sobre os patógenos orais, mostrando que esses agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas<sup>1, 11, 16, 35</sup>.

Um fitoterápico que vem se destacando é o óleo da árvore-do-chá (tea tree oil - TTO). Trata-se de um óleo essencial, obtido por destilação a vapor das folhas da *Melaleuca alternifolia* de origem australiana<sup>8</sup>. O uso terapêutico do TTO já era tradicional entre os aborígenes australianos<sup>8</sup> e sua ação anti-séptica começou a ser descrita na literatura em 1962<sup>49</sup>. É incorporado como principal agente antimicrobiano ou preventivo em escala farmacêutica ou cosmética, como no uso em feridas, queimaduras, picadas de inseto, gel para acne, cremes vaginais e para a pele<sup>14</sup>.

O TTO é composto por aproximadamente 100 componentes, uma mistura de terpenos hidrocarbonetos em associação com álcool<sup>5</sup>, sendo os principais o terpinen-4-ol, gama-terpiene, alfa-terpiene, 1,8 cineole e alfa-pinene<sup>14</sup>. A atividade antimicrobiana do TTO é atribuída principalmente ao terpinen-4-ol, componente principal do óleo, presente entre 30% a 40% em sua composição<sup>8</sup>. Dados recentes mostram que a atividade do TTO é de amplo espectro, sendo antibacteriano<sup>33, 59, 61</sup>, antifúngico<sup>11, 47, 58</sup>, antiviral<sup>2, 22</sup>, antiinflamatório<sup>4, 27</sup> e anticancerígeno<sup>3, 23</sup>. Devido a sua característica lipofílica, o TTO possui um mecanismo de ação bactericida que consiste em sua capacidade de se difundir e danificar as estruturas da membrana celular, causando a perda de material intracelular e a incapacidade de manter a homeostase<sup>15, 52</sup>.

Por apresentar ação antimicrobiana, estudos sugerem que o TTO possa ser utilizado como agente de prevenção ou tratamento contra patógenos orais. Os dados mostram que grande parte das bactérias são suscetíveis em concentrações de TTO a 2% (v/v) ou menos, e fungos apresentam concentrações inibitórias entre

0.03 e 0,5% e fungicida entre 0.12-1%<sup>8, 26</sup>. A eficácia do óleo de *Melaleuca* na inibição do crescimento ou desenvolvimento de bactérias que fazem parte do biofilme cariogênico vem sendo estudada e apresenta atividade antimicrobiana<sup>20, 24, 26, 56</sup>.

Apesar dos diversos estudos caracterizando o amplo espectro de ação do óleo de *Melaleuca*, há poucas evidências que possam indicar que o TTO ou seus componentes apresentem potencial tóxico significativo. Conclusões sobre a toxicidade do TTO são complicadas pelo fato de que os componentes do óleo possuem diferentes características físico-químicas<sup>6, 13</sup>. Os dados indicam que a toxicidade do TTO é dose-dependente, tornando-se tóxico quando ingerido em doses elevadas<sup>26</sup>, causando reações alérgicas somente em indivíduos predispostos<sup>62</sup>. A literatura disponível sugere que o TTO pode ser usado topicamente na forma diluída pela maioria dos indivíduos, sem efeitos adversos<sup>9, 21, 26</sup>.

Com base na literatura apresentada, sugere-se que o TTO seja um fitoterápico de grande ação antimicrobiana. Todavia, os dados científicos que avaliam sua eficácia sobre microrganismos cariogênicos são escassos, principalmente na forma de biofilme, seja mono ou multi-espécies, onde a ação antibacteriana torna-se limitada. Para que o óleo de *Melaleuca* possa ser uma alternativa para o controle do biofilme cariogênico é necessário determinar a sua eficácia sobre o mesmo, assim como seu possível efeito citotóxico podendo, desta forma, gerar dados de interesse que possibilitem a aplicação clínica da substância estudada.



Proposição

## **PROPOSIÇÃO GERAL**

A proposição geral deste estudo foi avaliar a eficácia do óleo de *Melaleuca* sobre bactérias cariogênicas e sua citotoxicidade.

## **PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA**

1. Avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes concentrações do óleo de *Melaleuca* sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* na forma planctônica e em biofilme (SSB e DSB).
2. Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações do óleo de *Melaleuca* em diferentes tempos de contato sobre cultura de queratinócitos.

# Capítulo 1



**Eficácia do óleo de *Melaleuca alternifolia* sob  
bactérias cariogênicas**

Amanda FONTANA <sup>a</sup>, Marília Ferreira CORREIA <sup>a</sup>, Cleverton Roberto DE  
ANDRADE <sup>b</sup> and Denise Madalena Palomari SPOLIDORIO <sup>b, \*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.*

<sup>b</sup> *Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.*

**\* Autor para Correspondência**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Depart. de Fisiologia e Patologia / Lab. de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14.801-903, Araraquara, SP - Brasil

Fone: + 55 (16) 3301-6472 / FAX: + 55 (16) 3301-6488

e-mail: dmeps@foar.unesp.br

**Título abreviado:** TTO e bactérias cariogênicas



## Resumo

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do óleo de *Melaleuca* (TTO) sobre bactérias cariogênicas, o *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*.

**Métodos:** O efeito antimicrobiano do TTO (2% - 0,25%) sobre o *S. mutans* e *L. acidophilus* sob a forma planctônica foi testado pelo método de microdiluição em caldo (CIM e CBM) e a viabilidade celular dos microorganismos em biofilme monoespécie (SSB) e multiespécies (DSB) por meio de ensaio de XTT. DSB foi formado sob blocos de esmalte e dentina e submetidos em soluções de TTO 2%, clorexidina 0,12% (CHX) ou PBS durante um período de 60 s. A viabilidade celular do biofilme resultante foi analisado por ensaio XTT e por MCVL.

**Resultados:** O MIC foi de 0,5% e MBC foi de 1% para ambas as espécies. Os valores de densidade óptica, obtidos por ensaio de XTT, apresentou diferença estatisticamente significante para *S. mutans* SSB a partir de TTO 0,25% e para *L. acidophilus* SSB, para TTO 2% ( $p < 0,05$ ), porém não houve diferença estatisticamente significante para DSB ( $p > 0,05$ ). Os valores de TTO 2% mostrou maior redução no número de microorganismos viáveis para todos os biofilmes. Quando DSB foi exposto às diferentes soluções, apresentou diferença estatisticamente significante para TTO 2% ( $p < 0,05$ ) no entanto, foi menos eficaz que a CHX 0,12% ( $p < 0,05$ ). As imagens obtidas por MCVL confirmam os resultados do ensaio XTT, mostrando que TTO aumentou a quantidade de bactérias mortas nos blocos.

**Conclusões:** TTO mostrou efeito sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* em planctônicos

**Palavras-chave:** Óleo de *Melaleuca*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*.

## Introdução

A cárie dental continua sendo considerada uma das doenças bucais mais prevalentes, apesar dos métodos de prevenção utilizados<sup>7, 17</sup>. É causada pela interação de multifatores, sendo os microrganismos presentes no biofilme o fator de maior importância para o início e progressão da doença<sup>19, 38</sup>. Com o desequilíbrio ecológico do biofilme, há o aumento na proporção de espécies acidúricas e acidogênicas como os estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, o que promove a desmineralização dos tecidos duros dentários tornando-os mais susceptíveis ao aparecimento de lesões de cárie<sup>19, 38</sup>.

A clorexidina (CHX) é aceita como o padrão-ouro para a prevenção ou tratamento de doenças bucais. Porém, a frequente utilização dessa substância não é aconselhável devido aos efeitos colaterais locais, como a pigmentação de dentes, restaurações e próteses, ulceração da mucosa oral, alteração e percepção gustativa<sup>48, 60</sup>.

Novos agentes antimicrobianos orais têm estimulado a pesquisa com produtos de origem natural. Um fitoterápico que vem se destacando é o óleo da árvore-do-chá (tea tree oil - TTO). Trata-se de um óleo essencial, obtido por destilação a vapor das folhas da *Melaleuca alternifolia* de origem australiana<sup>8</sup>. Dados recentes mostram que a atividade do TTO é de amplo espectro, sendo antibacteriano<sup>33, 59, 61</sup>, antifúngico<sup>11, 47, 58</sup>, antiviral<sup>2, 22</sup>, antiinflamatório<sup>4, 27</sup> e anticancerígeno<sup>3, 23</sup>.

Por apresentar ação antimicrobiana, estudos sugerem que o TTO possa ser utilizado como agente de prevenção ou tratamento contra patógenos orais<sup>20, 24, 26, 56</sup>. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia antimicrobiana do TTO contra bactérias cariogênicas na forma planctônicas e biofilme.

## **Materiais e métodos**

### *Isolados bacterianos e condições da cultura*

Cepas de referência de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (ATCC 25175) e *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) (ATCC 4356) foram usadas neste estudo. Previamente aos experimentos, as espécies bacterianas foram inoculadas em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia, MI, EUA) individualmente e foram incubados microaerobicamente em sistema de jarra de microaerofilia por 18 h a 37 °C. Posteriormente, os microrganismos foram coletados por centrifugação e lavados com salina de tampão fosfatado (PBS). O material resultante teve sua turbidez ajustada com o auxílio do espectrofotômetro até atingir absorvância igual a 0.15 em 600 nm que corresponde uma suspensão para solução estoque de  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

### *Preparação da solução de TTO*

TTO (Sigma, MO, USA) teve sua composição analisada por cromatografia gasosa, para controle da qualidade do óleo e obteve as concentrações dentro do limite determinado pela ISO 4730 (Apêndices 1 e 2). Previamente a utilização do

óleo nos experimentos, foi realizada a diluição do TTO nas concentrações finais a serem avaliadas, (2%, 1%, 0.5% e 0.25% v/v), em BHI. Tween 20 (Synth, Brazil) foi adicionado na concentração final de 0.1% a fim de aumentar a solubilidade do óleo.

*Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

Nove amostras (n=9) de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a determinação da CIM por meio do método de diluição em caldo. Cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços recebeu 200 µL das diluições de TTO. Após a reativação das espécies, como descrita anteriormente, uma suspensão de 2 µL de *S. mutans* e *L. acidophilus* foi adicionada separadamente em cada orifício obtendo uma concentração final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. O estudo também obteve o controle positivo de crescimento por meio de poços com microrganismo e sem a solução de TTO e controle negativo de crescimento por meio de poços sem adição microrganismo. Para avaliar possíveis interferências do solvente, poços somente com Tween 20 e BHI com adição de microrganismos foram adicionados ao experimento. Poços com CHX 0.12% foram adicionados como controle positivo de tratamento. As placas foram incubadas microaerobicamente (37 °C, sob agitação de 75 rpm) por 24 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicate e em três momentos diferentes.

Dos orifícios que não mostrarem crescimento visível, ou seja,  $DO_{600nm} \leq 0.05$ , foram retirados 10 µL, os quais foram plaqueados em meio de cultura específico para cada espécie: MRS (Agar Mann, Rogosa & Sharpe, Acumedia,

MI, EUA) para o crescimento de *L. acidophilus* e SB<sub>20</sub> (Agar Sacarose Bacitracina) para crescimento de *S. mutans* sendo as placas mantidas a 37°C por 48 horas. em jarra de microaerofilia. A CIM foi definida como a menor concentração de TTO sem crescimento visível., e a CBM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a  $\geq 99.9\%$ .

#### *Efeito do TTO sob biofilme*

O método de formação de biofilme em placas de cultura celular de 96 poços foi descrito previamente na literatura<sup>24</sup>.

Volumes iguais de *S. mutans* e *L. acidophilus* foram misturados e 100  $\mu$ L desta suspensão foi transferida para cada poço para a formação de dual-species biofilms (DSB). Para a formação de single-species biofilms (SSB) foi adicionada 100  $\mu$ L de cada microrganismo em cada poço. Inicialmente, as placas foram incubadas (37 °C, 75 rpm) por 1.5 h a fim de promover a aderência das bactérias a superfície dos poços (fase de adesão). A suspensão foi aspirada delicadamente e cada poço foi lavado com PBS para remover as células não aderidas. Então, 100  $\mu$ L de BHI com 1% de sacarose foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada (37 °C, 75 rpm) por 48 h para promover o crescimento do biofilme (fase de crescimento).

Após a formação do biofilme, o meio foi gentilmente aspirado e os poços lavados com PBS. Foi adicionado 100  $\mu$ L de TTO (de 2% a 0.25% v/v) aos poços. Poços sem TTO foram usados como controle negativo e poços com CHX 0.12% foram usados como controle positivo. As placas foram incubadas

microaerobiamente (37 °C, 75 rpm) por 24 h. Então o meio foi aspirado e foram lavados com PBS para remover as células não aderidas. Nove amostras (n=9) de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a avaliação da viabilidade das bactérias em SSB e DSB por meio de ensaio de XTT.

O ensaio de XTT <sup>25</sup> é um teste colorimétrico e permite uma estimativa do metabolismo ativo microbiano por redução das enzimas desidrogenase presentes no sistema de transporte de elétrons em um cristal solúvel em água, o formazano. O sal de XTT (Sigma, MO, USA) foi preparado em água ultrapurificada na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi filtrada e estocada a -80 °C até o uso. Solução de menadiona (Sigma, MO, USA) foi preparada em acetona a 0.4 mM anteriormente ao experimento. Cada poço recebeu 200 µL de solução de XTT (contendo 158 µL de PBS com 200 mM glicose, 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona diluída). As placas foram incubadas por 3 h no escuro a 37 °C. Então, a absorbância foi determinada em 492 nm por espectrofotômetro (ELX 800 - Universal Microplate Reader; Bio-Tek instrument, Inc., VT, EUA). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e três momentos diferentes.

#### *Efeito do TTO em biofilme formado sobre esmalte e dentina*

Blocos de esmalte e dentina (5x5x1 mm) foram preparados a partir de incisivos bovinos. Cada coroa foi cortada em um aparelho para cortes seriados (Isomet 1000, Buehler Ltda., IL, USA) com um disco de diamante acoplado. As superfícies dos blocos foram desgastadas e regularizadas com lixas d'água de granulação 200. Uma solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada, por 60

segundos, sobre os blocos de esmalte e 30s sobre os blocos de dentina com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer*. Em seguida os espécimes foram lavadas por meio da aplicação, por 60 segundos, de água deionizada esterilizada. Os blocos foram submetidos à avaliação da rugosidade superficial (Ra) pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surfest SJ-401, Mitutoyo Corporation, Japão) e distribuídos nos grupos experimentais e controle, a partir destes valores, por aleatorização por restrição. Os espécimes foram esterilizados por meio de gás de óxido de etileno.

Para aproximar este estudo das condições naturais, nesta fase do experimento somente DSB foi formada sobre às superfícies dos blocos. Utilizando uma pinça esterilizada, cada bloco de esmalte e de dentina foi colocado em um poço de placa de cultura celular de 24 poços contendo 1 mL de saliva artificial estéril durante 1 hora para a formação da película adquirida sobre a superfície dos blocos. Após este tempo, os blocos foram removidos destes poços e lavados com PBS e com o auxílio de uma pinça estéril, foram colocados nos poços de uma nova placa de cultura. Volumes iguais de *S. mutans* e *L. acidophilus* foram misturados e 1 mL desta suspensão foi transferida para cada poço para formação de DSB. Para a formação do biofilme foi utilizada a técnica descrita anteriormente.

Após a formação do biofilme, os blocos foram imersos nas soluções simulando a aplicação clínica de enxaguatório bucal por 60 segundos, em 1mL das seguintes soluções: TTO 2%, clorexidina 0,12% (controle positivo) e PBS (controle negativo). Então os blocos foram imersos em 1 mL de PBS para



remoção das soluções e das células desprendidas devido a ação das soluções. Em uma nova placa, os blocos receberam BHI com 1% de sacarose e incubada (37 °C, 75 rpm), por um período de 3 h para recuperação das bactérias remanescentes. A viabilidade celular do biofilme resultante foi avaliada por ensaio de XTT e visualização dos mesmos por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Oito amostras (n=8) de cada grupo controle e experimental foram então lavado e imerso em tubos contendo 500 µL de PBS. Então, os tubos foram posicionados em ultrassom por 20 minutos para separar o biofilme dos blocos. A suspensão resultante nos tubos foram então centrifugada e ressuspendida em 1 mL de solução de XTT. Os tubos foram incubados por 3 h no escuro a 37° C. Duas alíquotas de cada poço (100 µL cada) foram transferidas para uma placa de 96 poços e analisada em 492 nm por espectrofotômetro.

Das amostras, duas (n=2) de cada grupo experimental e controle foram analisados em MCVL. Esta análise permite visualizar os microrganismos viáveis e não-viáveis presentes no biofilme resultante após tratamento. Os blocos foram posicionados em um novo well e receberam uma solução composta de SYTO-9 3.34 mM (Invitrogen, CA, USA) e iodeto de propídio (IP) (SIGMA, MO, USA) 20 mM. SYTO-9 é um corante verde-fluorescente, geralmente marcando ambos microrganismos, viáveis e não-viáveis. O IP é um corante vermelho-fluorescente e penetra somente nas células com membrana danificada, portanto marcando somente os microrganismos não-viáveis. Os biofilmes sobre os blocos foram incubados com esta solução por 15 minutos no escuro a 30 °C. Então, as amostras foram posicionadas sob uma lâminula de vidro e então analisadas por meio do

MCVL (Leica TCS SPE). Imagens de um único plano focal do biofilme foi capturado pelo sistema do MCVL utilizando lente de 40X de aumento e abertura de 1.2. A área selecionada para análise do biofilme foi definida aleatoriamente desde que não tão perto da borda do bloco.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS versão 17.0 (Chicago, IL, USA). Os dados obtidos referentes a atividade metabólica dos microrganismos foram avaliados e apresentaram distribuição não normal e, portanto, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para a comparação dos tratamentos. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ). A análise da viabilidade dos microrganismos usando CLSM foi realizada de maneira descritiva.

### **Resultados**

#### *Determinação da CIM e CBM*

O teste de microdiluição em caldo mostrou que o TTO foi efetivo contra o *S. mutans* e *L. acidophilus* sob forma planctônica, sendo a CIM = 0.5% e CBM = 1% para ambas espécies. Não houve interferência do solvente identificado pela presença de turvação e efeito antimicrobiano do controle positivo, CHX 0.12%, identificado pela ausência de turvação.

*Effects of TTO on established biofilms*

Os valores de densidade óptica (DO), medidos por ensaio de XTT após exposição do SSB e DSB de *S. mutans* e *L. acidophilus* às soluções controles e de TTO estão presentes na Tabela 1.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre o controle negativo e as soluções de TTO de 0.25 a 2% para SSB de *S. mutans* e TTO 2% para *L. acidophilus* SSB causando portanto, efeito antimicrobiano ( $p < 0.05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa para DSB ( $p > 0.05$ ). Dentre todas as concentrações de TTO, as concentrações de 1 e 2% apresentaram maiores valores de redução no número de microrganismo viáveis em todos os biofilmes. O controle positivo (CHX 0,12%) apresentou maior potencial antimicrobiano.

*Efeito do TTO sobre biofilme formado em esmalte e dentina*

Os valores de DO obtidos por ensaio de XTT após exposição do DSB de *S. mutans* e *L. acidophilus* pelo tempo de 60 s as soluções controles e de TTO estão apresentadas na Tabela 2.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos controles e TTO 2%, apresentado portanto, efeito antimicrobiano. Diferença estatisticamente significativa foi detectada entre TTO 2% ( $p < 0.05$ ) e controle negativo (PBS), entretanto, com menor efetividade que o controle positivo (CHX 0.12%) ( $p < 0.05$ ).

Amostras tratadas com os controles e TTO 2% foram selecionadas para análise de viabilidade bacteriana no DSB resultante aderido a superfície dos

blocos de esmalte e dentina. Os microrganismos viáveis foram corados em verde e os não-viáveis apresentaram coloração amarelo-avermelhado. Em todos os grupos, é possível observar que após o tratamento, os microrganismos não-viáveis permaneceram nos blocos de esmalte e dentina. Os biofilmes tratados com o controle negativo (PBS) apresentaram presença de células bacterianas coradas em verde na maior parte do campo analisado mostrando uma camada composta de maneira uniforme. Algumas células mortas eram evidentes, possivelmente devido à ausência de nutrientes. Como esperado, os grupos tratados com controle positivo (CHX 0.12%) apresentaram coloração amarelo-avermelhado na maioria das células bacterianas e uma baixa densidade de biofilme em algumas áreas. O tratamento com TTO 2% mostrou um grande número de células bacterianas não-viáveis (Figura 1).

### **Discussão**

O TTO tem sido objeto de investigação em diferentes áreas devido ao seu reconhecido efeito antimicrobiano. Devido ao seu caráter lipofílico, o TTO tem um mecanismo de ação bacteriana, que consiste na sua capacidade de se penetrar e danificar as estruturas da membrana celular, causando a perda de material intracelular e da incapacidade de manter a homeostase.<sup>26, 27</sup> Este estudo avaliou a eficácia do TTO contra bactérias cariogênicas. Óleo de *Melaleuca* mostrou bons resultados contra os microrganismos no estado planctônico. Para ambas as espécies, *S. mutans* e *L. acidophilus*, o CIM foi de 0,5% e CBM foi de 1%. Os

dados foram semelhantes aos encontrados em outros estudos.<sup>20-21</sup> Isolados da cavidade oral humana, espécies de *Streptococcus* mostrou CIMs variando entre 0,12 a 2% e CBMs variando entre 0,5 a 2% e para *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) o valor MIC foi de 0,25% e MBC valores de 0,5%.<sup>22</sup> Em outro estudo, a CIM e a CBM para *S. mutans* JC-2 foram de 1%.<sup>21</sup> A eficácia de diferentes óleos essenciais também foram avaliadas, e especificamente o TTO mostrou uma CIM de 10 mg / mL (equivalente a 1%) para *S. mutans* ATCC 25125 e *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) SA-1, porém sua ação foi menor às bactérias quando comparado a outros óleos.<sup>20</sup>

Efeito antimicrobiano do óleo foi observada também para biofilme. A porcentagem de inibição do metabolismo celular para concentrações de TTO de 0,25 a 2% variou de 31% e 58%, respectivamente, para *S. mutans* SSB, e para a concentração de TTO 2% foi de 35% para *L. acidophilus* SSB. Estes valores foram, em geral, maior do que aqueles encontrados para CIM e CBM, uma vez que os microrganismo em biofilme apresentam maior tolerância aos antimicrobianos e a outros fatores ambientais do que na forma planctônicas.<sup>28, 29</sup> Um único estudo avaliou o TTO sobre biofilme in vitro e mostrou resultados semelhantes, revelando que o óleo foi eficaz contra *S. mutans* e *L. plantarum* SSB em uma concentração de 20 mg / mL (equivalente a 2%).<sup>20</sup> Este estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa para DSB. Vários pesquisadores sugerem que as interações entre diferentes bactérias em biofilme podem afetar a eficácia de desinfecção devido a uma relação mutualísticas entre as mesmas.<sup>30, 31</sup>

Uma maior redução dos valores para inibição do metabolismo para *S. mutans* SSB foi observada de acordo com o aumento das concentrações do TTO, caracterizando um processo de dose-dependência para essa espécie. Outros estudos têm relatado o mesmo efeito de TTO com bactérias,<sup>32</sup> como para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* NCTC 8196, e vírus,<sup>15</sup> vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). No entanto, as concentrações mais baixas de TTO, 0,25% e 0,5%, para *L. acidophilus* SSB, mostrou maior atividade metabólica do biofilme, sugerindo que a atividade deste microrganismo aumenta em resposta, devido um reflexo a uma reação de estresse. Isto foi relatado anteriormente com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*<sup>33, 10</sup>, indicando que a tolerância ao TTO em alguns microorganismos é um processo dependente de energia.

Este estudo elegeu o ensaio de XTT e a análise das imagens obtidas por MCVL, a fim de avaliar o biofilme. A correlação pobre entre XTT e os métodos convencionais de contagem de UFC foi relatada em muitos estudos.<sup>34, 35</sup> O procedimento para a contagem de UFC remove as células da massa de biofilme por raspagem, o que pode resultar na remoção incompleta de células da superfície, a dispersão de agregados não-bacteriano e ruptura de algumas células. O ensaio de XTT e as imagens obtidas por MCVL permitem determinar a viabilidade de células dentro do biofilme com mais precisão, porque permite uma avaliação de um biofilme inalterado. As imagens obtidas por MCVL confirmam os resultados do ensaio XTT na terceira fase desta pesquisa, indicando que uma redução significativa da viabilidade do biofilme foi evidente para ambas as espécies em

DSB após 60 s de exposição com TTO 2% e ao controle positivo (CHX 0.12%). O óleo de *Melaleuca* diminui o metabolismo celular em 33% e 44% do DSB em esmalte e dentina, respectivamente. Estudos de tempo de morte mostraram rápido morte ao *S. mutans*<sup>21, 22</sup> e *L. rhamnosus*<sup>22</sup> após 30 s de tratamento com TTO 0,5%. A mesma concentração foi determinada por outro estudo e inibiu a adesão de *S. mutans* em botões adaptados em placa de cultura celular.<sup>21</sup> Comparação de bochechos contendo TTO 0,34%, clorexidina ou placebo foi realizado em um estudo in vivo.<sup>36</sup> O uso de TTO, não apresentou diferença na formação de placa quando comparado ao bochecho de placebo, enquanto que a clorexidina diferiu significativamente do placebo. Por outro lado, outro estudo in vivo comparou TTO 0,2%, solução de alho 2,5% e CHX 0,12%.<sup>23</sup> Todas as soluções produziram imediata redução de *S. mutans* e outros microorganismos orais, mas apenas o TTO manteve essa redução por 2 semanas após o uso.

Este estudo mostrou que a eficácia do TTO não foi melhor do que a clorexidina em todos os testes. A porcentagem de inibição do metabolismo celular para CHX 0.12% variou de 72%, 64% e 79% para *S. mutans* SSB, *L. acidophilus* SSB e DSB, respectivamente. O mesmo efeito foi observado também para a exposição de 60 s, sendo a variação do percentual de inibição entre 77% e 69% para esmalte e dentina, respectivamente. CHX é considerado o tratamento "padrão-ouro" antiplaca.<sup>3, 4</sup> A fim de diminuir a dose efetiva de clorexidina, com a adição de óleos essenciais para prolongar a sua eficácia clínica e reduzir seus efeitos colaterais associados, um estudo avaliou o efeito da combinação do óleo essencial com clorexidina sobre *S. mutans* e *L. plantarum* nas formas planctônicas

e biofilme.<sup>20</sup> O TTO em combinação com clorexidina mostrou, para ambas as espécies na forma planctônica, uma CIM de 2,5 mg / mL (equivalente a 0,25%) e para ambas as espécies em biofilme, uma CIM de 10 mg / mL. Porém, quando usada com o TTO, não houve uma diferença na quantidade de clorexidina necessária para atingir o mesmo nível de inibição de crescimento em comparação com clorexidina usado sozinha.

Apesar dos diversos estudos caracterizando o amplo espectro de ação do óleo de *Melaleuca*, há poucas evidências que possam indicar que o TTO ou seus componentes apresentem potencial tóxico significativo. Conclusões sobre a toxicidade do TTO são complicadas pelo fato de que os componentes do óleo possuem diferentes características físico-químicas<sup>37</sup>. Os dados indicam que a toxicidade do TTO é dose-dependente, tornando-se tóxico quando ingerido em doses elevadas, causando reações alérgicas somente em indivíduos predispostos<sup>38</sup>. A literatura disponível sugere que o TTO pode ser usado topicamente

É importante ressaltar que alguns fatores contribuem para os resultados divergentes apresentados nesta discussão como as diferenças entre os tipos e números de isolados bacterianos, a metodologia e as características do TTO testados. Como conclusão, os dados obtidos por esse experimento in vitro mostraram que o TTO é eficaz contra bactérias cariogênicas tanto na forma planctônica como em biofilme. Efeitos colaterais, que aparecem como resultado do uso contínuo de clorexidina, não são relatados na literatura para o TTO e considerado-se estes problemas, o mesmo aparece como um tratamento alternativo possível ao uso da clorexidina. Este estudo considera que o óleo de *Melaleuca* pode ter um papel importante no tratamento anticariogênico, porém mais estudos devem ser conduzidos.



## **Agradecimentos**

Agradecemos ao Prof. Dr. Paulo Jorge Marques Cordeiro (IQSC/USP) pela análise de cromatografia gasosa, a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Graeff (FOB/USP) pela análise em MCVL e ao Dr. Manuel Marcos Cunha Quattrer (Acecil Central de Esterilização Ltda) pela esterilização dos espécimes por meio de óxido de etileno.

**Apoio:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento deste estudo (Pr. no. 2009/11939-0) e pela concessão de bolsa de Mestrado (Pr. no. 09/54190).

**Declaração de conflito de interesses:** Não há conflito de interesse.

**Cômite de ética:** Não consta.

## **Referências**

1. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral Biofilm: emerging concepts in microbiol ecology. J Dent Res 2010; 89: 8-18.
2. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. BMC Oral Health 2006; 6: 14.
3. Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. Int J of Antimicrob Agents 2009; 33: 8-13

4. Twetman, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004; 38: 223-229.
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007; 70: 461-477.
6. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 50-62.
7. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 492-497.
8. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J Agric Food Chem* 1989; 37: 1330-1335.
9. Tsao N, Kuo CF, Lei HY, Lu SL, Huang KJ. Inhibition of group A streptococcal infection by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil concentrate in the murine model. *J Appl Microbiol* 2010; 108: 936-944.
10. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 343-347.
11. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol* 2009; 1-7.

12. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105: 327-332.
13. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannouma MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 272-276.
14. Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. Antiviral Res 2011; 89: 83-88.
15. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. Phytother Res 2010; 24: 673-679.
16. Brand C, Ferrante F, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. 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 2001; 50: 213-219.
17. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflamm Res 2000; 49: 619-626.

18. Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med* 2011; 77: 54-56.
19. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 877-888.
20. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 221-225.
21. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 61-4.
22. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 389-392.
23. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J* 2002; 52: 433-437.
24. Thein ZM, Smaranayake YH, Smaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS* 2007; 115: 1241-1251.

25. Da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J* 2008; 19: 364-369.
26. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88: 170-175.
27. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanism of hydrocarbons. *Microbiol Ver* 1995; 59: 201-222.
28. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*. 2009; 88: 982-90.
29. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 7-15.
30. Kara D, Luppens SBI, Van Marle J, Ozok R, Ten Cate JM. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine. *FEMS Microbiol*. 2007; 271: 90-97.
31. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 3916-3923.
32. Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Alska BR. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol* 2011; 1 (60): 35-41.

33. Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ, Riley TV. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 386-392.
34. Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods*; 2007; 68: 19-25.
35. McCluskey C, Quinn JP, McGrath JW. An evaluation of three new generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microb Ecol*; 2005; 49: 379-387.
36. Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil – a pilot study. *Clin Oral Invest* 2000; 4:70-73.
37. Coutts I, Shaw S, Orton D. Patch testing with pure tea tree oil - 12 months experience. *Br J Dermatol* 2002; 147: 70.
38. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 616-625.

**Tabela 1.** Valores de absorvância obtidos por meio de ensaio de XTT para os tratamentos de acordo com os biofilmes, SSB e DSB.

Tratamentos	Biofilmes		
	<i>S.m.</i>	<i>L.a.</i>	DSB
BHI + Sacarose 1%	0.43 (0.36-0.49) <sup>a</sup> A <sup>b</sup>	0.28 (0.21-0.32) AC	0.24 (0.21-0.26) A
CHX 0,12%	0.03 (0.02-0.04) B	0.1 (0- 0.19) B	0.05 (0.02-0.07) B
TTO 0,25%	0.28 (0.26-0.32) C	0.32 (0.22-0.34) A	0.22 (0.17-0.25) A
TTO 0,5%	0.29 (0.23-0.33) C	0.26 (0.17-0.39) AC	0.24 (0.18-0.33) A
TTO 1%	0.2 (0.17-0.2) D	0.21 (0.15-0.28) CD	0.23 (0.15-0.28) A
TTO 2%	0.18 (0.15-0.32) CD	0.18 (0.14-0.21) D	0.21 (0.18-0.25) A

<sup>a</sup> medianas (P25-P75) (n=9) dos valores de absorvância.

<sup>b</sup> diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, p>0.05)

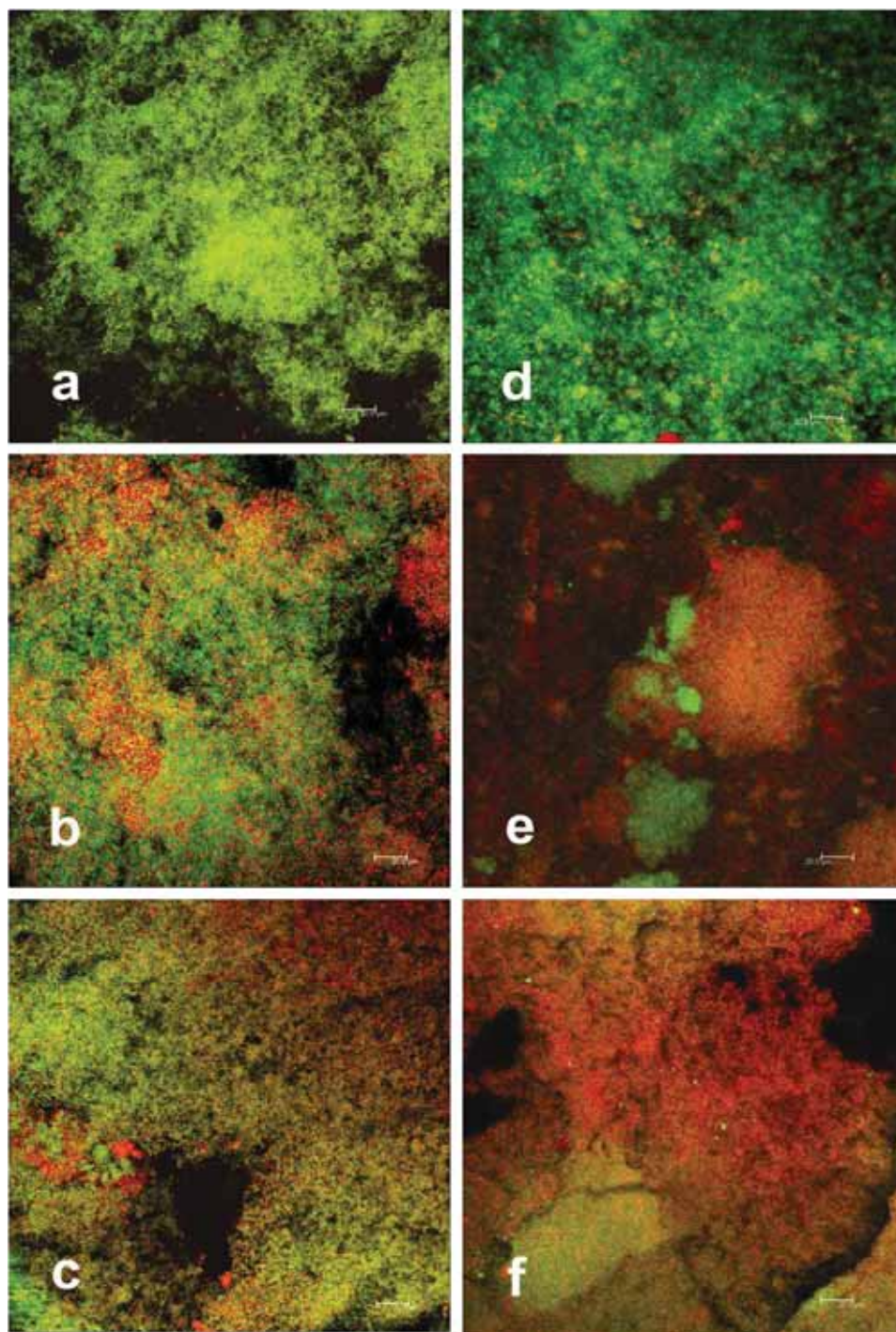
**Tabela 2.** Valores de absorvância obtidos por meio de ensaio de XTT para os tratamentos de acordo com os biofilmes, DSB.

Tratamentos	Biofilmes	
	DSB em esmalte	DSB em dentina
PBS	0.18 (0.16-0.22) <sup>a</sup> A <sup>b</sup>	0.49 (0.35-0.52) A
CHX 0.12 %	0.04 (0.003- 0.07) B	0.15 (0.007-0.32) B
TTO 2 %	0.12 (0.7-0.14) C	0.27 (0.15-0.28) C

<sup>a</sup> medianas (P25-P75) (n=9) dos valores de absorvância.

<sup>b</sup> diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferença estatisticamente significante (Mann-Whitney, p>0.05)





**Figura 1.** Imagens obtidas pelo MCVL. DSB em esmalte tratado com as seguintes soluções: (a) PBS, (b) CHX 0.12% e (c) TTO 2% e DSB em dentina tratado com as seguintes soluções: (a) PBS, (b) CHX 0.12% e (c) TTO 2%. As imagens do confocal foram obtidas usando lentes com aumento de 40 X e abertura de 1.2.

# Capítulo 2



**Avaliação da citotoxicidade da *Melaleuca alternifolia*  
sobre cultura de queratinócitos**

Amanda FONTANA <sup>a</sup>, Marília Ferreira CORREIA <sup>a</sup>, Marianne Nicole Marques NOGUEIRA <sup>b</sup>, Cleverton Roberto DE ANDRADE <sup>c</sup> e Denise Madalena Palomari SPOLIDORIO <sup>c, \*</sup>

<sup>c.</sup> *Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.*

<sup>d.</sup> *Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.*

<sup>e.</sup> *Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.*

**\* Autor para Correspondência**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Depart. de Fisiologia e Patologia / Lab. de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14.801-903, Araraquara, SP - Brasil

Fone: + 55 (16) 3301-6472 / FAX: + 55 (16) 3301-6488

e-mail: [dmps@foar.unesp.br](mailto:dmps@foar.unesp.br)

O artigo foi formatado segundo as normas do periódico <i>Toxicology in Vitro</i> .
--

## Resumo

**Objetivo:** O objetivo geral deste trabalho foi avaliar in vitro o efeito citotóxico do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) em cultura de queratinócitos (HaCat).

**Materiais e Métodos:** Cultura de células HaCat foram expostas a diferentes concentrações de TTO (0.12% a 2%) por períodos de 60 s, 2 h e 60 s, com recuperação de 24 h. Meio de cultura celular (DMEM) e peróxido de hidrogênio 3% foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. DMSO 0.4%, adicionado às soluções de TTO como solvente do óleo, foi também aplicado para avaliar possível efeito sobre as células. Clorexidina 0.12%, padrão-ouro entre os antimicrobianos orais, foi aplicada a fim de gerar comparações. A análise da citotoxicidade deu-se por meio do ensaio de MTT para avaliação da atividade metabólica das células. Os dados obtidos apresentaram distribuição não normal e, portanto, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. **Resultados:** Houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos controle e todas as concentrações de TTO para exposição de 2 h e a partir da concentração de TTO 0.5% para as exposições de 60 s e 60 s com recuperação de 24 h, sendo, portanto, concentrações e tempos que proporcionam efeito tóxico. CHX 0.12% apresentou diferença estatística ( $p < 0.05$ ) do controle negativo em todos os tempos de exposição. **Conclusão:** TTO pode ser usado de forma segura em baixas concentrações (abaixo de 0.25%) pelo tempo de 60 s, porém mais estudos devem ser conduzidos.

**Palavras-chave:** Óleo de *Melaleuca*, citotoxicidade, queratinócitos.

## 1. Introdução

Extratos vegetais e têm sido usados com maior frequência para fins medicinais (Newman e Cragg, 2007). Diversos estudos apresentam atividade antimicrobiana desses produtos sobre os patógenos orais, mostrando que esses agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas (Catalán et al., 2008; Duarte et al., 2006; Hammer et al., 2003). Um fitoterápico que vem se destacando é o óleo da árvore-do-chá (tea tree oil - TTO). Trata-se de um óleo essencial, obtido por destilação a vapor das folhas da *Melaleuca alternifolia* de origem australiana (Carson et al., 2006). O TTO é composto por aproximadamente 100 componentes (Brophy et al., 1989), sendo os principais o terpinen-4-ol, gama-terpiene, alfa-terpiene, 1,8 cineole e alfa-pinene (Cox et al., 2001).

A literatura mostra que a atividade do TTO é de amplo espectro, sendo antimicrobiano (Garozzo et al., 2011; Kwiecinski et al., 2009; Traboulsi et al., 2008; Tsao et al., 2010), antiinflamatório (Brand et al., 2001; Hart et al., 2000) e anticancerígeno (Bozzuto et al., 2011; Greay et al., 2010). Embora os métodos de testes sejam diferentes, a literatura indica susceptibilidade satisfatória de bactérias e fungos orais quanto ao uso do TTO (Carson et al., 2006; Hammer et al., 2003). Os estudos indicam que grande parte das bactérias são suscetíveis em concentrações de TTO a 2% (v/v) ou menos, e fungos apresentam concentrações inibitórias entre 0,03 e 0,5% e fungicida entre 0,12-1% (Carson et al., 2006; Hammer et al., 2003).

Apesar dos estudos caracterizando o amplo espectro de ação do óleo de *Melaleuca*, há poucas evidências que possam indicar que o TTO ou seus componentes apresentem potencial tóxico significativo. Alguns estudos avaliaram o efeito tóxico do TTO e/ou seus componentes em linhagens celulares humana in vitro, incluindo células epiteliais e fibroblastos (Brand et al., 2001; Hart et al., 2000; Hayes et al., 1997; Loughlin et al., 2008; Nielsen, 2008; Schnitzler et al., 2001; Sorderbeg et al., 1996). Os dados indicam que a toxicidade do TTO é dose-dependente tornando-se tóxico quando ingerido em doses elevadas (Hammer et al., 2006) causando reações alérgicas somente em indivíduos predispostos (Veien et al., 2004). Conclusões sobre a toxicidade do TTO são contraditórias pelo fato de que o óleo contém componentes com diferentes características físico-químicas (Cal e Sznitowska, 2003).

A avaliação da viabilidade celular é fundamental para determinar a citotoxicidade in vitro de um material a fim de prever reações ao seu uso ou técnicas de tratamento. Queratinócitos da epiderme são linhagens de células apropriadas para testes de compatibilidade cutânea local (Wiegand e Hipler, 2009). As células HaCat são queratinócitos imortalizados e importantes porque formam a primeira camada de células a serem afetadas por substâncias que atingem a mucosa oral. Tendo em vista a possibilidade do uso do TTO como prevenção ou tratamento contra patógenos orais, torna-se necessário investigar o efeito citotóxico direto desse agente antimicrobiano em concentrações inibitórias semelhantes às encontradas na literatura. O propósito deste estudo foi avaliar a

citotoxicidade de diferentes concentrações de TTO em células HaCat, após diferentes tempos de exposição.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1 Cultura Celular*

Para avaliação da citotoxicidade do TTO, foi utilizada linhagem celular imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT). As células HaCaT foram cultivadas em frascos de cultura esterilizados de 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corp., MA, EUA), utilizando o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina - Gibco, NY, EUA) e mantidas em incubadora a 37 ° C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, em atmosfera umidificada. As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias, até que um número adequado de células para o estudo fosse obtido. Em seguida, 30 000 células/cm<sup>2</sup> foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços (Costar Corp, MA, EUA) e mantidos em incubadora umidificada por 48 h. Então, o meio de cultura foi aspirado e 1 mL de um novo meio de cultura sem SFB foi adicionado sobre as células e, então, mantidas em incubadora por mais 24 h.

## *2.2 Preparo das soluções de TTO e aplicação*

A composição do TTO (Sigma, MO, EUA) foi analisada por cromatografia gasosa para controle de qualidade do óleo de acordo com a ISO 4730. Previamente à utilização do óleo nos experimentos, foi realizada a diluição do mesmo nas concentrações finais de 2% a 0.12% v/v, em meio de cultura DMEM. Para aumentar a solubilidade do TTO foi utilizado DMSO (Synth, Brasil) na concentração final de 0.4%. Para os grupos controle negativo e positivo foram utilizados meio de cultura puro (DMEM) e peróxido de hidrogênio 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), respectivamente. Foram adicionados grupos controle de DMSO 0.4%, para avaliar possíveis interferência do solvente, e grupo controle de clorexidina (CHX) 0,12%, por ser essa solução aceita como padrão-ouro entre os antimicrobianos orais. Para isso, uma solução de 2% CHX foi diluída em meio de cultura DMEM para obter a CHX na concentração final a ser testado.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi aspirado e os controles e soluções de TTO foram adicionadas a cada poço contendo as células. As células HaCat foram expostas às soluções em diferentes tempos: 60 s, 2 h e 60 s, com um período de recuperação de 24 h. Após a exposição pelo período determinado, os grupos tiveram suas soluções aspiradas e as células foram lavadas com PBS. As amostras de cada grupo foram submetidas à análise de atividade metabólica celular por meio de ensaio de MTT.



### *2.3 Análise do metabolismo celular*

A análise colorimétrica do metiltetrazolium (ensaio de MTT) (Mosmann et al., 1983) avalia o metabolismo celular por meio da atividade citoquímica da enzima desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células viáveis.

Doze amostras (n=12) de cada grupo experimental e controle receberam uma solução composta por 900 µL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e 100 µL de solução de MTT (Sigma, MO, EUA), a qual foi preparada por meio da dissolução de 5 mg do sal de MTT em 1 mL de PBS esterilizado. Após a incubação das células pelo período de 4 horas, a 37 °C, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e, posteriormente, aplicado 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0.04 N, para solubilizar os cristais formados na presença de mitocôndrias ativas. Duas alíquotas de 100 µL de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (Costar Corp., MA, USA). A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal foram coradas em violeta intenso. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD, 3550-UV, CA, EUA).

### *2.4 Análise Estatística*

A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS versão 17.0 (Chicago, IL, USA). Os dados obtidos referentes ao metabolismo celular foram avaliados e apresentaram distribuição não normal e, portanto, foram utilizados os

testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para a comparação dos grupos e tempos de exposição. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

### 3. Resultados

Os valores de absorvância referentes ao metabolismo celular, obtidos por meio do teste de MTT, após exposição das células HaCat aos diferentes grupos controle e soluções de TTO estão apresentadas na Tabela 1.

Houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre o grupo controle negativo (DMEM) e todas as concentrações de TTO para exposição de 2 h e a partir da concentração de TTO 0.5 a 2% para as exposições de 60 s e 60 s com recuperação de 24 h, indicando efeito tóxico à cultura de queratinócitos. As concentrações de TTO 0.12 e 0.25% não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle negativo quando expostas pelo tempo de 60 s e 60 s com recuperação de 24 h ( $p > 0.05$ ) não apresentando, portanto efeito tóxico às células. Dentre as soluções de TTO, as concentrações de 1 e 2% causaram maior redução do metabolismo celular em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ ) causando intenso efeito tóxico à HaCat. A exposição das células ao óleo pelo tempo de 2 h causou maior citotoxicidade enquanto que a exposição por 60 s foi a menos tóxica às células.

O controle DMSO 0.4% não apresentou diferença estatística quando comparado ao controle negativo ( $p > 0.05$ ) provando que o solvente não interferiu

no metabolismo celular. Como esperado, o controle positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3%) apresentou diferença estatística ( $p < 0.05$ ) do controle negativo, ausando intenso efeito tóxico às células. Entretanto, não apresentou diferença estatística ( $p > 0.05$ ) comparado ao grupo CHX 0.12%, padrão-ouro para antimicrobianos, nos tempos de 2 h e 60 s com recuperação de 24 h. O valor de redução do metabolismo celular foi maior quando tratadas com CHX 0.12% do que quando tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% durante o tempo de 60 s de exposição. Ambos, controle positivo e CHX 0.12%, não diferiram estatisticamente ( $p > 0.05$ ) das soluções de TTO 1 e 2% no tempo de exposição de 60 s sendo estas ainda mais tóxicas ( $p < 0.05$ ) quando expostas pelo tempo de 2 h e 60 s com recuperação de 24 h.

#### 4. Discussão

O óleo de *Melaleuca*, mais conhecido como TTO, possui reconhecidas propriedades antimicrobianas, todavia há poucas evidências científicas que possam indicar que o TTO ou seus componentes apresentem potencial tóxico significativo. Podendo o óleo de *Melaleuca* ser uma alternativa para o controle de patógenos, principalmente os orais (Astani et al., 2010; Filoche et al., 2005; Traboulsi et al., 2008), é necessário determinar seu possível efeito tóxico sobre as células podendo, desta forma, gerar dados de interesse que possibilitem a aplicação clínica dessa substância. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do TTO em cultura de queratinócitos (HaCat).

As células foram expostas por diferentes tempos de contato ao TTO. Intensa redução do metabolismo celular foi observada para todas as diferentes concentrações de TTO (de 0.12 a 2%) quando expostas pelo tempo de 2 h e comparado aos demais tempos, a exposição por 60 s apresentou menor potencial tóxico a HaCat. Os resultados obtidos expressam que independentemente da concentração de TTO, quanto maior tempo de contato com as células maior é o efeito citotóxico do óleo, indicando uma característica tempo-dependente. Essa diferença pode ser explicada porque em períodos mais longos, maior é o tempo de contato da substância com a célula causando assim, maiores danos celular. O crescente efeito citotóxico fez-se presente em outros estudos indicando aumento tóxico do óleo de 1 h e 4 h para 24 h sobre fibroblastos e células epiteliais humanas (Soderberg et al. 1996) e de 4 h para 24 h sobre cinco linhagens de células humanas (HeLa, K562, Hep G2, CTVR-1 e Molt-4) (Hayes et al., 1997). O mesmo potencial tóxico também foi observado para o tempo de 60 s com recuperação de 24 h a partir da concentração de 0.5 a 2%. Esses dados indicam que o TTO mantém um efeito contínuo observada para as maiores concentrações, provavelmente interagindo e causando danos à célula levando a diminuição de seu metabolismo mesmo após a remoção do contato direto com as mesmas. Essa substantividade do óleo já foi citada como característica importante para sua ação antimicrobiana mantendo efeito residual contra patógenos orais por 15 dias após seu uso (Groppo et al. 2002).

Concentrações de TTO que variam de 0.12 a 2% foram avaliadas neste presente estudo. As concentrações de 0.12 e 0.25% de TTO, durante as exposições

de 60 s e de 60 s com recuperação de 24 h, não apresentaram redução do metabolismo. O mesmo foi observado em outro estudo onde as concentrações de 0.12 e 0.25% de TTO também não apresentaram efeito tóxico aos fibroblastos humanos (Loughlin et al., 2008). Este desempenho corroboram com outros autores (Hammer et al., 2006; Loughlin et al., 2008; Soderberg, et al., 1996) que indicam que o TTO não é tóxico em baixas concentrações. As concentrações de 0.5 a 2% de TTO foram tóxicas à HaCat independentemente da duração de exposição sendo que a porcentagem de inibição do metabolismo celular para estas concentrações variou de 65 a 100%, respectivamente. Este resultado mostra que as concentrações de TTO foram tóxicas para a células de maneira dose-dependente, ou seja, quanto maior é a concentração desta substância, maior a citotoxicidade por ela determinada. Análise de diferentes concentrações de TTO foram realizadas por alguns estudos que apresentam em seus resultados relação de toxicidade dependente da dose aplicada. Em um estudo de Soderberg, et al (1996) o TTO foi ligeiramente tóxico em concentrações inferiores a 100 µg/ml (0.01% v/v), mas em concentrações superiores a essa, 300 µg/ml e 1000 µg/ml (0.03% e 0.1%), causou um rápido declínio na viabilidade celular. Na análise de 0.001 a 0.062% de TTO para monócitos, Hart et al (2000) mostraram que concentrações  $\geq$  0,016% podem ser consideradas tóxicas. O TTO induziu uma resposta dose-dependente em células MCF-7, sendo que as maiores concentrações de TTO aplicada às células ( $> 0,025\%$ ) eram mais tóxicas (Nielsen et al., 2008). O mecanismos de ação do TTO sobre as células ainda não foi elucidado mas

acredita-se que por possuir caráter lipofílico, o óleo interage com a membrana celular e, então, interrompe a atividade normal da mesma (Sorderbeg et al., 1996).

A CHX 0.12%, padrão-ouro como agente antimicrobiano oral (Allaker e Douglas, 2009; Twetman, 2004), foi também analisada neste estudo. A solução apresentou efeito tóxico intenso em todos os tempos de exposição a células HaCat sendo que a porcentagem de inibição do metabolismo celular variou entre 94% e 97%. Os resultados obtidos corroboram com outros estudos (Chang, et al., 2001; Lessa et al., 2009; Mariotti e Rumpf, 1999) que apontam em seus trabalhos o efeito citotóxico e substantividade da CHX 0.12% sob as células. A CHX possui efeitos adversos observados no cotidiano clínico e relatados na literatura como pigmentação dos dentes, restaurações e próteses, ulceração da mucosa oral e alterações no paladar (Allaker e Douglas, 2009; Twetman, 2004). Durante a exposição por 60 s, a CHX 0.12% apresentou valores de redução de metabolismo celular maiores que as concentrações de TTO 0.5 e 1% e semelhante a 2%. A avaliação de efeitos adversos decorrentes ao uso do TTO como enxaguatório bucal foram observados por alguns estudos. Groppo et al. (2002), em um estudo in vivo avaliaram os efeitos adversos causados após o uso de TTO 0.2% e CHX 0.12%. Os resultados não mostraram alteração da coloração dentária, leve sensação de queimação para o uso do TTO, e sensação de halito e paladar ruins com o uso da CHX. Outro estudo não observou efeitos adversos sistêmicos e lesões em mucosa, apenas relatos de gosto ruim após o uso de um enxaguatório bucal, contendo óleos essenciais, incluindo o TTO (Lauten et al., 2005).

As variações metodológicas, os diferentes tipos celulares e a ascendência do óleo e seu preparo nos estudos apresentados podem explicar a diversidade de resultados encontrados na literatura. Este estudo, é o primeiro com o objetivo de demonstrar que as concentrações de TTO podem causar danos à cultura de queratinócitos HaCat. Os queratinócitos são organizados em camadas contínuas, distribuídos da derme para superfície. A metodologia usada neste estudo permitiu a disposição das células HaCat em monocamada o que poderia ter intensificado o efeito citotóxico do TTO por este não ter encontrado a barreira mecânica natural do corpo contra o ambiente externo. As evidências sugerem que o emprego de culturas tridimensionais, se comportam de forma diferente das culturas bidimensionais pois simulam de melhor maneira as condições in vivo (Wiegand e Hipler, 2009). O conhecimento sobre a farmacocinética e permeação de óleos essenciais tópicos através da pele humana permanece fragmentado, devido à falta de dados experimentais, porém o óleo de *Melaleuca* e seus componentes demonstraram ter fácil capacidade de penetração cutânea (Cal e Sznitowska, 2003; Reichling et al., 2006).

A toxicidade do TTO presente na literatura foi revisada (Hammer et al., 2006). Os autores destacam os efeitos relacionados com a irritação da pele após a exposição tópica a altas concentrações de TTO e alergia ao óleo ou seus componentes e produtos de degradação oxidativa, somente em indivíduos pré dispostos. A toxicidade do TTO é uma resposta funcional à exposição a uma mistura de diferentes compostos químicos com diferentes características físicas o que torna difícil definir a toxicidade do óleo. A literatura disponível sugere que o

TTO pode ser usado topicamente na forma diluída pela maioria dos indivíduos, sem efeitos adversos (Carson e Ridley, 2001; Fletcher et al. 2005; Hammer, 2006). Uma vez que têm sido demonstrados na literatura os problemas devido ao contínuo uso da clorexidina, este estudo considera o TTO em baixas concentrações um agente com efetiva propriedade antimicrobiana e compatibilidade biológica aceitável, porém mais estudos devem ser conduzidos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento deste estudo (Pr. no. 2009/11939-0) e pela concessão de bolsa de Mestrado (Pr. no. 09/54190).

### **Referências**

Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J of Antimicrob Agents*. 2009; 33: 8-13

Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res*. 2010; 24: 673-9.

Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med*. 2011; 77: 54-6.



Brand C, Ferrante F, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. 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*. 2001; 50: 213-19.

Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J. Agric. Food Chem*. 1989; 37: 1330-5.

Cal K, Sznitowska M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes - in vitro studies. *J Control Release*. 2003; 93: 369-76.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 50-62.

Carson CF, Ridley TV. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. *Contact Dermat*. 2001; 45: 65-7.

Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105: 327-32.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92: 446-50.

Coutts I, Shaw S, Orton D. Patch testing with pure tea tree oil - 12 months experience. *Br J Dermatol.* 2002; 147: 70.

Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91: 492-7.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51,15-22.

Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 221-5.

Fletcher JP, Cassella JP, Hughes D, Cassella S. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. *Int J Aromather.* 2005; 15: 81-6.

Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Res.* 2011; 89:83-8.

Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65: 877-88.

Grosso FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J.* 2002; 52: 433-37.

Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 389-92.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 44: 616-25.

Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.* 2000; 49: 619-26.

Hayes AJ, Leach DN, Markham JL. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *J Essent Oil Res.* 1997; 9: 575– 582.

Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(4): 343-7.

Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, LillieID, Gullion C, Madden TE. A Clinical Study: Melaleuca, Manuka, Calendula and Green Tea Mouth Rinse Phytother Res. 2005; 19:951-57.

Loughlin R, Gilmore BF, McCarron PA, Tunney MM. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Letters in Applied Microbiology*. 2008; 46: 428–33.

Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol*. 1999; 70: 1443-8.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70: 461-77.

Nielsen JB. What you see may not always be what you get – Bioavailability and extrapolation from in vitro tests. *Toxicology in Vitro*. 2008; 22: 1038–1042.

Reichling J, Landvatter U, Wagner H, Kostka KH, Schaefer UF. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006; 64: 222-28.

Schnitzler P, Schön K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*. 2001; 56, 343–347.

Söderberg TA, Johanssonb A, Grefc R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* 1996; 107: 99-109.

Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannouma MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 31: 272-6.

Tsao N, Kuo CF, Lei HY, Lu SL, Huang KJ. Inhibition of group A streptococcal infection by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil concentrate in the murine model. *J Appl Microbiol.* 2010; 108: 936-44.

Twetman, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004; 38: 223-229

Veien NK, Rosner K, Skovgaard G. Is tea tree oil an important contact allergen? *Contact Dermat.* 2004; 50: 378-79.

**Tabela 1.** Valores de absorvância obtidos pelo teste de metabolismo celular (teste de MTT) para os grupos controle e soluções de TTO de acordo com o tempo de exposição.

Tratamentos	Tempo de Exposição		
	2h	60 s	60 s + 24h
DMEM	0.32 (0.223-0.342) * A a **	0.264 (0.211-0.362) A a	0.377 (0.196-0.567) AB a
DMSO 0.4%	0.338 (0.326-0.353) A a	0.331 (0.251-0.411) A a	0.41 (0.211-0.553) AB a
CHX 0.12%	0.019 (0.011-0.023) B a	0.011 (0.007-0.019) B ab	0.011 (0.005-0.015) C b
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	0.014 (0-0.034) BCD a	0.063 (0-0.085) C b	0.031 (0-0.039) C a
TTO 0.12%	0.008 (0.005-0.012) CD a	0.285 (0.213-0.388) A b	0.456 (0.259-0.658) A c
TTO 0.25%	0.006 (0.005-0.008) C a	0.264 (0.182-0.311) A b	0.334 (0.153-0.48) B b
TTO 0.5%	0.007 (0.006-0.011) D a	0.09 (0.082-0.127) D b	0.011 (0.009-0.018) C a
TTO 1%	0 E a	0.026 (0.014-0.101) C b	0 D a
TTO 2%	0 E a	0.013 (0-0.097) BC b	0 D a

\* valores são medianas (P25-P75) (n=12).

\*\* diferentes letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, p>0.05).

# Considerações Finais



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cárie dentária é uma doença infecciosa de origem bacteriana e, portanto, deve ser considerado relevante utilizar uma abordagem antimicrobiana para prevenir e controlar a doença<sup>38,39, 60</sup>. Na proposta de se encontrar uma substância com máxima propriedade antimicrobiana e mínima citotoxicidade este trabalho avaliou o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, ou óleo da árvore-do-chá (tea tree oil – TTO).

Na busca de um melhor esclarecimento sobre o possível uso deste reconhecido agente antimicrobiano<sup>2, 8, 11, 22, 33, 47, 58, 59, 61</sup>, o Capítulo 1 analisa o desempenho de diferentes concentrações de TTO sobre bactérias cariogênicas, *S. mutans* e *L. acidophilus*. Estes microrganismos, em forma planctônica e em biofilme, foram susceptíveis ao óleo de *Melaleuca* na presente pesquisa, dados estes que corroboram com outros estudos<sup>20, 24, 26, 56</sup>. Por meio do ensaio de XTT foi possível observar que o TTO diminuiu o metabolismo microbiano nos biofilmes, sendo a concentração de 2% a mais efetiva e apresentando diferença estatisticamente significativa do controle negativo após contato por apenas 60 s com esta solução. Entretanto, o TTO não alcançou o potencial antibacteriano da CHX 0.12% que obteve melhor desempenho em todos os testes para todos os biofilmes. A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro<sup>48, 60</sup>. Porém é importante destacar que sua atividade é dependente do pH<sup>43</sup> e tem sido apontada como a causa da seleção e persistência de algumas bactérias<sup>43, 50</sup>. Efeitos colaterais locais, como a pigmentação de dentes, restaurações e próteses,



ulceração da mucosa oral, alteração e percepção gustativa<sup>48, 60</sup> além de apresentar toxicidade à diferentes tipos celulares<sup>12, 34, 37</sup> são relatados na literatura.

Frente ao progresso na caracterização da propriedade antimicrobiana do TTO, existem poucos estudos sobre a toxicidade e segurança do óleo. Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da substância estudada, no Capítulo 2, diferentes concentrações de TTO foram analisadas sobre cultura de queratinócitos (HaCat). O presente trabalho demonstrou uma característica tempo e dose dependente do óleo também observado em outros estudos com diferentes tipos celulares<sup>26, 27, 28, 46, 55</sup>. As menores concentrações do TTO não foram tóxicas quando expostas pelo tempo de 60 s, podendo ser consideradas seguras para o uso. Dados recentes sugerem que o óleo de *Melaleuca* pode ser usado de forma diluída pela maioria dos indivíduos, sem causar efeitos adversos<sup>9, 21, 26</sup>. Neste trabalho a CHX 0.12% apresentou efeito tóxico à HaCat sendo este potencial citotóxico observado em outros estudos<sup>12, 34, 37</sup>. O ensaio de MTT identificou intensa redução de metabolismo celular semelhantes para CHX 0.12% e TTO 2% quando usadas pelo tempo de 60 s. A toxicidade do TTO é uma resposta funcional à exposição a uma mistura de diferentes componentes com diferentes características físico-químicas, sendo necessário mais estudos que avaliem capacidade tóxica tanto do óleo como de seus componentes<sup>6, 13, 26</sup>.

Como conclusão geral, considerando-se os resultados obtidos em cada estudo conjuntamente, o óleo de *Melaleuca* apresentou efeito antimicrobiano na concentração de 2% para as bactérias cariogênicas, porém esta concentração apresentou potencial tóxico à cultura de queratinócito. As concentrações mais

baixas de TTO, 0.12 e 0.25% não foram tóxicas e podem funcionar como agentes antimicrobianos de maneira segura contra os microrganismos orais que sejam susceptíveis a estas concentrações do óleo. Apesar de não apresentar um resultado tão satisfatório quanto a CHX 0.12%, o TTO mostrou ser capaz de reduzir o metabolismo de bactérias cariogênicas. O TTO é composto por aproximadamente 100 componentes sendo atribuído ao Terpinen-4-ol, presente entre 30% a 40% em sua composição, a atividade antimicrobiana do óleo<sup>8, 14</sup>. O presente estudo sugere a importância da investigar os componentes do óleo de *Melaleuca*, como o Terpinen-4-ol, isoladamente sobre estes microrganismos como alternativa a se encontrar uma solução com adequada atividade antimicrobiana e menor citotoxicidade.

# Referências



## REFERÊNCIAS\*

1. Almeida LSB, Murata RM, Santos MH, Koo H, Rosalen PL. Avaliação antimicrobiana da *Rheedia brasiliensis* sobre *Streptococcus mutans* em modelos planctônico e de biofilme. Braz Oral Res. 2005; 19: 97.
2. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. Phytother Res. 2010; 24: 673-9.
3. Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. Planta Med. 2011; 77: 54-6.
4. Brand C, Ferrante F, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, 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. 2001; 50: 213-9.
5. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). J Agric Food Chem. 1989; 37: 1330-5.
6. Cal K, Sznitowska M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes - in vitro studies. J Control Release. 2003; 93: 369-76.

---

\*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

7. Calderón SH, Gilbert P, Zeff RN, Gansky SA, Featherstone JD, Weintraub JA, et al. Dental students' knowledge, attitudes, and intended behaviors regarding caries risk assessment: impact of years of education and patient age. *J Dent Educ.* 2007; 71:1420-7
8. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 50-62.
9. Carson CF, Ridley TV. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. *Contact Dermatol.* 2001; 45: 65-7.
10. Castro SL. In vivo study efficacy of antiseptics on microaerobic microorganisms of the oral cavity. *Rev Dent.* 2001; 1:1-9.
11. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105: 327-32.
12. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 446-50.
13. Coutts I, Shaw S, Orton D. Patch testing with pure tea tree oil - 12 months experience. *Br J Dermatol.* 2002; 147: 70.
14. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91: 492-7.

15. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000, 88: 170-5.
16. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. Arch Oral Biol. 2006; 51: 15-22.
17. Featherstone JDB. The continuum of dental caries – evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004; 83: 39-42.
18. Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc. 2000; 131: 887-99.
19. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilm: emerging concepts in microbiol ecology. J Dent Res. 2010; 89: 8-18.
20. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 221-5.
21. Fletcher JP, Cassella JP, Hughes D, Cassella S. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. Int J Aromather. 2005; 15: 81-6.
22. Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action. Antiviral Res. 2011; 89: 83–8.

23. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65: 877-88.
24. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J.* 2002; 52: 433-7.
25. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 616-25.
26. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 389-92.
27. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.* 2000; 49: 619-26.
28. Hayes AJ, Leach DN, Markham JL. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *J Essent Oil Res.* 1997; 9: 575-82.
29. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interections in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88: 982-90.
30. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 589-95.

31. Koh KJ, Pearce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br J Dermatol.* 2002; 147: 1212-7
32. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 47-79.
33. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 343-7.
34. Lessa FCR, Aranha AMF, Nogueira I, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18: 50-8.
35. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G, Lupidi G, et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia.* 2009; 80: 313-9.
36. Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 34-9.
37. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999; 70: 1443-8.
38. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8: 263-71.



39. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149: 279-94.
40. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*. 2004; 38: 204-11.
41. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 7-15.
42. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006; 6:14.
43. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 147-79.
44. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol*. 2003; 47: 681-4.
45. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70: 461-77.
46. Nielsen JB. What you see may not always be what you get – Bioavailability and extrapolation from in vitro tests. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22: 1038-42.
47. Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol*. 2003; 37: 185-7.
48. Paraskevas, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg*. 2005; 3: 162-78.

49. Peña, CF. Melaleuca alternifolia oil – its for Trichomona vaginitis and other vaginal infections. *Obstet Gynecol.* 1962; 19: 793-5.
50. Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic resistant bacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2002; 31: 121-35
51. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Ver Oral Biol Med.* 2004; 15: 4-12.
52. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 201-22.
53. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.* 2009; 43: 229-37.
54. Socransky S. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28: 12-5.
55. Söderberg TA, Johanssonb A, Grefc R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology.* 1996; 107: 99-109.
56. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 61-4.
57. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. Current understanding of the epidemiology, mechanism and prevention dental caries in preschool children. *Pediatr Dent.* 2002; 24: 543-51.

58. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannouma MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 272-6.
59. Tsao N, Kuo CF, Lei HY, Lu SL, Huang KJ. Inhibition of group A streptococcal infection by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil concentrate in the murine model. *J Appl Microbiol*. 2010; 108: 936-44.
60. Twetman, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res*. 2004; 38: 223-9.
61. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48: 1-7.
62. Veien NK, Rosner K, Skovgaard G. Is tea tree oil an important contact allergen? *Contact Dermat*. 2004; 50: 378-9.

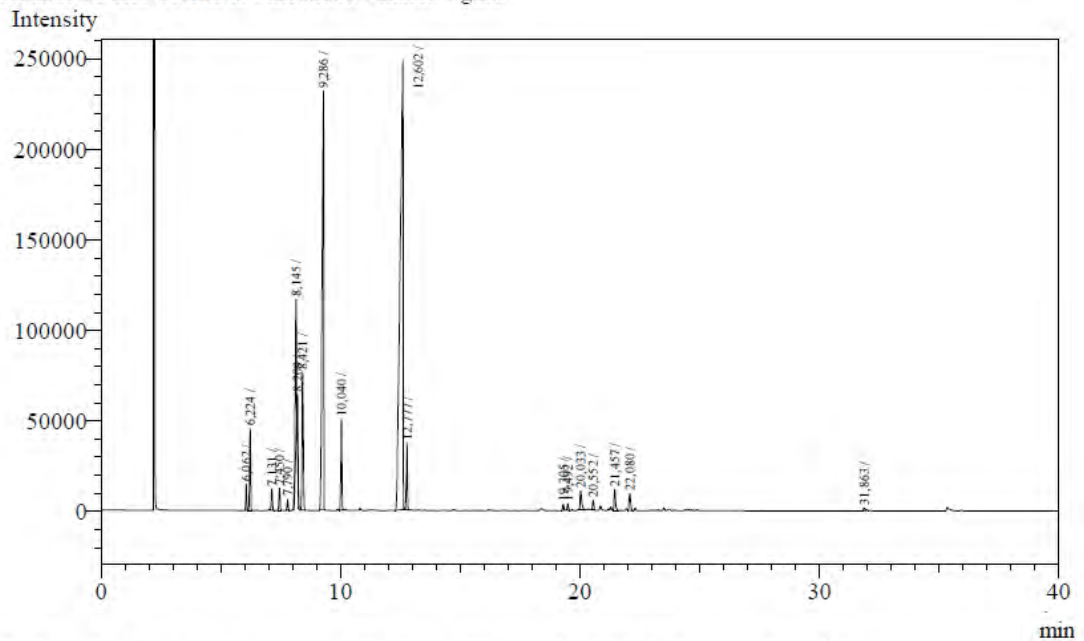
# Apêndices



## APÊNDICE 1 - Análise de cromatografia gasosa do óleo de *Melaleuca*.

Analysis Date & Time : 8/2/2011 09:17:58  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : 0802/2011 - Nicole  
 Sample ID : análise de melaleuca  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume :  
 ISTD Amount :

Data Name : C:\Paulo\nicole\ol-sigma.gcd  
 Method Name : C:\Paulo\aula\essencias\essencia.gcm  
 [Description]  
 HP 1 - 50  
 60(2), 5, 250 (15)-  
 Análise de óleo essencial - melaleuca- marca sigma



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.062	40355	14235	0.000			
2	6.224	126155	44937	0.000			
3	7.131	34649	11560	0.000			
4	7.450	38196	12248	0.000			
5	7.790	19289	5912	0.000			
6	8.145	228122	78984	0.000			
7	8.209	47240	31502	0.000			
8	8.421	286806	75107	0.000			
9	9.286	1048003	228511	0.000			
10	10.040	158230	49855	0.000			
11	12.602	2118097	247694	0.000			
12	12.777	115080	36660	0.000			
13	19.305	10640	3154	0.000			
14	19.492	13134	3615	0.000			
15	20.033	46815	10468	0.000			
16	20.552	18793	5335	0.000			
17	21.457	46516	11440	0.000			
18	22.080	39728	9351	0.000			
19	31.863	8156	1590	0.000			
<b>Total</b>		<b>4444004</b>	<b>882158</b>				

**APÊNDICE 2** - Tabela com apresentação das concentrações dos componentes do óleo de *Melaleuca* padronizados pela ISO 4730 e as concentrações obtidas pela análise de cromatografia gasosa do óleo de *Melaleuca* usado nesta pesquisa.

Componentes	Composição (%) ISO 4730, 2004	Composição (%) Cromatografia
Terpinen-4-ol	30-48	47
$\gamma$ -Terpinene	20-28	23
$\alpha$ -Terpinene	5-13	6
$\alpha$ -Terpineol	1,5-8	5
$\alpha$ -Pinene	1-6	2
1,8-Cineole	$\leq 15$	1

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 13 de outubro de 2011.

AMANDA FONTANA