

Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

Silva, S.R.S.¹; Demuner, A. J.^{1*}; Barbosa, L. C. A.¹; Andrade, N. J.²; Nascimento, E. A.³; Pinheiro, A. L.⁴,
¹Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) - Departamento de Química - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa - MG - CEP 36571-000, ²PQ Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, ³PQ Departamento Química, UFU, Uberlândia, ⁴PQ Departamento de Engenharia Florestal, UFV Viçosa, MG.

RESUMO: O presente trabalho visou avaliar a influência de diferentes métodos de secagem das folhas, do horário de coleta, e dos meses do ano sobre a composição química e o teor do óleo essencial em plantas de *Melaleuca alternifolia* crescidas em Viçosa-MG. Avaliou-se também a atividade antimicrobiana do óleo sobre microrganismos de interesse na indústria de alimentos, usando-se a técnica de difusão em disco. O óleo foi extraído por hidrodestilação, durante 3 horas. A identificação dos compostos foi feita empregando-se cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e os principais compostos identificados foram terpinen-4-ol (46,38%), 1,8-cineol (3,72%), γ -terpineno (9,74%), α -terpineol (4,35%) e p-cimeno (16,52%). O teor de óleo foi maior em amostras secas em sala climatizada, quando comparadas às secas em estufa. Houve variação no teor de óleo durante os meses do ano. Na avaliação da atividade antimicrobiana observou-se formação de halos de inibição para todos os microrganismos testados.

Palavras-chave: *Melaleuca alternifolia*, composição química, atividade antimicrobiana, plantas medicinais, óleos voláteis.

ABSTRACT: Analysis of the chemical composition and antimicrobial activity of the *Melaleuca alternifolia* Cheel essential oil. This work aimed to evaluate the influence of leaf drying methods, collection time and months on the chemical composition and essential oil content of *Melaleuca alternifolia* plants grown in Viçosa-MG. The antimicrobial activity of the oil was evaluated against microorganisms of interest for the food industry, using the disc diffusion technique. The oil was extracted by steam distillation during 3 hours. Compound identification was done by gas chromatography and mass spectrometry. The main compounds identified were terpinen-4-ol (46.38%), 1,8-cineole (3.72%), γ -terpinene (9.74%), α -terpineol (4.35%) and p-cimene (16.52%). Oil content was higher in samples dried in controlled-climate chambers when compared to those dried in an oven. There was a variation in oil content during the months of the year. The antimicrobial activity evaluation revealed the formation of inhibition halos for all the microorganisms.

Key words: *Melaleuca alternifolia*, chemical composition, antimicrobial activity, essential oil

INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam vários compostos biologicamente ativos, que na maioria das vezes, são produtos do metabolismo secundário e estão relacionados à interação da planta com o ambiente (Corrêa Júnior et al., 1994; Mann, 1995). Os óleos essenciais se destacam por apresentarem uma grande importância terapêutica e econômica (Costa, 1975; Finch et al., 1988). São separáveis por destilação de arraste a vapor e constituídos geralmente por terpenos e/ou fenilpropanóides. Estão armazenados em estruturas anatômicas como células oleíferas, cavidades e canais secretores ou em toda planta, sendo produzidos por pêlos ou tricomas glandulares, glândulas "spouting", ou células de óleo, e cavidades secretoras (Gottlieb & Salatino, 1987).

A composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém os fatores

ambientais podem causar variações significativas em seus componentes, sendo os monoterpenos e os sesquiterpenos, os compostos mais abundantes (Waterman, 1993). A época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal, também podem ter influência sobre a composição e o teor do óleo (Silva & Casali, 2000).

O gênero *Melaleuca* compreende mais de 250 espécies. A espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), conhecida popularmente como "tea tree", é uma árvore pequena de até 5 m, de casca fina, semelhante a folhas de papel, folhas afiladas de aproximadamente 20 mm de comprimento e floresce no verão. É nativa da costa nordeste, região de New South Wales, Austrália, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios (Riedl, 1997).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e bolores alteradores e/ou patogênicos (Penfold & Grant, 1925; Humphrey, 1930; Penfold & Morrison, 1937; Goldsbrough, 1939; Peña, 1962;

Recebido para publicação em 10/10/01
e aceito para publicação em 30/07/03.

Beylier, 1979; Belaiche, 1985). Tem sido utilizado como anti-séptico desde 1920, estando presente em formulações de vários produtos como shampoos, sabonetes, cremes dentais, anti-sépticos bucais, repelente de insetos, produtos veterinários, germicidas para condicionadores de ar, entre outros (Carson & Riley, 1993; Riedl, 1997).

O óleo essencial de *M. bracteata* F. Muell. possui atividade contra *Dermatophagoides pteronyssinus*, atuando também como regulador do crescimento radicular de rabanete (Yatagai et al., 1998). As cascas e folhas de *M. lecadendron* L., são utilizadas popularmente em Taiwan, como tranqüilizante e sedativo (Lee, 1998).

Folhas e ramos finos da espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel são utilizados na obtenção do óleo essencial empregado medicinalmente. Sua composição química tem sido extensamente estudada, sendo composta por uma mistura complexa de 97 monoterpenos e sesquiterpenos a maioria já identificados, sendo os principais constituintes os compostos terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos, representando cerca de 90% do óleo (Brophy et al., 1989; Murtagh & Smith, 1996).

Comercialmente, níveis de dois compostos são estipulados pelo padrão Australiano, de no mínimo 30% para terpinen-4-ol, responsável pela atividade antimicrobiana, e no máximo 15% para 1,8-cineol, que possui propriedades irritantes à pele (Carson & Riley, 1995). Vários quimiótipos têm sido descobertos entre os gêneros de *Melaleuca*, porém o óleo essencial de algumas espécies é inadequado para o uso medicinal (Carson & Riley, 1993; Ramanoelina et al., 1994). Os quimiótipos já identificados estão classificados de acordo com a porcentagem de 1,8-cineol presente no óleo, sendo chamados de "Type" os óleos que contém níveis de 1,8-cineol abaixo de 8%, "Variety A" os óleos que contém de 30-40% de 1,8-cineol e "Variety B" aqueles com 54-64% de 1,8-cineol (Homer et al., 2000).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de métodos de secagem das folhas, de horários distintos de coleta, e da variação sazonal sobre o teor e a composição química de óleo essencial *M. alternifolia*, crescida em Viçosa, MG. Avaliou-se também a atividade do óleo sobre o desenvolvimento de diversos microrganismos de interesse na indústria de alimentos.

MATERIAL E MÉTODO

Variação do teor e da composição química do óleo essencial de *M. alternifolia* durante os meses do ano.

As amostras para a determinação da

variação do teor e da constituição química do óleo essencial de *M. alternifolia* durante os meses do ano foram obtidas a partir de exemplar adulto, com aproximadamente 6 anos, localizado no setor de Dendrologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, no período de 21.12.1999 a 21.12.2000.

Para a avaliação inicial da composição química do óleo foram coletadas amostras em setembro de 1999 e comparadas com o óleo comercial produzido na Austrália (TABELA 2).

As folhas foram coletadas mensalmente, às 09:00 h, em diversos pontos da copa da árvore. Cada amostra foi subdividida em 3 partes de 100 g cada que em seguida foram secas em sala climatizada com desumidificador mantida a 26 °C e umidade relativa de 25% por um período de sete dias, quando então a massa do material seco foi determinada.

O material obtido foi submetido à extração do óleo essencial por um período de 3 horas, utilizando-se o aparelho de Clevenger. O óleo obtido foi recolhido com aproximadamente 50 mL de água e extraído com 3 x 50 mL de pentano. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão, a 40 °C. O óleo foi acondicionado em frascos de vidro e mantidos sob refrigeração à temperatura de 4 °C, até o momento da análise. Esse procedimento foi utilizado para as demais extrações citadas a seguir.

Análise cromatográfica

As amostras de óleo essencial foram analisadas por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se equipamento Shimadzu, modelo CG17A, com detector de ionização de chama (DIC) e auto injetor Shimadzu, modelo AOC17. A coluna cromatográfica foi do tipo sílica fundida, com fase estacionária DB-5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 microm de espessura do filme. O gás de arraste utilizado foi o Nitrogênio (N₂).

As temperaturas utilizadas foram 220 °C no injetor e 240 °C no detector. A programação da temperatura de realização das análises foi 60 a 240 °C, sendo acrescidos de 3 °C a cada minuto, e a vazão do gás de arraste foi 1 mL/minuto (Adams, 1995). Foi injetado 1 µL de cada amostra preparados a partir de 10 mg de óleo essencial e diluídos em 1 mL de pentano.

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massa da amostra, obtidos em aparelho Shimadzu, modelo QP 5000, com os existentes no banco de dados do equipamento (Willey 140.000) e também pelo índice de retenção relativo (Adams, 1995). As

condições cromatográficas utilizadas foram as descritas anteriormente, e as condições do detector de massa foram energia de impacto 70 eV, velocidade de varredura 1000, intervalo de varredura de 50 a 460 daltons. fragmentos detectados 45-450 μ . As amostras foram dissolvidas em pentano, na concentração de 10000 ppm, sendo injetado 1 μ L.

Os valores encontrados para o teor de óleo essencial nos experimentos de sazonalidade e horário de coleta foram analisados por meio de análise estatística descritiva, para a comparação dos dados.

Influência dos métodos de secagem das folhas sobre o óleo essencial

Para a avaliação da influência dos métodos de secagem sobre as características quantitativas e qualitativas do óleo essencial obtido de *M. alternifolia*, realizou-se a extração do óleo empregando-se a folha fresca, a folha seca em sala climatizada com umidade relativa de 25% e temperatura de 26 °C, e a folha seca em estufa a temperatura de 40 a 45 °C por 72 horas, sendo as amostras coletadas no mês de fevereiro de 2000. Depois de coletadas, as mesmas foram subdivididas em 7 partes de aproximadamente 15 g para cada modo de processamento. As amostras frescas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira a 4 °C até o momento da extração.

Influência do horário de coleta sobre o óleo essencial

A avaliação da influência do horário de coleta sobre o óleo essencial foi realizada em amostras coletadas no dia 21/06/2000, em plantas localizadas no setor de Dendrologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, de 2 em 2 horas, a partir das 7 horas e 30 minutos, até às 17 horas e 30 minutos perfazendo seis horários distintos ao longo do dia. Empregaram-se 4 amostras de aproximadamente 50 g de folhas frescas, em cada horário de coleta, sendo estas acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira a 4 °C até o momento da extração.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo obtido empregaram-se os microrganismos *Escherichia coli* K12, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas fluorescens* CCT3178 e

Listeria monocytogenes.

Manutenção e ativação dos microrganismos

As culturas puras destes microrganismos foram mantidas em refrigeração à 6 °C, em tubos 13 x 100 mm, contendo 5 mL de meio semi-sólido Brain Heart Infusion-Merck (BHI).

A ativação das culturas dos microrganismos foi feita empregando três repicagens sucessivas em caldo BHI na temperatura adequada de incubação para cada microrganismo (TABELA 1) por 24 horas. Efetuou-se a diluição do inóculo em tampão fosfato 0,31M, em pH 7,0 \pm 0,1, esterilizado a 121 °C/15 minutos. As diluições nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC/mL foram plaqueadas em profundidade, usando o meio Plate Count Agar (PCA-Merck). A incubação foi efetuada por 24 h, sendo a temperatura definida em função do microrganismo (TABELA 1).

TABELA 1 - Temperaturas de incubação dos microrganismos empregados na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Microrganismo	Temperatura (°C)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	35
<i>Escherichia coli</i> K12	35
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCT 3178	25
<i>Enterococcus faecium</i>	30
<i>Listeria monocytogenes</i>	37
<i>Bacillus cereus</i>	30

Avaliação da ação antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*

Avaliou-se a atividade antimicrobiana de uma amostra de óleo coletado às 9h e 30 minutos, em junho de 2000 de plantas crescidas em Viçosa, secas em sala climatizada e de uma amostra do óleo comercializado na Austrália, utilizado como padrão. Como controle, utilizou-se água destilada e esterilizada a 121 °C/15 minutos. Os experimentos foram conduzidos com 3 repetições, em triplicata. A concentração do inóculo foi de 10⁸ UFC/mL.

Empregou-se o método de difusão em disco de papel (Aureli, 1992; Collins, 1995). Discos de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 mL de óleo e deixados secar por aproximadamente 20 minutos. Alíquotas de 0,1 μ L da cultura ativada foram inoculadas usando-se a técnica do espalhamento superficial em ágar Mueller Hinton (Oxoid), adicionado em volumes de 20 mL a placas de Petri de 91 mm de diâmetro. Após a absorção dos microrganismos pelo meio, os discos contendo as amostras foram

TABELA 2 - Principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia* crescida em Viçosa, determinados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

Número do pico	Componente	MM	t _R (min.)	IK	Área %	Área %*
1	a-tujeno	136	9,748	901	0,90	0,83
2	a-Pineno	136	10,115	910	2,60	2,46
3	Sabineno	136	11,793	949	0,54	0,45
4	b-Pineno	136	12,027	954	0,79	0,66
5	b-Mirceno	136	12,389	963	0,36	0,86
6	a-Terpineno	136	13,753	994	1,91	9,56
7	p-Cimeno	134	14,133	1003	16,52	2,80
8	1,8 -Cineol	154	14,505	1012	3,72	3,87
9	g-Terpineno	136	15,772	1041	9,74	22,20
10	a-Terpinoleno	136	17,238	1076	1,96	3,45
11	Terpinen-4-ol	154	21,845	1182	46,38	37,93
12	p -Cimen-8-ol	150	21,967	1186	0,28	tr
13	a-Terpineol	154	22,339	1195	4,35	3,01
14	Trans-2-carene -4-ol	152	26,146	1285	1,23	-
15	Aromandendreno	204	34,516	1481	2,05	1,68
16	Ledeno	204	36,930	1545	1,50	-
17	a-Cadineno	204	37,971	1562	1,89	1,49

t_R - tempo de retenção; IK - índice de Kovats; MM - massa molecular; tr - traços; - porcentagem não citada na referência consultada; %* porcentagem típica encontrada nos óleos comerciais de *M. alternifolia* cultivada na Austrália (Brophy et al., 1989) - amostra coletada em setembro de 1999.

colocados sobre este as placas foram invertidas e incubadas à temperatura ideal de crescimento dos microrganismos (Tabela 1).

Na avaliação da sensibilidade microbiana ao óleo, utilizou-se um experimento fatorial 6x2 (seis microrganismos e duas amostras provenientes de Viçosa e Austrália), disposto no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram expressos empregando-se a média dos diâmetros dos halos de inibição observados, medidos com régua milimetrada, e que correspondem à região onde não houve crescimento dos microrganismos, devido à ação antimicrobiana do óleo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os principais componentes encontrados no óleo essencial das folhas *M. alternifolia* crescida em Viçosa, coletadas em setembro de 1999 e determinados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas estão apresentados na Tabela 2. As concentrações dos compostos α -tujeno (0,90%), α -pineno (2,60%), sabineno (0,54%), β -pineno (0,79%), 1,8-cineol (3,72%), terpinen-4-ol (46,38%), α -terpineol (4,35%) estão de acordo com os valores médios encontrados nos trabalhos consultados para a espécie avaliada. A maior concentração do composto p-cimeno (16,52%) pode estar relacionada à sua formação a

partir da oxidação do γ -terpineno (9,74%) e do α -terpineno (1,91%). Fatores extrínsecos como a luz e o ar, podem promover a oxidação dos terpinenos, resultando em maiores concentrações de p-cimeno. (Brophy et al., 1989).

O maior teor de óleo foi observado na amostra coletada às 9h e 30 minutos e o menor teor de óleo foi observado às 7h e 30 minutos (gráfico 1) o que pode estar relacionado à presença do orvalho ainda sobre as folhas, que contribui com o aumento da umidade e conseqüentemente da massa das folhas frescas. Neste horário a quantidade de material a ser extraído depois da secagem é menor, quando comparada às amostras coletadas nos demais horários, e portanto a quantidade de óleo obtida é

FIGURA 1 - Teor médio do óleo essencial de *M. alternifolia* obtido em diferentes horários de coleta

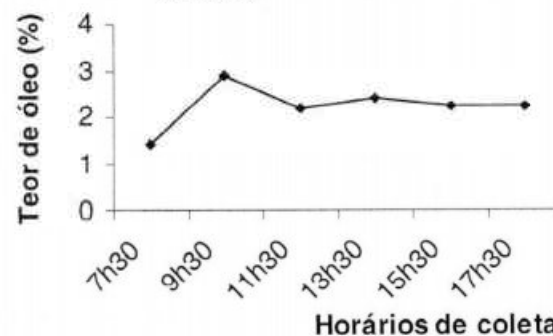


TABELA 3 – Variação da concentração (área %) dos principais constituintes do óleo essencial de *M. alternifolia* crescida em Viçosa nos horários de coleta avaliados em 21/06/2000

	γ -terpineno	1,8-cineol	terpinen-4-ol	p-cimeno	α -terpineol
7 h 30 min	10,26	0,33	52,33	10,07	3,40
9 h 30 min	16,71	1,33	50,43	5,15	3,15
11 h 30 min	16,31	0,68	53,47	7,83	3,41
13 h 30 min	16,68	1,20	52,02	5,81	3,36
15 h 30 min	15,63	1,33	51,08	7,68	3,27
17 h 30 min	15,60	0,89	49,76	6,17	3,18
	23*	5,1*	40,1*	2,9*	2,4*

* Brophy et al., 1989.

menor. Houve tendência de decréscimo no teor do óleo nas amostras coletadas às 11 h e 30 minutos, com variação nos horários seguintes, o que pode estar associado às perdas por volatilização. Na maioria das plantas medicinais o maior teor de óleos essenciais ocorre pela manhã, no entanto a colheita deve ser feita após evaporação do orvalho, pois o teor de óleo pode diminuir devido à maior umidade presente (Corrêa Júnior et al., 1994). Com o aumento da temperatura durante o dia, o teor de óleo tende a diminuir em algumas espécies, provavelmente por causa da volatilização (Simões & Spitzer, 1999).

A concentração dos principais componentes das amostras do óleo essencial de *M. alternifolia*, avaliadas nos horários de coleta citados acima, pode ser observada na Tabela 3. Tais concentrações encontram-se dentro da amplitude daquelas descritas para a espécie avaliada (Carson & Rilley, 1993; Brophy et al, 1989). Observa-se que os teores de γ -terpineno (10,26 a 16,71%) e 1,8-cineol (0,33 a 1,33%) estão menores que os citados por Brophy et al, 1989. Já as concentrações para as substâncias terpinen-4-ol (49,76 a 53,47%), p-cimeno (3,15 a 3,41%) e α -terpineol (5,15 a 10,07%) são superiores àquelas relatadas na literatura (Brophy et al, 1989). Estas variações não afetaram a qualidade do óleo, uma vez que os padrões australianos para a comercialização estabelecem que óleo de melaleuca deve possuir no máximo 15% de 1,8-cineol e no mínimo 30% de terpinen-4-ol (Carson & Rilley, 1995).

Os teores de óleo essencial encontrados nas plantas de Viçosa, nos três modos de processamento, variaram de 1,09 a 1,37% em relação à massa fresca (Tabela 4). As plantas de *M. alternifolia* cultivadas na Austrália contêm teores de óleo em torno de 1 a 3% em relação à massa fresca (Beylier, 1979). O teor de óleo extraído da amostra de folhas secas em sala climatizada não diferiu significativamente daquele obtido com as folhas frescas, sendo, porém maior que o teor de óleo obtido com as folhas secas em estufa. O menor teor de óleo das amostras secas em estufa indica que parte deste foi perdido por volatilização.

TABELA 4 - Valores médios do teor de óleo essencial de *M. alternifolia* obtidos de folhas secas em estufa (1), folhas frescas (2), e folhas secas em sala climatizada (3) na extração do óleo.

Tratamentos	Teor de óleo (%)*
Folhas secas em sala climatizada	1,37 a
Folhas frescas	1,20 ab
Folhas secas em estufa	1,09 c

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O teor de óleo foi calculado em relação à massa fresca inicial.

Os resultados mostram que o teor de óleo essencial em relação à massa fresca, obtido das plantas em Viçosa, está dentro dos valores encontrados nas plantas australianas. Em experimento semelhante, o processo de secagem não alterou o teor de óleo obtido em *M. alternifolia* cultivada em Queensland, Austrália (Whish & Williams, 1996). Em termos de composição, verifica-se que a secagem em estufa resultou, não apenas em menor teor de óleos, mas também em diferenças significativas na proporção dos cinco componentes majoritários (Tabela5).

Os resultados mostram que o óleo essencial da espécie estudada não necessita ser imediatamente extraído após a colheita, podendo ser a matéria prima previamente seca em sala climatizada, o que favorece a sua conservação e manuseio, trazendo deste modo, benefícios ao processamento industrial. A secagem das plantas reduz a ação de enzimas pela desidratação e de microrganismos alteradores e/ou patogênicos, permitindo sua maior conservação e aumentando o percentual de princípios ativos, devido à eliminação da água.

Nas amostras coletadas nos meses de dezembro/1999 a dezembro/2000 houve variação no teor de óleo, acentuando-se nos meses de junho e

TABELA 5 – Variação na concentração (área %) dos principais componentes do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nos três métodos de secagem avaliados

	γ -terpineno	1,8-cineol	terpinen-4-ol	p-cimeno	α -terpineol
Folhas frescas	16,71	1,33	50,43	5,15	3,15
Sala climatizada	18,43	1,39	47,37	5,08	2,94
Estufa	2,97	0,38	57,24	5,84	4,44
	23*	5,1*	40,1*	2,9*	2,4*

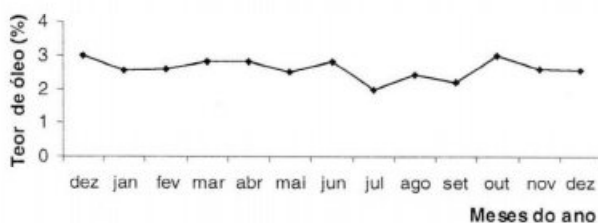
* variação observada no óleo essencial de *M. alternifolia* extraído de folhas frescas (Brophy et al., 1989).

TABELA 6– Variação na concentração (área %) dos principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia* durante os meses de dezembro/1999 a dezembro/2000.

	γ -terpineno	1,8-cineol	terpinen-4-ol	p-cimeno	α -terpineol
Dezembro	17,36	1,32	47,02	4,00	3,09
Janeiro	16,29	1,30	46,61	6,55	2,91
Fevereiro	18,16	1,31	47,63	5,10	2,98
Março	18,61	1,38	46,99	5,61	2,94
Abril	18,62	1,36	47,34	4,25	1,96
Mai	18,17	0,98	47,65	6,66	3,05
Junho	18,43	1,39	47,37	5,08	2,94
Julho	15,20	0,88	51,76	7,27	3,29
Agosto	16,04	1,36	50,70	7,31	3,17
Setembro	15,99	0,94	51,79	8,53	3,24
Outubro	17,23	1,74	44,79	6,72	4,07
Novembro	18,80	1,49	47,12	3,76	2,99
Dezembro	20,49	1,47	45,94	2,85	2,82
	23*	5,1*	40,1*	2,9*	2,4*

* Brophy et al., 1989.

GRÁFICO 2 – Variação no teor médio do óleo essencial de *M. alternifolia* durante os meses de dezembro/1999 a dezembro/2000.



outubro (Figura 2). As amostras coletadas nos meses de julho e setembro apresentaram os menores teores de óleo. As amostras coletadas em dezembro/1999 e outubro/2000 apresentaram os maiores teores de óleo. A tendência de decréscimo no teor de óleo nos meses de julho a setembro pode estar relacionada às menores temperaturas deste período ou à época de floração da espécie.

Em períodos mais frios, a proporção de folhas em *M. alternifolia* é menor, logo a produção de óleo essencial pode diminuir. A atividade de insetos também é menor em períodos mais frios,

portanto a necessidade de produção de metabólitos de defesa, como os óleos essenciais, é menor (Murtagh, 1996). Na época da floração há maior consumo de energia, que é destinada à formação dos botões florais e frutificação, o que pode levar à diminuição do teor de óleo essencial em algumas espécies (Waterman, 1993).

A concentração dos cinco principais componentes durante os 12 meses do ano encontra-se na Tabela 6. Observa-se pequena variação nos teores dos mesmos ao longo do ano, sendo que as concentrações dos compostos economicamente significativos terpinen-4-ol e 1,8-cineol, mantiveram-se dentro dos limites exigidos para comercialização do óleo (maior que 30% para terpinen-4-ol e menor que 15% para 1,8-cineol) (Homer et al., 2000). Pode-se concluir que não houve influência do mês de coleta sobre a concentração dos principais componentes do óleo; resultado semelhante foi observado por Murtagh & Smith, 1996. De acordo com Homer et al., 2000, a composição química do óleo essencial de *M. alternifolia* é mais afetada por fatores genéticos que por fatores ambientais.

TABELA 7 - Valores médios para o tamanho do halo (mm) observado na superfície do meio Mueller Hinton, devido à ação antimicrobiana do óleo de *M. alternifolia* extraído em Viçosa e do comercializado na Austrália.

Microrganismos	Antimicrobiano	
	Óleo de Viçosa	Óleo da Austrália
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11,67 ABa	8,33 BCb
<i>Bacillus cereus</i>	11,50 ABa	8,33 BCb
<i>Escherichia coli</i> K12	12,43 ABa	10,73 ACa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,17 ABa	12,70 ACa
<i>Enterococcus faecium</i>	11,33 ABa	9,53 BCb
<i>Listeria monocytogenes</i>	9,77 Ba	7,77 Cb

Médias, na mesma coluna, seguidas da mesma letra maiúscula, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A amostra utilizada para a realização dos testes antimicrobianos apresentou 18,43% de g-terpineno, 47,37% de terpinen-4-ol, 1,39% de 1,8-cineol, 5,08% de p-cimeno e 2,94% de a-terpineol. A combinação dos compostos que exibem a melhor atividade antimicrobiana tem sido muito estudada e a proporção ideal de cada componente não está claramente estabelecida (Carson & Riley, 1993). No entanto, a contribuição de cada componente na ação antimicrobiana depende de sua concentração e de interações sinérgicas e/ou antagônicas que ocorrem entre eles. A atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol é comprovada contra vários microorganismos, sendo que maiores quantidades deste componente estão associadas a melhores atividades antimicrobianas (Penfold & Grant, 1925; Carson & Riley, 1995). O p-cimeno não exibe atividade antimicrobiana (Carson & Riley, 1995).

No experimento conduzido houve diferença de ação antimicrobiana entre as duas amostras de óleo avaliadas sobre os microrganismos *P. fluorescens*, *B. cereus*, *E. faecium* e *L. monocytogenes* (Tabela 7). Nos microrganismos *E. coli* K12 e *S. aureus* ATCC25923, os valores dos halos de inibição observados foram semelhantes nas duas amostras avaliadas. Em relação aos microrganismos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Apesar de não ter sido realizada a avaliação antimicrobiana dos principais componentes do óleo separadamente, a amostra obtida das plantas crescidas em Viçosa possui concentração de terpinen-4-ol e dos principais componentes semelhante ao óleo australiano e os resultados obtidos confirmam o observado na literatura (Carson & Riley, 1995), onde os óleos com maiores teores de terpinen-4-ol apresentam melhores atividades antimicrobianas.

Os resultados dos experimentos realizados indicam que o óleo essencial de *M. alternifolia* crescida em Viçosa possui características químicas e microbiológicas

semelhantes às do óleo australiano, dando-nos uma perspectiva promissora para o cultivo e extração do óleo essencial desta espécie no Brasil. As variações observadas nas concentrações de alguns componentes podem estar relacionados à influência de vários fatores, entre eles variações ambientais e sazonais.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo, (SRSS) e de pesquisa (LCAB, AJD, NJA) e pelo apoio financeiro. À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelo fornecimento das cepas empregadas neste trabalho.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 469p.
- AURELI, P., COSTANTINI, A., ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, p.344-8, 1992.
- BELAICHE, P. Traitment des Infections Cutaneus par L' Huille essentielle de *Melaleuca alternifolia*. **Phytotherapy**, v. 15, p. 15-6, 1985.
- BEYLIER, M. F. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. **Perfumes and Flavourist**, v. 4, p. 23-5, 1979.
- BROPHY, J. J., DAVIES, N. M., SOUTHWELL, I. A., et al. Gas chromatography quality control for oil of melaleuca terpin-4-ol-type (Australian tea tree). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 37, p. 1330-5, 1989.
- CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letter in Applied Microbiology**, v. 16, p. 49-55, 1993.
- CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca*

- alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 264-9, 1995.
- COLLINS, C. H., LYNE, P. M., GRANGE, J. M.. **Microbiological methods**, 7 ed. London: Butterworth-Heinemann, 1995. 493p.
- CORREA JÚNIOR, C., MING, L. C., SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.162p.
- COSTA, A. F.. **Elementos da Flora Aromática: o Laboratório de Farmacognosia no Estudo dos óleos Essenciais de Portugal e Angola**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1975. 294p.
- FFINCH, D. M. **tea tree oil- antibacterial activity and clinical Uses**. Local: Australian Tea Tree Estates PTY, 1988, p.1-41.
- GOLDSBROUGH, R. E. **Ti- Tree Oil. The Manufacturing Chemist**, p. 57-60, Feb., 1939.
- GOTTLIEB, O. R., SALATINO, A. **Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras Ciência e Cultura**, v.39, p.707-16, 1987.
- HOMER, L. E., LEACH, D.N., LEA, D., et al. **Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 367-82, 2000.
- HUMPHREY, E. M.. **A new Australian Germicide. Medical Journal of Australian**, n. 1, p. 417-8, 1930.
- LEE, C. K. **A new Norlupene from the leaves of *Melaleuca leucadendron*. Journal Natural Products**, v. 68, p. 375-6, 1998.
- MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2. Ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1995. 374p.
- MURTAGH, G. J., SMITH, G. R. **Month of harvest and yield components of tea tree. II. Oil concentration, composition, and yield. Australian Journal Agricultural Research**. v. 47, p. 817-27, 1996.
- MURTAGH, G. J. **Month harvest and yield components of tea tree. I. Biomass. Australian Journal Agricultural Research**, v. 47, p. 801-15, 1996.
- PEÑA, E. F. ***Melaleuca alternifolia* oil- its use for Trichomonal vaginitis and other vaginal infections. Obstetrics and Gynecology**, v. 19, p. 793-5, 1962.
- PENFOLD, A. R., GRANT, R.. **The Germicidal values of some Australian essential oil and their pure constituents. Journal Processing Royal Society** v. 59, p. 346-50, 1925.
- PENFOLD, A. R., MORRISON, F. R. **Some notes on the Essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Australian Journal Pharmaceutical**, v. 52, p. 274-5, 1937.
- RAMONOELINA, P. A. R., VIANO, J., BIANCHIN, P. J. et al. **Occurrence of various chemotypes in niauli (*Melaleuca quinquenervia*) essential oils from Madagascar usiny multivariate statistical analysis. Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1177-82, 1994.
- RIEDL, R. W. **Practical methods for using tea tree oil. Agro-Food Industry Hi-Techology**. p. 34-6 set/oct, 1997.
- SILVA, F., CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós colheita e óleos essenciais**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000. 135p.
- SIMÕES, C. M. O., SPTIZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 821p.
- WATERMAN, P. G. **The chemistry of volatile oils**. In HAY, R. K. M., WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Lorigman Group, 1993. cap 3, p. 47-61.
- WHISH, J. P. M., WILLIAMS, R. P. **Effects of post harvest drying on the yield tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). Journal Essential Oil Research**, v. 8, p. 47-51, 1996.
- YATAGAI, M., OHIRA, T., NAKASHIMA, K. **Composition miticidal activity and growth regulation effect on radish seeds of extracts from *Melaleuca* species. Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 713-22, 1998.