

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre isolado clínico de *Candida albicans*

Evaluation of the antifungal activity of Melaleuca alternifolia Cheel essential oil on clinical isolate of Candida albicans

Recebido em: 27/04/2021

Aceito em: 05/07/2021

Elisa Castellani SAVANI¹; Carolina Pasquini Praxedes SALVI²;
Adriana de MELO¹; Ademir SALVI JÚNIOR¹

¹Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UniPinhal).
Av. Hélio Vergueiro Leite, s/n, Jardim Universitário, CEP 13.990-000.
Espírito Santo do Pinhal, SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). R. Tessália Vieira de Camargo, 126,
CEP 13083-887. Cidade Universitária, Campinas, SP, Brasil.
E-mail: salvi_fcfar@yahoo.com.br

ABSTRACT

Yeasts of the *Candida* genus are of great importance due to the high frequency with which they colonize and infect the human host, being the species *C. albicans* the most common. The search for natural products that present an efficient antifungal action against microorganisms proves to be an alternative for the control of infections. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) has proven antimicrobial action against bacteria and fungi and has been appointed as an option for the treatment of fungal infections caused by *Candida* genus. The objective of this work was to verify the antifungal activity, at different concentrations, of the commercial essential oil of *M. alternifolia* against a strain of clinical isolate of the species *C. albicans*. For the evaluation of antifungal activity, concentrations of 5 to 100% of the pure essential oil of *M. alternifolia* were used in antimicrobial susceptibility tests by disk diffusion method, according to the norm established by the Clinical and Laboratory Standards Institute, with modifications. According to the results obtained, the essential oil showed activity, inhibiting the growth of the microorganism, forming an inhibition halo from the concentration of 25%, with a variation from 3 to 17 mm. Thus, it can be said that the strain of the clinical isolate evaluated showed sensitivity to the essential oil of *M. alternifolia*, which demonstrates a good antimicrobial potential of the studied oil, arousing great pharmaceutical interest.

Keywords: disk diffusion antimicrobial tests; melaleuca; tea tree oil; antifungal agents; *Candida albicans*; phytotherapy.

RESUMO

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, sendo a espécie *C. albicans* a mais comum. A busca por produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente frente a microrganismos se mostra uma alternativa para o

controle de infecções. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, e tem sido apontado como uma opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antifúngica, em diferentes concentrações, do óleo essencial comercial de *M. alternifolia* contra cepa de isolado clínico da espécie *C. albicans*. Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas concentrações de 5 a 100% do óleo essencial puro de *M. alternifolia* em testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão, segundo norma estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com modificações. De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial apresentou atividade, inibindo o crescimento do microrganismo, com a formação de halo de inibição a partir da concentração de 25%, com variação dos halos de 3 a 17 mm. Dessa forma, pode-se dizer que a cepa do isolado clínico avaliada apresentou sensibilidade ao óleo essencial de *M. alternifolia*, o que demonstra potencial antimicrobiano do óleo estudado, despertando grande interesse farmacêutico.

Palavras-chave: testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão; melaleuca; óleo de melaleuca; antifúngicos; *Candida albicans*; fitoterapia.

INTRODUÇÃO

As leveduras são capazes de colonizar os seres humanos e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas (1). A incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado crescente (2). As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência, com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (3). *Candida albicans* é, sem dúvida alguma a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Trata-se de levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (4).

Um limitado número de agentes antifúngicos está disponível para tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* (5). *Candida* sp. têm se mostrado resistentes diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos sintéticos (6,7).

A resistência do gênero *Candida* ao tratamento com antifúngicos tem sido atribuída a episódios

recorrentes da infecção e exposição intermitente e continua aos antifúngicos (8). Assim, devido a diminuição da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos convencionais, ocorre um aumento no interesse em utilizar produtos de origem natural com ação antifúngica com vistas a reduzir o tempo de tratamento e os efeitos colaterais, bem como a diminuição da susceptibilidade, espectro de ação e toxicidade (9,10). Desta forma, a busca de produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente frente a microrganismos resistentes se mostra uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* (5,6,10-13).

A utilização dos óleos essenciais como substância antimicrobiana se justifica pelo menor custo e menor resistência microbiana, sendo possível o seu emprego como agentes terapêuticos (14,15). Os relatos da literatura sobre tais produtos ainda são escassos, de modo que se verifica a necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica, com o objetivo de justificar e validar o uso clínico dos óleos essenciais (15).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos ou não (16), e tem sido apontado como uma opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, apresentando efeito

antifúngico significativo (17,18). Constituído principalmente por terpenoides – terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos – que representam cerca de 90% do óleo essencial (19) – tem sido investigado quanto as suas propriedades farmacológicas. Um dos componentes, reconhecidamente ativo, presente no óleo de melaleuca, o terpinen-4-ol, é o principal responsável pela ação terapêutica. (20). Apresenta ação antifúngica em leveduras do gênero *Candida* por alteração da permeabilidade da membrana, ocorrência de acidificação do meio devido a expulsão de prótons, sugerindo provável dano a membrana mitocondrial (21,22).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antifúngica de diferentes concentrações do óleo essencial comercial de *Melaleuca alternifolia* contra cepa de isolado clínico da espécie *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODO

Para a avaliação da atividade antifúngica frente a *Candida albicans* foram utilizados o óleo essencial puro e diluições do óleo essencial de *M. alternifolia*, em testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão segundo Norma M2-A8 (23) do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com modificações.

O óleo essencial puro de *M. alternifolia* foi obtido comercialmente em farmácia de manipulação no município de Pedreira, SP. Para a realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, as concentrações utilizadas foram de 5 a 100% do óleo essencial, sendo: 5%, 10%, 25%, 40%, 60%, 80% e 100%, diluídas em óleo vegetal de amêndoas (Leclerc Industrial Ltda; lote: 3298/A).

Foram empregadas cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231), como controle, e cepa de isolado clínico de *C. albicans*, pertencentes à micoteca do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – UniPinhal.

A suspensão fúngica foi preparada a partir de uma cultura em crescimento decorrida de 24/48

horas em ágar batata (em tubo inclinado) a temperatura de 37° C. Uma alíquota desse cultivo foi transferida para um tubo contendo solução salina até atingir uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. A densidade óptica da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro, com absorvância em 625 nm, na faixa de 0,08 a 0,13, correspondente a uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Placa de ágar Sabouraud dextrose (10), uniformemente sobre toda a superfície, foi inoculada com 500 μ L da suspensão do microrganismo previamente preparada, com auxílio de *swab* estéril. Posteriormente, foram aplicados os discos impregnados com as amostras testes e controles firmemente na superfície da placa de ágar inoculada. Para a impregnação dos discos foi utilizado um volume de 20 μ L (individualizados) nas concentrações de 5 a 100% do óleo essencial de melaleuca, óleo vegetal de amêndoas como controle negativo e nitrato de miconazol (20 mg/mL) como controle positivo (9,10). As placas foram incubadas em posição invertida por 24/48 horas à temperatura de 37° C. Ao término da incubação, as placas foram submetidas à leitura, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros usando um paquímetro, pela parte de trás da placa invertida, iluminando-a com luz refletida em um fundo não refletor.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram transpostos para o *software Excel*® e expressos de acordo com o termo utilizado e, representados pela média das triplicadas biológicas independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas medicinais com atividades antibacterianas e antifúngicas vêm sendo pesquisadas com o objetivo de serem utilizadas na terapêutica e, conseqüente produção de novos produtos fitoterápicos, que possam vir a ser utilizadas como fonte potencial de medicamentos antimicrobianos com ação sobre microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos já utilizados (24). O óleo essencial de *M. alternifolia* tem sido investigado quanto as suas propriedades farmacológicas como a sua ação

antifúngica em leveduras, como o efeito na alteração da permeabilidade da membrana e fluidez em *C. albicans* (18,21).

O método de disco-difusão em ágar foi utilizado por permitir resultados seguros, pela formação de halos de inibição, sendo um dos métodos mais citados e utilizados na literatura na avaliação da atividade antimicrobiana de derivados vegetais (23).

Os resultados dos ensaios realizados com o óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações de 5 a 100% podem ser observados pela leitura dos

halos de inibição formados, ao redor dos discos impregnados com as dadas amostras, pela inibição do crescimento das cepas de *C. albicans*, tanto da cepa padrão ATCC 10231 quanto da cepa do isolado clínico, conforme representados na Tabela 1. Cabe salientar que o óleo vegetal de amêndoas, utilizado nas diluições do óleo essencial de *M. alternifolia*, foi testado, como controle negativo, e não foi observada atividade antifúngica desse frente às cepas em questão, e as cepas apresentaram sensibilidade ao nitrato de miconazol (20 mg/mL) testado, como controle positivo.

Tabela 1. Halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nas concentrações de 5 a 100% do óleo essencial, e controles positivo e negativo, frente à cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231), como controle, e cepa de isolado clínico de *C. albicans*, pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão segundo Norma M2-A8 (23).

Amostras	Controle (-) ¹	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> halo de inibição ² (mm)							Controle (+) ³
		5%	10%	25%	40%	60%	80%	100%	
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	0	0	0	05 ± 1	08 ± 1	12 ± 3	15 ± 2	20 ± 2	38 ± 2
<i>C. albicans</i> (isolado clínico)	0	0	0	03 ± 0	06 ± 1	10 ± 2	11 ± 2	17 ± 2	35 ± 3

¹ Controle negativo: óleo vegetal de amêndoas.

² Valor médio e desvio padrão dos halos de inibição (mm) formados pelas cepas de *C. albicans*.

³ Controle positivo: nitrato de miconazol (20 mg/mL).

De acordo com os resultados obtidos para a ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* (Tabela 1), em concentrações do óleo essencial inferiores a 10%, não houve interferência no crescimento de micro-organismos. O óleo essencial apresentou atividade, inibindo o crescimento dos microrganismos, com a formação de halos de inibição a partir da concentração de 25%, observando-se a partir dessa concentração uma relação de atividade antimicrobiana concentração dependente, pela formação dos halos de inibição apresentados, com variação dos halos de inibição de 5 a 20 mm para a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231), e de 3 a 17 mm para a cepa do isolado clínico de *C. albicans*. Dessa forma, pode-se dizer que a cepa do isolado clínico avaliada apresentou sensibilidade

de, embora inferior a cepa padrão, ao óleo essencial de *M. alternifolia*.

Os diâmetros dos halos de inibição formados pela análise do óleo essencial testado, mesmo em sua maior concentração, apresentaram-se com diâmetros inferiores aos observados com o medicamento utilizado como controle positivo, o nitrato de miconazol a 2% (20 mg/mL). A inibição do óleo essencial de *M. alternifolia* não tenha sido maior pelo fato dos componentes de maior atividade antimicrobiana, como os terpenoides, possuírem baixa solubilidade em meio aquoso, impedindo a disseminação pelo ágar e o contato físico com o micro-organismo em teste (10).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre o isolado clínico de *C. albicans*

apresentada neste trabalho corrobora os achados da literatura. Entretanto, não é possível comparar os resultados encontrados no presente estudo com os obtidos por outros trabalhos, pois são empregadas metodologias diferentes, e a composição do óleo essencial pode variar, dependendo do local de plantio, condições de cultivo e época de colheita (10).

Costa e cols. (2006) avaliaram, pelo método de difusão em ágar, a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* frente a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) e cepas de *C. albicans* clínicas isoladas de pacientes hospitalizados com suspeita clínica de infecção nosocomial (9). Para a cepa padrão, os resultados apresentaram a formação de halo a partir da concentração de 40% e a variação do halo foi de 8 a 21 mm. Para as cepas isoladas, os resultados apresentaram susceptibilidade a partir da concentração de 30%, sendo que o tamanho dos halos variou de 7 a 20 mm. Em um outro trabalho, para a investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia*, foram avaliadas cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) e cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas, com candidíase oral, por meio da técnica de difusão em ágar (10). Todas as cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal no volume de 20 µL, apresentaram halos de inibição a partir da concentração de 50%, com variação dos halos de 8 a 16 mm e para o volume de 50 µL, 3 cepas de *C. albicans* apresentaram halos de inibição a partir da concentração de 30%, as outras 4 cepas, a partir da concentração de 40%, com variação de diâmetro de 4 a 17 mm.

Embora a inibição do crescimento antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia*, tenha sido evidenciada, neste trabalho, na concentração de óleo a 25%, não se pode dizer que esta seja a concentração inibitória mínima para o microrganismo testado. Para se obter essa informação, seria necessário testar a faixa de concentração do óleo de 10 a 25%.

Estudos realizados, com o gênero *Candida*, têm mostrado concentração inibitória mínima para o óleo essencial de *M. alternifolia* superior aos antifúngicos convencionais como fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B (25-27).

Ao determinar a CIM do óleo essencial de *M. alternifolia* frente a cepas de *C. albicans*, Oliva e

cols. (2003), Mondello e cols. (2003) e Hammer e cols. (2003) identificaram ação inibitória entre as concentrações 0,06% e 0,5% (25-27). Hammer e cols. (2003) ainda verificaram atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* em concentrações inferiores a 1%, o que indica forte potencial antimicrobiano (25). Martinet e cols. (2008) avaliaram a susceptibilidade para cepas de *C. albicans*, isoladas de secreção vaginal de pacientes gestantes, HIV negativas e positivas, frente ao óleo essencial de *M. alternifolia*, por meio da técnica de microdiluição em caldo, e obtiveram valores de CIM que variou de 0,19 a 1,56% (28), enquanto Cavalcanti e cols (2011) determinaram a CIM do óleo essencial de *M. alternifolia*, sobre cepas de *C. albicans* (ATCC 289065 e ATCC 40277), e identificaram ação inibitória nas concentrações de 2,25 e 9,0, respectivamente (15).

Como os óleos essenciais são misturas complexas de várias substâncias, a atividade antifúngica observada não pode ser atribuída a uma substância isolada, mas ao conjunto delas. A composição química, tem um papel importante na atividade antimicrobiana e essa atividade pode ser potencializada (29) ou diminuída de acordo com a concentração de cada fitoconstituente.

As variações referentes à determinação da atividade antifúngica de derivados de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas, a quantidade de extrato testada (30) e o diluente da substância analisada.

Dessa maneira é difícil estabelecer uma correlação entre os estudos, principalmente pelo fato de não existir ainda, uma metodologia padronizada para avaliação de atividade antifúngica de produtos naturais (10).

A metodologia empregada neste estudo demonstrou a existência de atividade antifúngica do óleo testado. Há necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* com o objetivo de consolidar o seu uso clínico. Estudos subsequentes devem considerar a avaliação da atividade antifún-

gica diante de cepas clínicas e outras linhagens padronizadas, empregando técnicas que considerem o isolamento de fitoconstituintes, a aderência celular e a toxicologia desses produtos (15).

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou atividade antifúngica a partir da concentração de 25% frente ao patógeno *C. albicans*. Os resultados demonstram potencial antimicrobiano do

óleo estudado, despertando grande interesse farmacêutico.

Verifica-se a necessidade de aprofundar os estudos com a realização de testes com metodologias mais sensíveis com o objetivo de comparar e validar o uso clínico desse óleo.

Contudo, faz-se necessário a padronização de metodologias para avaliação de atividade antimicrobiana de produtos naturais para que se possam obter resultados seguros e correlacionar os estudos de forma mais efetiva.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013.
- Macêdo DPC, Farias AMA, Lima Neto RG, Silva VKA, Leal AFG, Neves RP. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009;42(2):188-191. DOI: 10.1590/S0037-86822009000200019.
- Silva VCS. Avaliação antimicrobiana de anti-sépticos bucais e antifúngicos sobre *Candida spp.* isoladas na saliva de pacientes oncológicos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo. 2009.
- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. Candida. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA. Medical Mycology. 1st. Ed. Filadélfia: Churchill Livingstone. 2003.
- Pozzatti P. Suscetibilidade de *Candida spp* resistentes e sensíveis ao fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos. [Dissertação]. Santa Maria: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. 2007.
- Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. Clin. infect. dis. 2000;30(4):662-678. DOI: 10.1086/313749.
- Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules. 2009;14(2):586-597. DOI: 10.3390/molecules14020586.
- Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcantara AP et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from aids patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002;97(2):253-257. DOI: 10.1590/S0074-02762002000200019.
- Costa ACBP, Teodoro GR, Ferreira TM, Silva FS, Maria A, Beltrame Junior M, Khouri S. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) sobre leveduras isoladas de pacientes hospitalizados. In: Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. 2006. Universidade do Vale do Paraíba. Rev. Univap. 2006;13(24):241-244.
- Costa ACBP, Teodoro GR, Ferreira TM, Silva FS, Maria A, Khouri S. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal em gestantes HIV positivas. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2010;69(3):403-407.
- Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev. Bras. Farmacogn. 2006;16(2):197-201. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000200011.
- Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. Mycoses. 2010;53(1):12-15. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01643.x.
- Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* Rev. odontol. UNESP. 2010;39(3):179-184.
- Bertini, LM, Pereira AF, Oliveira CLL, Menezes EA, Morais SM, Cunha FA, Cavalcanti ESB. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. Infarma, 2005; 17(3/4):80-83.
- Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. Rev. Odontol. Bras. Central. 2011;20(52): 68-73.

16. Garcia CC, Germano C, Osti MN, Chorilli M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009; 90(3):236-240.
17. 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. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x.
18. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules.* 2001; 6:87-91. DOI: 10.3390/60100087.
19. Oliveira Y. Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betche) Cheel. [Dissertação]. Curitiba: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná. 2009.
20. Diniz APB, Nascimento SCC, Rocha LB, Ferreira LA. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de preparações tópicas contendo óleo de melaleuca para o tratamento da acne. *Revista de Iniciação Científica Newton Paiva.* 2006/2007:13-30.
21. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;53:1081-1085. DOI: 10.1093/jac/dkh243.
22. Silva CJ, Barbosa LCA, Maltha CRA, Pinheiro AL, Ismail FMD. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Fragr. J.* 2007;22:474-478. DOI: 10.1002/ffj.1823.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard – 8th. ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Pennsylvania: Wayne; 2003.
24. Rasteiro VMC. Efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* – estudo *in vitro* e *in vivo*. [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista. 2011.
25. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* 2003;95(8):853-860. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x.
26. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;51(3):1223-9. DOI: 10.1093/jac/dkg202.
27. 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(2):185-187. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01375.x.
28. Martinet AS, Muniz RS, Teodoro GR, Khouri S. Estudo da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* em amostras obtidas de candidose vaginal em gestantes. In: XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e II Encontro de Iniciação Científica Júnior. 2008. São José dos Campos: UNIVAP, 2008:1-4.
29. Naghetini CC. Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma. [Dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.
30. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;18(2):301-307. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000200026.