

Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal

Ana V. M. Castelo¹, Sandra R. Afonso², Rafael R. de Melo³,
Cláudio H. S. Del Menezzi¹, Julcéia Camillo¹ & Roberto F. Vieira⁴

¹ Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, CEP 70904-970, Brasília-DF, Brasil. Caixa Postal 04357. E-mail: vri84@yahoo.com.br; cmenezzi@unb.br; julceia@gmail.com

² Serviço Florestal Brasileiro, Gerência de Florestas Comunitárias, L4 - Sede do IBAMA, Asa Norte, CEP 70818-900, Brasília-DF, Brasil. E-mail: afonsandra@gmail.com

³ Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Avenida Alexandre Ferronato, 1200, Distrito Industrial, CEP 78550-000, Sinop-MT, Brasil. E-mail: rrmelo2@yahoo.com.br

⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, final W3 Norte, Asa Norte, CEP 70770-900, Brasília-DF, Brasil. Caixa Postal 02372. E-mail: roberto.vieira@embrapa.br

RESUMO

Esse trabalho objetivou analisar o efeito da variação circadiana e da parte da planta sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial da espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel. Para avaliar o efeito das variações climáticas diárias foram feitas coletas nos períodos matutino e vespertino. As extrações dos óleos essenciais foram realizadas pela técnica de destilação por arraste de vapor separadamente das folhas e das folhas e ramos. A análise química visando à identificação e quantificação dos compostos dos óleos essenciais extraídos foi feita através da técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Entre os dois períodos analisados o turno da tarde mostrou ser mais propenso (0,48% vs 0,34%) para a produção de óleo essencial na espécie, tendo maior rendimento e usando, como material, somente as folhas (0,47% vs 0,36%). Já na composição química foi possível observar que não houve variação significativa entre os períodos analisados, nem entre as composições de amostras enquanto o composto mais abundante foi o terpinen-4-ol.

Palavras-chave: ciclo circadiano, *Melaleuca alternifolia*, óleo essencial

Yield and chemical composition of essential oil from Melaleuca alternifolia Chell grown in Federal District, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of circadian variation and plant part in yield and chemical composition of essential oil from *Melaleuca alternifolia* Cheel. Leaves and entire bush were collected in the morning and afternoon. Afterwards, the extraction was conducted using the steam distillation method. Chemical analysis for identification and quantification of compound was run using gas-chromatography-mass spectrometry. According to the results, for yield the afternoon period was considered the most suitable period for oil extraction (0.48% vs 0.34%) using only leaves (0.47% vs 0.36%). On the other hand, for the chemical composition no difference was detected between day period and plant part.

Key words: circadian variation, *Melaleuca alternifolia*, essential oil

INTRODUÇÃO

A *Melaleuca alternifolia* Chell, conhecida comumente como *tea tree*, é uma planta da família Myrtaceae nativa da costa subtropical nordeste australiana (Silva et al., 2002) muito conhecida e utilizada pelo homem. Apresenta aspecto longilíneo com tronco esbelto e folhas longas e pontiagudas que, com a quebra ou maceração, liberam substâncias voláteis. Seu óleo essencial foi descoberto por Penfold e Grant em 1920 (Riedl, 1997), mas há séculos os aborígenes utilizam suas folhas maceradas para o tratamento antimicrobiano (Castro et al., 2005).

O óleo essencial da espécie apresenta grande importância medicinal, possuindo comprovada ação bactericida contra vários patógenos humanos (Silva et al., 2002). Em virtude de que esse óleo tem sido empregado principalmente como princípio ativo em produtos para infecção cutânea (Carson et al., 2006), como produtos antiacne. Esta característica, além do efeito antifúngico e repelente (Silva et al., 2002) lhe vem garantindo importância comercial e hoje o consumo desse óleo está disperso pelo mundo inteiro, sendo utilizado em vários tipos de indústria (Castro et al., 2005). Com o desenvolvimento em plantios sabe-se que esse óleo essencial obtido em variedades cultivadas na Austrália apresenta um óleo essencial com uma mistura complexa de aproximadamente 97 compostos, muitos dos quais já foram identificados (Silva et al., 2002). Os principais constituintes são o terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, ρ -cimeno e álcoois sesquiterpenos, representando cerca de 90% do óleo (Brophy et al., 1989).

Como o óleo essencial da *M. alternifolia* está inserido e estabelecido no mercado, muitas análises foram feitas para determinar o padrão de qualidade ideal que o óleo da espécie deve apresentar para ser comercializado. O padrão exigido para a comercialização internacional do óleo essencial de melaleuca é definido por duas instituições: Standards Association of Australian (AS 2782-85) e a International Standard Organization (ISO - 4730, 1996). Ambas as normativas estabelecem a qualidade comercial pelas concentrações dos seus compostos majoritários, o terpinen-4-ol e 1,8-cineol, o primeiro responsável pela atividade antimicrobiana sendo que sua concentração no óleo essencial deve ser no mínimo 30% e o segundo componente, 1,8 cineol, que possui propriedades irritantes à pele, deve ter uma concentração máxima de 15%.

A Austrália é o principal país produtor do óleo essencial de *M. alternifolia*, concentrando os principais produtores dominantes do mercado e as tecnologias de produção (Castro et al., 2005). No Brasil a produção ainda é pequena e diversas indústrias que necessitam desta matéria-prima ou de seus compostos isolados, têm adquirido o produto por importação.

Além da produção do óleo essencial de *M. alternifolia* ainda ser pequena no país, há poucos estudos sobre as variáveis que podem afetar aspectos quantitativos e qualitativos desse óleo em plantios brasileiros. Acredita-se que haja apenas uma empresa produzindo óleo de melaleuca em escala comercial no Brasil, localizada no município de Viçosa, MG. A concentração de metabólitos secundários em plantas é controlada por aspectos genéticos e também pelas interações entre o genótipo

e o ambiente (Silva et al., 2002) variando conforme as condições climáticas (Galdino et al., 2006), a concentração de nutrientes no solo (Mapeli et al., 2005), a época de coleta no ano (Castelo et al. 2012), o que também ocorre com a produção do óleo essencial na planta. Silva (2001) estudou alguns dos possíveis aspectos externos que podem influenciar na produção dos óleos essenciais de *M. alternifolia* cultivada em Minas Gerais, analisando o efeito do clima e a influência do ciclo circadiano. As variações ambientais que ocorrem ao longo do ano e ao longo do dia, entre elas na taxa de umidade relativa do ar e na insolação, podem afetar o comportamento das plantas produtoras de óleos essenciais alterando o padrão de sua produção natural. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da variação circadiana e de partes da planta sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Material e Extração do Óleo

O material utilizado foi coletado em um campo experimental da região do Gama, DF, próxima a Brasília. Para analisar o efeito das variações circadianas a coleta do material foi realizada em dois dias diferentes em uma mesma semana. Foram coletadas amostras de 12 indivíduos no período da manhã (8:30) do dia 26 de outubro de 2009 e amostras de outros 12 no período da tarde (18:00) do dia 28 de outubro de 2009, totalizando 24 indivíduos. Dados meteorológicos fornecidos pelo INMET (www.inmet.gov.br) indicaram precipitação média de 6,4 mm dia⁻¹, temperatura variando de 17,4 °C a 29,6 °C, URA média de 72% e insolação de 4,1 h dia⁻¹ durante o período da coleta. A seleção das plantas amostradas foi feita de forma aleatória, sendo selecionados aqueles que apresentavam altura entre 2,5 e 3,0 m e aspecto saudável.

As amostras de folhas frescas foram acondicionadas e extraídas no Laboratório de Produtos Florestais Não-Madeireiros, localizado na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília. Devido à distância entre o laboratório e a área de coleta, metade do material foi utilizado no mesmo dia para a extração do óleo essencial e a outra metade foi armazenada em câmara fria (10 °C, 50% UR) por um dia, para completar o restante das extrações.

Extração dos óleos essenciais

A extração foi dividida em duas partes: a primeira foi feita com o material coletado pela manhã (M), sendo que do total de 12 indivíduos foram separados 6, para a análise do óleo essencial contido somente nas folhas (Fol) e 6 para a análise do óleo contido nas folhas e ramos dos indivíduos (Arv); o mesmo processo foi feito para o material coletado no período da tarde (T). A extração dos óleos foi feita por destilação com arraste de vapor, através de um equipamento modelo LINAX D1 (volume da dorna de 1600 mL), durante 90 min, tempo necessário para a obtenção de 900 mL de hidrolato; em seguida, na separação da fração orgânica do hidrolato foi utilizado solvente orgânico acetato de etila. Para a remoção de qualquer traço de umidade final, as amostras de óleo essencial foram secadas utilizando-se sulfato de sódio (Na₂SO₄) e anidro e armazenadas ao abrigo da

luz até sua análise. Informações adicionais sobre a separação e a secagem podem ser obtidas em Castelo et al. (2010) O rendimento de óleo essencial foi calculado através da relação de massa de óleo encontrado com a massa de material vegetal utilizado.

Para a quantificação dos compostos químico, uma amostra de óleo essencial de cada tratamento (100 µL) foi dissolvida em 1,5 mL de diclorometano. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás, Agilent modelo 6890N, equipado com detector de ionização por chama, operado a 280 °C, e uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm), utilizando-se hidrogênio como gás carreador (1,5 mL min⁻¹). Foi injetado 1,0 mL de uma solução a 1% do óleo em diclorometano, em injetor aquecido a 250 °C operando no modo com divisão de fluxo (1:100). A programação de temperatura do forno foi de 60 a 240 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹.

Para a identificação dos compostos de cada uma das amostras, foram preparadas sub-amostras contendo 10 µL de óleo essencial diluído em 1,5 mL de diclorometano. Para a quantificação, foram utilizados os valores de área normalizada, expressos em porcentagem. Os espectros de massa foram obtidos em sistema Agilent 5973N, equipado com uma coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), utilizando-se hélio como gás carreador (1,0 mL min⁻¹), nas mesmas condições utilizadas acima. O detector foi operado no modo impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV. Os índices de retenção foram calculados após a injeção de uma série de n-alcenos, nas mesmas condições utilizadas para as amostras. A identificação dos constituintes do óleo foi realizada por comparação dos índices de retenção calculados com valores da literatura (Adams, 2001), padrões dos compostos majoritários e pela comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles da biblioteca Wiley (6ª Edição).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento

Pela análise de variância do rendimento de óleo essencial (Tabela 1) observam-se diferença significativa nos turnos de coleta e material quando considerados isoladamente, mas que, para interação entre eles, não foi verificada diferença estatística alguma. Os fatores detectados como significativos pelo teste de F foram desdobrados e analisados separadamente pelo teste de Tukey (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Análise de variância para o rendimento dos fatores turno, material e suas interações

FV	GL	SQ	QM	F
Turno	1	0,1190	0,1190	8,36**
Material	1	0,0630	0,0630	4,43*
Turno x Material	1	0,0330	0,0330	2,32 ^{NS}
Tratamentos	3	0,2150	0,0717	5,03**
Resíduo	20	0,2847	0,0142	
TOTAL	23	0,4998		

** significativo a 1% de significância (p < 0,01); * significativo a 5% de significância (0,01 ≤ p < 0,05)
^{NS} não significativo (p ≥ 0,05), pelo teste de F

Para o fator turno observou-se que plantas coletadas no período da tarde obtiveram rendimentos superiores àquelas coletadas pela manhã (Tabela 2) resultado que difere do

Tabela 2. Comparação entre médias do rendimento de óleo essencial para os dois turnos de coleta

Turno	Rendimento (%)
Manhã (M)	0,34 b
Tarde (T)	0,48 a

Letras diferentes diferem estatisticamente, teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 3. Comparação entre médias do rendimento percentual de óleo essencial obtido para os diferentes materiais vegetais utilizados para extração

Material	Rendimento (%)
Folhas (Fol)	0,47 a
Folhas + Galhos filhos (Arv)	0,36 b

Letras diferentes diferem estatisticamente, teste de Tukey (p < 0,05)

obtido por Silva (2001) ao verificar um rendimento maior em plantas coletadas pela manhã, no estado de Minas Gerais. Essa diferença pode ser atribuída às diferentes condições de solo, clima, temperatura e entre as regiões. Quanto ao material, nas extrações em que se utilizaram apenas as folhas o rendimento de óleo essencial foi superior quando comparada a que utilizou folhas e galhos finos das plantas (Tabela 3). Resultados semelhantes também foram observados por Silva (2001) que verificou, para os galhos finos, uma quantidade de óleo essencial muito inferior à das folhas. Lemos (2008) destaca, ainda, que não apenas o tipo de material, mas também a forma com que este material é processado influenciam no seu rendimento. Embora seja de amplo conhecimento de que os óleos essenciais podem estar presentes em qualquer parte da planta, é nas folhas que mais usualmente são encontrados e estudados. Ademais, as estruturas produtoras presentes nas folhas parecem ser mais frágeis que aquelas presentes em outras partes, o que facilita a ruptura e o arraste do óleo pelo vapor de água e assim, conseqüentemente, aumentando o rendimento.

Além do efeito das variações ambientais que ocorrem ao longo do dia, o rendimento pode ainda variar bastante, em função da época de coleta do material, entre épocas de chuva e seca, por exemplo. O presente trabalho foi realizado no Distrito Federal, no mês de novembro, sendo um período de chuva na região e com isto resultados diferentes poderão ser encontrados quando avaliados esses mesmos itens na estação da seca. Silva et al. (2002) estudaram a influência do regime hídrico sobre o rendimento de óleo essencial de *M. alternifolia* cultivada em condições de solo e clima no Brasil e observaram que o rendimento do óleo essencial é diretamente proporcional ao teor de matéria seca, ou seja, que o déficit hídrico ocasiona menor produção de biomassa em função das condições desfavoráveis à sua produção e, em consequência, há um rendimento menor na extração do óleo. Aliando o fato de a espécie ser encontrada naturalmente em regiões pantanosas e perto de rios (Silva et al., 2002), períodos mais úmidos e com alta taxa de pluviosidade possivelmente são melhores para a produção quantitativa do óleo essencial de *M. alternifolia*.

Silva et al. (2003) relatam que o rendimento do óleo essencial extraído através de hidrodestilação variou de 1,09 a 1,37% em relação à massa fresca, assim como Beylier (1979) que também relata percentuais por volta de 1 a 3% em relação à massa fresca. Contudo, não foram encontrados, na literatura, dados sobre o rendimento do óleo da espécie obtido através

da técnica de destilação por arraste de vapor e, deste modo, a relação entre os rendimentos encontrados em trabalhos que utilizaram outras técnicas, não possibilita uma comparação precisa.

Identificação e quantificação dos constituintes

Na análise de variância para a qualidade do óleo essencial de *M. alternifolia*, observa-se que houve diferenças significativas apenas nas concentrações dos compostos majoritários e não ocorreu diferença estatística significativa entre os tratamentos testados (Tabela 4).

Tabela 4. Quadro de análise de variância para a qualidade do óleo essencial analisando-se os tratamentos e as concentrações dos constituintes majoritários

FV	GL	SQ	QM	F
Constituintes	7	12714,5	1816,3	630,99*
Tratamentos	3	17,6	5,8	2,04 ^{NS}
Const. x Trat.	21	84,9	4,04	1,41 ^{NS}
CV (%)	18,01			

* significativo a 5% de significância ($p < 0,05$); ^{NS} não significativo ($p \geq 0,05$), pelo teste de F

Na análise das 12 amostras do óleo essencial foram identificados os seguintes compostos majoritários: α -terpineno (7,1%), *p*-cimeno (5,5%), limoneno (1,1%), 1,8-cineol (1,4%), γ -terpineno (18,2%), α -terpinoleno (3,0%), terpinen-4-ol (36,6%) e α -terpineol (2,5%). Os valores percentuais de cada composto representam as médias relativas obtidas entre todas as amostras analisadas e foram considerados componentes majoritários apenas aqueles cuja concentração estava acima de 1% (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações médias dos oito constituintes majoritários nos quatro tratamentos analisados

Constituintes majoritários	Tratamentos				Médias
	ArvM	ArvT	FoIM	FoIT	
α -terpineno	7,1 a	7,5 a	6,1 a	7,7 a	7,1
<i>para</i> -cimeno	5,6 a	5,1 a	6,6 a	4,7 a	5,5
limoneno	1,2 a	1,1 a	1,1 a	1,0 a	1,1
1,8-cineol	1,9 a	1,6 a	1,2 a	0,7 a	1,4
γ -terpineno	18,3 a	18,6 a	16,7 a	19,2 a	18,2
α -terpinoleno	3,0 a	3,2 a	2,8 a	3,0 a	3,0
terpinen-4-ol	35,9 bc	37,5 ab	33,0 c	40,1 a	36,6
α -terpineol	2,5 a	2,5 a	2,3 a	2,6 a	2,5

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Tratamentos: ArvM – folhas + galhos/período da manhã; ArvT – folhas + galhos/período da tarde; FoIM – folhas/período da manhã; FoIT – folhas/período da tarde

De acordo com os resultados obtidos e se observando as normas da ISO 4730 que normatiza o padrão de qualidade internacional para o óleo da *M. alternifolia*, o óleo produzido nas condições do Distrito Federal atende aos padrões mínimos de qualidade (Tabela 5), com valores de terpinen-4-ol variando entre 33 a 40,1%, ou seja, estando dentro do necessário para a qualidade comercial desse óleo essencial, que é determinada pela quantidade dos compostos terpinen-4-ol e 1,8-cineol, que devem apresentar entre 30-48% e máximo 15%, respectivamente.

Os valores obtidos neste trabalho para a composição do óleo essencial de *M. alternifolia*, foram similares àqueles obtidos por Silva et al. (2002) nas condições de clima e solo, no estado de Minas Gerais. Quanto aos tratamentos testados não foi observada diferença estatística entre os períodos de coleta

(manhã e tarde) nem entre as partes da planta analisadas (planta inteira e parte aérea), sendo que a concentração da maioria dos compostos permaneceu constante. Entretanto, observou-se diferença significativa na concentração de terpinen-4-ol no óleo essencial extraído da parte aérea em plantas coletadas no período da tarde, apesar da diferença no percentual do composto ter sido muito sutil e estatisticamente foi igual à concentração obtida quando extraído o óleo da árvore inteira. De modo análogo, pode-se inferir que, ao analisar apenas a concentração dos compostos, não é viável economicamente o produtor de óleo essencial separar a parte aérea do restante da planta pois a qualidade do óleo será a mesma.

Corroborando com as análises de rendimento de óleo essencial (Tabela 3), a maior concentração de terpinen-4-ol observada naquelas amostras extraídas no período da tarde, pode ser atribuída, provavelmente, à diferença das condições climáticas na hora da coleta, como a porcentagem de umidade relativa do ar e a incidência de insolação. Segundo Homer et al. (2000), as condições climáticas afetam substancialmente o teor de óleo essencial na planta mas nem sempre influenciam na sua composição.

Analisando os aspectos quantitativos e qualitativos da extração do óleo essencial de *M. alternifolia* no Distrito Federal, verifica-se a possibilidade de produção do óleo sob as características ambientais da região no período de chuva. O óleo produzido atende aos padrões exigidos e que, através de tratamentos culturais e introdução e avaliação de outros materiais genéticos, os resultados da qualidade do óleo podem ser ainda melhores. Análises sobre o comportamento da produção do óleo essencial da espécie em outras épocas do ano são importantes para se avaliar o padrão de produção, ao longo do ano na região.

CONCLUSÕES

A coleta do material para extração no período da tarde produziu um rendimento maior de óleo essencial, em comparação com o material coletado na manhã. O rendimento foi maior também quando a extração foi feita utilizando-se apenas as folhas, mas não foram verificadas diferenças significativas na composição química do óleo com relação ao período de coleta e à parte da planta. O óleo essencial produzido, independente do período da coleta e da parte da planta utilizada, apresentou rendimento e qualidade em conformidade com as normas internacionais que estabelecem padrões para o óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel bem como quando comparado com os valores obtidos na literatura.

LITERATURA CITADA

- Adams, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2001. 456p.
- Beylier, M.F. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. Perfumes and Flavourist, v.4, p.23-25, 1989.
- Brophy, J. J.; Vavies, N. M.; Southwell, I. A.; Stiff, I.A.; Williams, L. R. Gas chromatography quality control for oil of melaleuca terpin-4-ol type (Australian tea tree). Journal Agricultural Food Chemistry, v.37, n.5, p.1330-1335, 1989.

- Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>>
- Castelo, A. V. M.; Del Menezzi, C. H. S., Resck, I. S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *Journal of Applied Sciences*, v.12, n.8, p.753-760. <<http://dx.doi.org/10.3923/jas.2012.753.760>>
- Castelo, A. V. M.; Del Menezzi, C. H. S.; Resck, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMH ¹H, ¹³C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do Cerrado. *Cerne*, v.16, n.4, p.573-589. 2010. <http://www.dcf.ufla.br/cerne/.../03-02-20114030v16_n4_artigo%2017.pdf>. 30 Set. 2012.
- Castro, C.; Silva, M. L.; Pinheiro, A. L.; Jacovine, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell. *Revista Árvore*, v. 29, n. 2, p.241-249, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000200007>>
- Galdino, A. P. P.; Brito, J. O.; Garcia, R. F.; Scolforo, J. R. Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus* ssp) e a influência das diferentes origens comerciais da sua madeira. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8. n. 4. p.44-46, 2006. <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo9_v8_n4_p044-046.pdf>. 30 Set. 2012.
- Homer, L. E.; Leach, D. N.; Lea, D.; Lee, L.S.; Henry, R.J.; Baverstock, P. R. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, n.4, 367-382. 2000. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00071-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00071-X)>
- International Organisation for Standardisation - ISO. Essential oils – oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). ISO-4730. Geneva: International Organisation for Standardisation, 1996. 7p.
- Lemos, D.R.H. Influência da temperatura do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell. 2008. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 41p. Dissertação Mestrado.
- Mapeli, N. C.; Vieira, M. C.; Heredia Z, N. A.; Siqueira J. M. Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função de nitrogênio e fósforo. *Revista de Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 1, p.32-37, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362005000100007>>
- Riedl, R.W. Practical methods for using tea tree oil. *AgroFood Industry Hi-Tech*, v.8, n.1, p. 34-36, 1997
- Silva, S. R. S. Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Chell crescida no Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 60p. Dissertação Mestrado.
- Silva, S. R. S.; Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Casali, V. W. D.; Nascimento, E.A.; Pinheiro, A. L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarum.Agronomy*, v. 24, n. 5, p.1363-1368, 2002. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/2382>>. 30 Set. 2012.
- Silva, S.R.S.; Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Andrade, N. J.; Nascimento, E.A.; Pinheiro, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.6, n.1, 63-70, 2003. <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo12_v6_n1.pdf>. 30 Set. 2012.
- Standards Association of Australia - AS. Australian standard for essential oils – oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (AS 2782-1985). Sydney: Standards Association of Australia, 1985. 6p.