

DESENVOLVIMENTO DO SABONETE LÍQUIDO A BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ÓLEO EM CEPA ATCC

Daniela Frances Costa Moura, Vitória Ferreira Borges de Lima, Jucilene Aparecida Alves dos Santos, Tarcísio Liberato de Souza Júnior, Sônia Khouri Sibelino, Matheus Salgado de Oliveira.

Universidade do Vale do Paraíba/Centro de Diagnóstico Laboratorial da UNIVAP, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, danifcmoura@gmail.com, matheus.salgado@univap.br.

Resumo

O óleo essencial de Melaleuca, possui propriedades inibitórias contra vírus, bactérias e fungos, é considerado uma inovação para produtos da indústria cosmética. O objetivo do trabalho foi desenvolver e analisar as propriedades do sabonete líquido produzido com óleo essencial de Melaleuca por meio de parâmetros organolépticos e físico-químicos e analisar o potencial microbicida do óleo sobre cepa padrão ATCC de *Escherichia coli* para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima). Para o sabonete 100ml da base líquida Régia® e 5ml de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Byofórmula®, foram misturados mecanicamente e após agitado num vortex Quimis® por 2 minutos. O produto foi avaliado conforme o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da ANVISA. Para a análise microbiológica foi preparada a solução com 950µl de óleo essencial com 50µl de Dimetilsulfóxido, adicionados em um microtubo de 1,5ml. O ensaio foi conduzido em placa de 96 poços. As análises forneceram informações para futuras abordagens acerca do potencial microbicida e estético do sabonete líquido a base de óleo essencial de Melaleuca.

Palavras-chave: Óleo essencial de Melaleuca; Sabonete; *Escherichia coli*.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

O óleo essencial de Melaleuca, também conhecido como óleo de "Tea Tree", é extraído de uma planta nativa da Austrália que cresce predominantemente em áreas úmidas e pantanosas. Esta planta enfrenta condições adversas, como solo pouco fértil e frequentes ataques de microrganismos, o que a levou a desenvolver mecanismos de defesa únicos (Minto *et al.*, 2020). Essas características conferem ao óleo propriedades excepcionais contra vírus, bactérias e fungos, tornando-o altamente eficaz no tratamento de diversas condições dermatológicas, sendo que os óleos essenciais, principalmente o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* conhecido por suas propriedades antissépticas, podem representar uma alternativa ao controle de bactérias e outros microrganismos patogênicos (GNATTA, 2012).

A incorporação de óleos essenciais, como o de Melaleuca, na fabricação de sabonetes tem se tornado uma prática cada vez mais comum devido às suas propriedades microbicidas. Esses óleos melhoram a eficácia dos sabonetes no combate a micróbios e bactérias, além dos benefícios terapêuticos, como efeitos calmantes e revigorantes (Minto *et al.*, 2020; Chaves; Filho; Bender, 2022). Os sabonetes têm como função principal a limpeza da pele e exercem um efeito antisséptico que previne a proliferação de microrganismos (Minto *et al.*, 2020). Quando combinados com óleos essenciais, esse efeito antisséptico é amplificado, resultando em produtos com maior eficácia (GNATTA, 2012).

Uma bactéria comumente encontrada nas mãos é a *Escherichia coli*, que está presente no ambiente e nas superfícies que entramos em contato diariamente (GNATTA, 2012; Maestri *et al.*, 2020; Minto *et al.*, 2020). Embora muitas cepas de *E. coli* sejam inofensivas e façam parte da microbiota intestinal normal, algumas podem causar infecções graves, complicações e doenças. Manter uma rigorosa higiene das mãos é essencial para prevenir a contaminação e a propagação de *E. coli* (GNATTA, 2012;

Maestri *et al.*, 2020; Minto *et al.*, 2020). Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo desenvolver e analisar o sabonete líquido à base de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Byofórmula®, além de qualificar a atividade microbicida do óleo utilizado para o desenvolvimento do sabonete em cepas ATCC de *Escherichia coli*.

Metodologia

Desenvolveu-se um sabonete líquido à base de óleo essencial de Melaleuca, em um becker utilizando 100ml da base líquida Régia® e 5ml de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Byofórmula®, os ingredientes foram misturados mecanicamente com um bastão de vidro, após foi agitado em um vórtex Quimis® por 2 minutos até obter homogeneização dos compostos. O produto final foi testado durante quatro semanas seguindo as diretrizes do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da ANVISA, através de ensaios organolépticos e físico-químicos, que incluíam cor, odor, aspecto, pH, viscosidade e densidade. Para aferir o pH foi utilizado phmetro *FiveEasy Plus Mettler Toledo*®, previamente calibrado com as soluções tampões de acordo com Minto *et al.* (2020) e Pires *et al.* (2021), fora utilizado também fita reagente para detecção de pH como análise comparativo.

Para o teste microbicida com óleo essencial de Melaleuca, foi realizado o repique da cepa ATCC *Escherichia coli* e incubado por 24 horas, seguidamente, foi feito o preparo do inóculo, com o auxílio de uma alça descartável, uma colônia foi inoculada em 10ml de caldo BHI e posteriormente incubada por 18 horas a 37°C. Foi preparada a solução de óleo essencial de Melaleuca com 950µl de óleo essencial com 50µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), adicionados em um microtubo de 1,5ml. O ensaio foi conduzido em placa de 96 poços, com o poço 11 como controle positivo (100µl de hipoclorito de sódio a 2,5% e 5µl do inóculo) e o poço 12 como controle positivo (100µl de caldo BHI e 5µl do inóculo). O poço 1 foi preenchido com 100µl de caldo BHI concentrado e então adicionado 100µl da solução mais concentrada do óleo de Melaleuca. Começando no poço contendo concentração superior, os poços de 2 a 10 receberam 100µl de caldo BHI cada, garantindo 100µl em todos os poços após a microdiluição. Posteriormente, 100µl do poço 2 foram transferidos para o poço 3, homogeneizados três vezes e transferidos para o poço 4, e assim por diante até o completar o último poço. Seguidamente a microdiluição, 5µl do inóculo foram pipetados em todos os poços, seguido da incubação da placa na estufa por 16 a 20 horas, conforme a metodologia do CLSI de 2018 (Humphries *et al.*, 2018). Após o período de incubação. Uma alíquota de 3µl de diferentes diluições testadas foram semeadas em ágar Muller-Hinton utilizando o método da gota e incubada a 37°C por 24 horas para investigação da constituição (desenvolvimento) ou a carência de UFC/ml em cada diluição, a fim de estabelecer a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima).

Resultados

Os resultados das análises dos ensaios organolépticos e físico-químicos realizados no sabonete líquido desenvolvido, da primeira à quarta semana foram - 1ª semana: apresentava coloração branca amarelada e odor característico do óleo, herbal e bem intenso, de aparência homogênea, pH na fita 8,0 e no peagâmetro 7,87, viscosidade de 1.150 Pa.s e densidade 0,9934 g/ml. 2ª semana: pH variou para 7,89 (peagâmetro), viscosidade de 1.040 Pa.s e densidade 1,0479 g/ml. 3ª semana: pH 7,84 (peagâmetro), viscosidade de 1.080 Pa.s e densidade 988,5 g/ml. 4ª semana: pH de 7,82 (peagâmetro), viscosidade 1.180 Pa.s e densidade 1035,2 g/ml - A cor e o pH na fita foram os mesmos durante todo experimento, o odor teve diminuição gradual na intensidade a partir da 2ª semana, porém, permaneceu típico do óleo essencial, a mistura teve aspecto homogêneo durante todas análises (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados dos ensaios organolépticos e físico-químicos realizados no sabonete líquido desenvolvido, testados durante 4 semanas.

Análise	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
pH	7,87	7,89	7,84	7,82
Viscosidade	1.150 Pa.s	1.040 Pa.s	1.080 Pa.s	1.180 Pa.s
Densidade	0,9934 g/ml	1,0479 g/ml	988,5 g/ml	1035,2 g/ml
Cor	branco-amarelado	branco-amarelado	branco-amarelado	branco-amarelado

Aspecto	homogêneo	homogêneo	homogêneo	homogêneo
---------	-----------	-----------	-----------	-----------

Fonte: Autora, 2024.

Os resultados dos testes microbicidas com o óleo essencial puro na cepa de *E. coli*, apresentou ação após o volume de 20 µl formando halo de inibição (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da técnica difusão em ágar com o óleo essencial puro.

Óleo de Melaleuca puro	Halo de inibição	Padrão de intervalo
10µl	0mm	Resistente
20µl	27mm	Sensível
30µl	29mm	Sensível
40µl	31mm	Sensível

Fonte: Autora, 2024.

Nos testes com o óleo essencial diluído com óleo mineral avaliado em cepa de *E. coli*. Os resultados mostraram que as concentrações de 2,5%, 5%, não exibiram atividade antimicrobiana, porém, em maiores concentrações a partir de 10% produziram halos de inibição (Tabela 3).

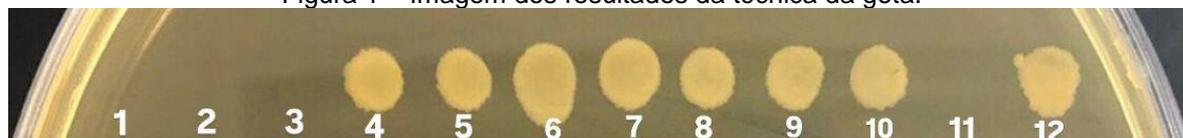
Tabela 3 - Resultados da técnica difusão em ágar com o óleo essencial diluído em óleo mineral.

Óleo de Melaleuca + Óleo Mineral	Halo de inibição	Padrão de intervalo
10%	8/9mm	Sensível
12,5%	16mm	Sensível
25%	19mm	Sensível
50%	21mm	Sensível

Fonte: Autora, 2024.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) revelou-se eficaz a partir do terceiro poço da placa de 96 poços, indicando que a CIM do óleo essencial de Melaleuca foi de 12,5% (125mg/mL) E a CBM foi de 25% (250mg/ml). Os resultados foram comprovados com a técnica da gota (Figura 1).

Figura 1 – Imagem dos resultados da técnica da gota.



Fonte: Autora, 2024.

Discussão

A análise dos parâmetros organolépticos e físico-químicos do sabonete desenvolvido (Tabela 1), revelaram pH variando de 7,87 na primeira semana para 7,82 na quarta semana, essa variação pode estar relacionada com a ação bactericida e fungicida, segundo Leonardi e colaboradores (2002), o pH fisiológico da pele pode variar de 4,5 a 6,0, porém, depende de fatores externos ambientais e até mesmo a idade, já o pH dos sabonetes é sabido que pode variar de 4,5 a 6,0 principalmente devido ao uso, a análise de pH do produto desenvolvido no presente estudo corrobora o encontrado por De Oliveira e colaboradores (2022), que analisaram o sabonete líquido com extrato de *Bidens pilosae* e o pH final foi até mais ácido, de 7,30, a metodologia empregada no desenvolvimento do sabonete líquido produzido está de acordo com a de Minto e colaboradores (2020), que desenvolveram um sabonete líquido a base de óleos essenciais, dentre eles o óleo de *Melaleuca alternifolia*, para a preparação utilizaram simples mistura das matérias-primas, à frio e sob agitação, até que fosse obtido a combinação completa dos compostos, o pH variou de 4,0 a 7,0, também, ligeiramente mais ácido do que o encontrado no presente estudo (Tabela 1).

Silva e colaboradores (2022), elaboraram uma revisão sistemática sobre a valiação dos riscos químicos ao uso irracional de formulações dermatológicas contendo ácidos e destacaram que os

compostos ácidos são comuns nas formulações cosméticas e podem provocar irritação, ressecamento excessivo, ardência, sensibilidade a luz e queimação, ocasionando até mesmo lesões na derme que podem ser provocadas pela utilização não recomendada ou uso indevido de tais produtos, o que demonstra a importância do pH obtido no presente estudo, após 4 semanas de ensaio, ter sido levemente alcalino, contudo, sugere-se períodos maiores de avaliação físico-química do sabonete líquido a base do óleo essencial de Melaleuca, principalmente devido aos valores decrescentes de pH encontrados ao longo do experimento (Tabela 1). Os parâmetros organolépticos e físico-químicos realizados no sabonete líquido desenvolvido foram todos de acordo com o guia de controle de qualidade de produtos cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

A atividade antimicrobiana da *Melaleuca alternifolia* se deve aos seus compostos majoritários, o terpinen-4-ol e o 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% (Andrade *et al.*, 2018), além disso, o óleo traz hidratação, reduz a taxa de reprodução de patógenos (bactérias, fungos, vírus), e intensifica a resistência contra esses agentes agressores, por esse motivo é útil nas afecções do couro cabeludo, como a caspa, e de pele, como a acne (Andrade *et al.*, 2018; Minto *et al.*, 2020). Segundo Jesus, Ellensohn e Barin (2007), em seu trabalho de otimização do método analítico do óleo essencial de Melaleuca, relataram que as dosagens mais comumente utilizadas do óleo são: cosméticos (0,5 a 5,0%), contra infecções resistentes (produto puro); como conservante natural (0,5 a 1,0%), ainda neste estudo, relataram que esse óleo tem uma grande ação sob a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, no qual uma concentração de 0,25% em água foi capaz de inibir o crescimento e o dobro dessa concentração tem o poder de matá-la, também afirmaram que foi semelhante a ação bactericida para a bactéria *Escherichia coli*, o que corrobora com os achados no presente estudo (Tabelas 2 e 3).

No estudo realizado por Branciforti e colaboradores (2019), o óleo de Melaleuca apresentou propriedades antibacterianas quando testado com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, formando halos de inibição de 16 e 18mm, respectivamente, o que corrobora com nossos achados, principalmente com a diluição a 12,5%, que revelou o mesmo tamanho de halo de inibição de 16mm (Tabela 3). Na metodologia de Branciforti e colaboradores (2019), o teste microbiológico realizado foi o de disco-difusão para se avaliar a suscetibilidade, no presente trabalho, a técnica utilizada para endossar o achados microbicidas da CIM foi a técnica de gota (Figura 1). Sugere-se aprofundamentos acerca do potencial microbicida e estético do sabonete líquido a base de óleo essencial de Melaleuca, este estudo abre caminho para futuras abordagens acerca do potencial microbicida e estético do sabonete líquido a base de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Conclusão

O sabonete líquido desenvolvido apresentou características organolépticas e físico-químicas adequadas segundo o guia de controle de qualidade de produtos cosméticos da ANVISA, sugere-se aprofundamentos para melhorias do produto e análises de eficácia temporal mais prolongadas. O óleo essencial de Melaleuca demonstrou atividade bactericida CIM e CBM na cepa ATCC de *Escherichia coli*, nossos achados abrem caminho para futuras abordagens acerca do potencial microbicida e estético do sabonete líquido a base de óleo essencial de Melaleuca.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2008.

ANDRADE. C. S. F. *et al*; Avaliação da citotoxicidade do *tea tree oil* e sua ação antimicrobiana em bactéria *Propionibacterium acnes*, **Brazilian Journal of Natural Sciences**. p. 3-13, 2018.

BRANCIFORTI, M. C. *et al*. Estudo da propriedade antibacteriana e da incorporação do óleo de Melaleuca em argila montmorilonita. **Anais do 15º Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPOL)**, 2019.

CHAVES, M. S.; FILHO, J. R. A.; BENDER, S. Desenvolvimento de sabonete em barra natural contendo óleos essenciais. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e215111537249 e215111537249, 2022.

DE OLIVEIRA, A. A. *et al.* Sabonete líquido com extrato de picão (*Bidens pilosa linn*) para o cuidado de recém-natos com icterícia neonatal. **Revista Científica FACS**, v. 22, n. 2, p. 18-29, 2022.

GNATTA, Juliana Rizzo. **Comparação da eficácia antimicrobiana de sabonetes contendo óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) e triclosan na higienização de mãos artificialmente contaminadas**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

HUMPHRIES, R. M. *et al.* CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 4, p. 10.1128/jcm. 01934-17, 2018.

JESUS, E. R. de; ELLEN SOHN, R. M.; BARIN, C. S. Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: otimização do método analítico. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 6, n. 1, 2007.

MAESTRI, G. *et al.* Quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e mecanismos de resistência nas mãos de manipuladores de alimentos em UANS hospitalares em SC. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 21, n. 1, p. 91-105, 2020.

MINTO, L. F. *et al.* Desenvolvimento de Sabonete Líquido Antisséptico à Base de Óleos Essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Schinus terebenthifolius* e *Rosmarinus officinalis*. **Cadernos Camilliani e- ISSN: 2594-9640**, v. 17, n. 4, p. 2338-2354, 2021.

PIRES, V. R. *et al.* Desenvolvimento de um sabonete líquido a partir do extrato da casca do fruto da pitomba (*Talisia esculenta*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e325101522791-e325101522791, 2021.

SILVA, L. L. *et al.* Atividades terapêuticas do óleo essencial de *Melaleuca (Melaleuca alternifolia)*: Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of health Review**, 2019.