

AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO INSUMOS EM SABONETES

Jéssica Ingrid de Moraes SILVA¹
Cecilia Veronica NUNEZ²

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Orientadora COTI/ INPA

INTRODUÇÃO

O uso das plantas em cosmetologia fez aparecer uma terminologia específica para designar esse ramo que trata do estudo e da utilização de substâncias de origem vegetal empregadas para manutenção e/ou promoção da beleza da pele, a fitocosmética. Do grego, *Phyton* - planta e *Kosmein* – cosméticos. Valfré, em 1990, definiu a fitocosmética como o segmento da ciência cosmética que se dedica ao estudo e a aplicação dos conhecimentos da ação dos princípios ativos extraídos de espécies do reino vegetal, em proveitos da higiene, estética, da correção e da manutenção de um estado normal (endérmico) da pele. E dentre estes, se destacam os óleos essenciais que são amplamente utilizados na cosmetologia.

Óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais (partes aéreas, cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas) e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como por exemplo, na defesa contra microrganismos (Lima *et al.* 2006). A composição química depende de vários fatores, sendo como exemplos os climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (Gobbo Neto e Lopes, 2007). A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (Bertini *et al.* 2005).

Neste trabalho foram estudadas quatro espécies: capitiú (*Siparuna guianensis* Aubl., Siparunaceae), chumbinho (*Lantana camara* L., Verbenaceae), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae) e folha de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume., Lauraceae).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

Foram coletadas quatro espécies no Município de Manaquiri- AM, e tiveram suas exsiccatas depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, com os seguintes números de tombamento: *C. zeylanicum*, Lauraceae – registro nº 254.864; *C. citratus*, Poaceae – registro nº 254.863; *L. camara*, Verbenaceae – registro nº 254.861; *S. guianensis*, Siparunaceae – registro nº 254.862. Parte do material foi armazenada em freezer e a outra parte foi seca em temperatura ambiente. Foram coletadas partes aéreas das plantas (galhos finos, folhas, flores e frutos), estas foram cortadas e pesadas.

Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi através da técnica de destilação por arraste a vapor (Simões *et al.* 1999), o material cortado foi colocado em um balão de 12 litros (todas as partes juntas), e coberta por água destilada. A extração do óleo foi feita através de arraste por hidrodestilação em sistema Clevenger modificado; qual o balão de destilação foi aquecido por no máximo quatro horas. O óleo essencial extraído foi seco com sulfato de sódio, e armazenado em frasco âmbar e depois refrigerado.

Identificação das substâncias

A identificação das substâncias presentes nos óleos essenciais foi realizada através de Cromatografia Gasosa interfaciado com Detector de Ionização por Chama (CG-DIC), em um cromatógrafo Agilent, modelo HP 6890 Plus, equipado com coluna apolar HP-5 com 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,32 µm e filme de 0,25 µm. O injetor foi programado a 220 °C e operado no modo splitless. O forno foi programado com rampa de aquecimento linear de 60 °C a 260 °C a 3 °C/min. Os detectores utilizados foram do tipo FID a 280 °C e como gás de arraste hidrogênio com fluxo constante de 20 mL min⁻¹. As amostras foram injetadas na concentração de 1 mg/mL. Para o cálculo do índice de Kovats (abaixo) foi utilizado o padrão de hidrocarbonetos C7-C30 da marca Supelco, os cromatogramas das amostras foram comparados à literatura especializada (Adams, 2001).

Índice Kovats

$$I = 100 \left[\frac{\log x_i - \log x_z}{\log x_{(z+1)} - \log x_z} + z \right]$$

Onde:

xi: tempo de retenção do componente

xz: tempo de retenção *n*-alcano eluído antes

x(z+1): tempo de retenção *n*-alcano eluído depois

z: nº de carbonos de xz

Método de difusão em Ágar (poço)

1º passo: Preparação do inóculo

O método de crescimento das bactérias consiste em adicionar os microrganismos testes em um meio Ágar definitivo, onde foram repicados em 10 mL de caldo Müeller-Hinton (MH) ou solução salina, posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação. Após turvação do caldo Müeller-Hinton, foram preparadas as suspensões bacterianas, ajustando-se a turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL.

2º passo: Inoculação de placas teste

Em placas de Petri esterilizadas, foram adicionados 20 mL de ágar Müeller-Hinton. Após a solidificação, a superfície seca da placa de ágar Müeller-Hinton será inoculada esfregando o swab contendo o inóculo, em toda a superfície estéril do ágar. Em seguida, confeccionaram-se poços/orifícios de 5,0 mm de diâmetro em pontos equidistantes, colocando-se neles 25 µL do óleo a ser testado. Após um período de pré-incubação de 2 h à temperatura ambiente, que permitiu a difusão dos óleos antes do início do desenvolvimento dos microrganismos, as placas foram incubadas em aerobiose a 30 ou 37 °C por 18 h.

3º passo: Leitura das placas e interpretação dos resultados

Após 16-18 horas de incubação, as placas foram examinadas. Onde foram observados os halos de inibição. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do poço. Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, que é encostado na placa de Petri. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina e como controle negativo o solvente DMSO (Dimetilsulfóxido).

Teste de toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados segundo metodologia preconizada por Meyer, (1982) frente à *Artemia salina* Leach.

Metodologia de eclosão dos cistos: foram pesados 38 g de sal marinho, que foram solubilizado em 1 L de água destilada (essa mistura será filtrada) e em seguida, foram adicionados 10 mg de cistos de *A. salina*. O béquer foi coberto com filme PVC, ficou sob luz artificial (luminária) por 48 h em temperatura ambiente entre 27 a 30 °C. A hora e data foram marcadas.

Metodologia para preparo dos extratos: foi utilizado 5 mg de cada óleo em eppendorff, juntamente com 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido), em seguida foram agitados no vórtex.

Montagem da placa e ensaio:

1º passo: Foi adicionado 1 mL de água com *A. salina* (10 indivíduos) em cada poço, posteriormente completou-se com água salina a quantidade necessária.

2º passo: Foi adicionado diferentes concentrações do óleo e do solvente. 3º passo: O experimento ficou por 24 horas sob luz artificial, entre 27 a 30°C.

Após esse processo os indivíduos vivos e mortos foram contados, e então foi realizado o cálculo de mortalidade. Os ensaios realizaram-se em diferentes concentrações (1.000, 500, 250, 120, 60, 30 µg/mL). Como controle positivo foi utilizado Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$), como controle negativo o solvente DMSO.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi extraído o óleo essencial do material vegetal seco (armazenado em temperatura ambiente) e fresco (armazenado em freezer), com o intuito de avaliar o rendimento do óleo em relação ao estado de armazenagem do material após a coleta. Estão sumarizados na tabela 1 o rendimento do óleo, massa do material vegetal e massa do óleo.

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais

	Espécie	Massa vegetal (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento (%)
Fresco	<i>L. camara</i>	576,11	0,32	0,05
	<i>S. guianensis</i>	1.003,66	2,89	0,28
	<i>C. citratus</i>	1.276,70	8,98	7,09
	<i>C. zeylanicum</i>	329,60	1,18	0,35
Seco	<i>L. camara</i>	690,00	0,64	0,09
	<i>S. guianensis</i>	838,56	3,54	0,42
	<i>C. citratus</i>	1.320,30	13,98	10,59
	<i>C. zeylanicum</i>	130,04	0,85	0,65

Os rendimentos dos teores dos óleos essenciais foram bem distintos, ao comparar a extração do material seco e fresco. Os óleos extraídos do material seco tiveram um rendimento maior. Destacando os rendimentos dos óleos de *C. citratus*, que foi o maior tanto para o fresco (7,09 %); quanto para o seco (10,59%). Diferente do que foi encontrado em outros trabalhos que tiveram rendimentos inferiores. Oliveira et al. (2011) descreveram o rendimento para folhas secas no valor de $1,39 \pm 0,54\%$ (v/p).

Costa et al. (2009) descreveram para *L. camara* o rendimento de 0,05 % para o material vegetal fresco, resultado igual ao obtido para material fresco neste trabalho.

Koketsu et al. (1997) descreveram para folhas frescas de *C. zeylanicum* um rendimento médio de 2,0%. Rendimento superior ao descrito neste trabalho tanto para o material vegetal fresco quanto para seco.

Valentini et al. (2010) obtiveram de folhas frescas de *S. guianensis* rendimentos que variam de 0,1 até 0,6% de acordo com o mês da coleta. Os resultados encontrados neste trabalho (0,24 e 0,42 %, para materiais frescos e secos, respectivamente), estão dentro da faixa de rendimento do referido trabalho. Deve-se levar em consideração que os locais de coleta foram diferentes.

Os resultados da quantificação e identificação dos componentes dos óleos essenciais dos *S. guianensis*, *L. camara*, *C. citratus* e *C. zeylanicum*, analisados por CG-DIC coluna apolar (HP-5), serão descritos na tabela 3, juntamente com os constituintes encontrados, além tempo de retenção da substância e do índice de retenção da literatura.

Os óleos se mostraram quimicamente parecidos quanto ao método de armazenamento (fresco e seco). O componente que esteve presente em todos os óleos foi α -gurjuneno, em concentrações de 0,92% a 5,73%.

O componente majoritário para *L. camara* foi butanoato de geranila com um percentual de 82,38% (fresco) e 67,64% (seco). Costa et al. (2009) descreveram para *L. camara*: biciclogermacreno (19,42%), isocariofileno (16,70%), valenceno (12,94%) e germacreno D (12,34%).

Para *S. guianensis* os componentes majoritários foram: 2,4,5-trimetil-tiazol, com percentual de 11,36% (fresco) e 23,17% (seco); β -cubebeno percentual de 10,75% (fresco); (*E*)- β -ionona 9,33% (fresco) e 20,07% (seco). Valentini et al. (2010), em levantamento mensal, descreveram para *S. guianensis*: siparunona (21,09 a 54,47%), ledol (4,85 a 10,49%), espatulenol (2,8 a 10,8), óxido de cariofileno (1,25 a 19,44%), acetato de di-hidrocarvil (1,35 a 23,89%).

C. citratus apresentou como componentes majoritários: *cis*-dihidro-*p*-terpineol com um percentual de 20,85% (fresco) e 21,2% (seco) e geraniol 52,92% (fresco) e 53,12% (seco). Oliveira et al. (2011) descreveram para *C. citratus*: geranial (42,92%), e neral (30,91%).

Para *C. zeylanicum* o componente majoritário foi: (2*E*)-undecenal, percentual de 85,20% (fresco) e 89,39% (seco). Lima et al. (2006) descreveram para *C. zeylanicum*: α - e β -pineno (9,9%; 3,5%), α -felandreno (9,2%), *p*-cimeno (6,2%), limoneno (7,9%), linalol (10,6%); (β)-cariofileno (6,7%), (*E*)-cinamaldeído (7,8%) e acetato de (*E*)-cinamila (9,7%).

Os ensaios antibacterianos realizados com os óleos essenciais e o óleo de andiroba através do método de difusão em ágar (poço), tiveram seus halos de inibição avaliados segundo Alves et al. (2000).

CONCLUSÃO

Os óleos que se mostraram mais promissores foram de andiroba e *L. camara* contra *P. aeruginosa*, tendo halo de 32 e 30 mm, respectivamente, na concentração de 5 mg/mL, e na concentração de 1 mg/mL apresentaram halo de 13 mm, considerados ativos.

A bactéria que se mostrou mais resistente aos óleos foi *A. hydrophila*, onde se puderam observar halos de 8 a 10 mm na concentração de 1 mg/mL, sendo considerados de inativos a pouco ativos.

Todos os óleos deram atividade, mesmo na menor concentração de 1 mg/mL, se obtiveram halos maiores que 8 mm.

Os ensaios de toxicidade frente *A. salina* mostraram que o óleo de *C. guianensis* é o menos tóxico, pois a concentração necessária para matar 50% (CL₅₀) foi de 1.000 µg/mL. O óleo de *L. camara* foi o mais tóxico, pois a sua CL₅₀ foi de 60 µg/mL. Costa *et al.* (2009) descreveu para *L. camara* uma CL₅₀ de 14 µg/mL.

Os sabonetes líquidos com as espécies estudadas se mostram promissores, pelo alto rendimento que apresentam.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream: Allured Publ. Corp.
- Alves, T.M.A. *et al.* 2000. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3): 367-73.
- Bertini, L.M. *et al.* 2005. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Revista Infarma*, 17(314): 80-3.
- Castro, R.D.; Lima, E.O. 2011. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 11(3): 341-45.
- Costa, J.G.M. ; Sousa, E.O. ; Rodrigues, F.F.G.; Lima, S.G; Raimundo Braz-Filho. 2009. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3).
- Gobbo Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-81.
- Khan, R.; Islam, B.; Akram, M.; Shakil, S.; Ahmad, A.A.; Ali, S.M.; Siddiqui, M.; Khan, A.U. 2008. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 13: 1-12.
- Koketsu, M.; Gonçalves, S.L.; Godoy, R.L.O.; Lopes, D.M.N. 1997. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 17(3).
- Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L. 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16(2): 197-201.
- Lima, M.P.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Silva, T.M.D.; Fernandes, C.S. 2005. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazonica*, 35(3).
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnan, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E. 1982. Mcl. Aughlin, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45(1): 31-34.
- Moreira, A.C.P.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Dingenen, M.A.U.; Trajano, V.T. 2007. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential Oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 33-38.
- Oliveira, M.M.M.; Brugnera, D.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L.; Piccoli, R.H. 2011. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(1).
- Simões, C.M.O. *et al.* 1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed.Universitária/UFRGS/Ed.UFSC, 821pp.
- Valentini, C.M.A.; Silva, L.E.; Maciel, E.N.; Franceschini, E.; Sousa Jr., P.T.; Dall'Oglio, E.L.; Coelho, M.F.B. 2010. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. *Química Nova*, 33(7).
- Valfré, H. 1990. Fitocosmético. *Cosmetics and toiletries*, 2(5): 9-14.