

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e o seu
interesse em cosmética**

Ricardo Jorge Gonçalves Simões

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2022

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e o seu
interesse em cosmética**

Ricardo Jorge Gonçalves Simões

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2022

Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e o seu interesse em cosmética

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2022 Ricardo Jorge Gonçalves Simões

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio e por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades, mas acima de tudo pelos valores e educação que me transmitiram. Um agradecimento especial também aos meus avós, que infelizmente já não estão por cá para me verem concluir esta etapa, pelo orgulho que tinham em mim, pelo amor que me deram e por tudo o que me ensinaram.

Agradeço a todos os amigos e companheiros de curso que me acompanharam ao longo destes 5 anos pelos bons momentos e emoções que partilhamos, por tornarem esta aventura mais suportável e por contribuírem para o meu sucesso.

A todos os professores que tiveram um impacto no meu percurso por me transmitirem a sua sabedoria e por difundirem em mim a paixão que tenho para aprender novos conhecimentos.

Aos professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas por contribuírem para a minha formação académica, por enriquecerem o meu conhecimento científico e por me darem as bases necessárias para a prática profissional.

À Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel pela disponibilidade e prontidão que demonstrou ao aceitar ser a orientadora deste projeto, por me dar a total liberdade de escolha para desenvolver este tema e pela ajuda que me proporcionou ao longo da elaboração desta dissertação.

À equipa da Farmácia Albufeira por me acolherem durante o estágio e pela experiência incrível que tive. Obrigado pela simpatia, pela oportunidade que me deram para colocar em prática o que aprendi ao longo do curso, pela confiança que depositaram em mim e por estarem sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas e partilhar novos conhecimentos. Não podia ter pedido por um estágio melhor!

À equipa dos Serviços Farmacêuticos da unidade de Portimão do CHUA pela oportunidade em conhecer um lado diferente da profissão farmacêutica com o qual até então não tinha qualquer contacto.

Por fim, um obrigado a todos os que de alguma forma se cruzaram comigo e contribuíram para o meu crescimento enquanto pessoa.

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) possuem um grande interesse na indústria cosmética, estando presentes em vários produtos cosméticos e cosmeceúticos devido às suas propriedades aromáticas e conservantes. Para além disso estes também são apelativos para o consumidor pelo facto de serem ingredientes de origem natural, o que faz com que estes sejam percecionados como ingredientes seguros.

Um dos OEs mais utilizados neste contexto é o *Tea Tree Oil* (TTO), o qual é obtido a partir da destilação por arrastamento de vapor de folhas e ramos terminais de plantas do género *Melaleuca*, nomeadamente a partir da espécie *Melaleuca alternifolia* nativa do território australiano. O TTO é bastante conhecido pelas suas propriedades biológicas como a sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, as quais são principalmente atribuídas ao seu componente maioritário, o terpinen-4-ol. À conta destas características o TTO tem sido alvo de vários estudos com o intuito de averiguar o seu interesse e sua aplicabilidade na acne, dermatite seborreica, envelhecimento cutâneo, saúde oral, onicomicose e higiene das mãos. Contudo, ao mesmo tempo o TTO pode estar associado a algumas reações adversas como as dermatites de contacto e reações de hipersensibilidade.

Assim o objetivo desta dissertação é descrever o uso do TTO em produtos cosméticos e cosmeceúticos, a sua composição e propriedades biológicas, bem como as principais reações adversas associadas à sua utilização. Serão também abordados aspetos relacionados com a produção do TTO e a legislação dos produtos cosméticos e cosmeceúticos.

Palavras-chave: *Australian Tea Tree*, cosmeceúticos, cosméticos, *Melaleuca alternifolia*, óleos essenciais, *Tea Tree Oil*

ABSTRACT

Essential oils (OEs) are of great interest in the cosmetic industry, being present in several cosmetics and cosmeceuticals due to their aromatic and preservative properties. In addition, they are also appealing to the consumer as they are natural ingredients, which makes them be perceived as safe ingredients.

Tea tree oil (TTO) is one of the most used OEs in this context and is obtained by steam distillation of leaves and terminal branches of the genus *Melaleuca*, mostly of *Melaleuca alternifolia* species which are native to Australia. TTO is well known for its biological properties, such as its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities, that are mainly attributed to its major component, terpinen-4-ol. Due to these characteristics, TTO has been the subject of many studies in order to evaluate its interest and application in acne, seborrheic dermatitis, skin aging, oral health, onychomycosis and hand hygiene. However, at the same time, TTO may be associated with some adverse reactions such as contact dermatitis and hypersensitivity reactions.

Thus, the objective of this dissertation is to describe the use of TTO in cosmetics and cosmeceuticals, its composition and biological properties, as well as the main adverse reactions associated with its use. Aspects related to the production of TTO and legislation on cosmetics and cosmeceuticals will also be addressed.

Keywords: Australian Tea Tree, cosmeceuticals, cosmetics, essential oils, *Melaleuca alternifolia*, Tea Tree Oil

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. Introdução	1
2. Objetivo	4
3. Definição de cosmético, medicamento e cosmecêutico	4
4. A pele, a sua composição e estrutura	5
5. Regulamentação e Legislação dos produtos cosméticos	8
6. Cosmetovigilância	10
7. <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden et Betche) Cheel	11
7.1. Classificação e caracterização	11
7.2. Distribuição geográfica	13
8. Óleos essenciais de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Tea Tree Oil)	14
8.1. Processo de produção	14
8.1.1. Plantação e colheita da <i>M. alternifolia</i>	14
8.1.2. Extração dos óleos essenciais	15
8.2. Composição química e caracterização física.....	17
8.3. Fatores que podem afetar a composição e qualidade	20
8.3.1. Quimiotipos de <i>M. alternifolia</i>	20
8.3.2. Métodos de secagem.....	22
8.3.3. Condições de armazenamento	23
8.3.4. Adulteração.....	23
8.4. Propriedades biológicas.....	24
8.4.1. Atividade anti-inflamatória.....	24
8.4.2. Atividade antibacteriana	26
8.4.3. Atividade antifúngica	29
8.4.4. Atividade antiviral	30
8.4.5. Atividade antiparasitária.....	31
8.4.6. Atividade antioxidante.....	32
8.4.7. Atividade antitumoral	33

8.5.	Interesse e aplicações	34
8.5.1.	Acne vulgaris	35
8.5.2.	Dermatite seborreica e caspa	38
8.5.3.	Envelhecimento cutâneo	40
8.5.4.	Halitose, placa bacteriana, cáries e gengivite	41
8.5.5.	Onicomicose	42
8.5.6.	Higiene das mãos	43
9.	Reações adversas associadas ao uso de produtos cosméticos com <i>Tea Tree Oil</i>.....	44
10.	Conclusões	48
11.	Bibliografia	49
12.	Anexos	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Alguns exemplos de produtos cosméticos contendo TTO	3
Figura 4.1. Estrutura anatómica da pele	5
Figura 4.2. Estrato córneo e filme hidrolipídico	7
Figura 7.1. <i>Melaleuca alternifolia</i>	12
Figura 7.2. Flores da espécie <i>Melaleuca alternifolia</i>	12
Figura 7.3. Distribuição nativa da espécie <i>Melaleuca alternifolia</i>	13
Figura 8.1. Plantações de <i>Melaleuca alternifolia</i> em viveiros	14
Figura 8.2. Colheita de plantações de <i>Melaleuca alternifolia</i>	15
Figura 8.3. Esquema ilustrativo da extração de óleos essenciais por destilação por arrastamento de vapor em meio industrial	17
Figura 8.4. Principais constituintes presentes no TTO e as respectivas estruturas químicas	18
Figura 8.5. Mecanismo proposto para a síntese de monoterpenos no TTO	21
Figura 9.1. Mecanismo proposto para a oxidação do α -terpineno em <i>p</i> -cimeno	48

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1. Categorias de produtos cosméticos contendo TTO presentes no mercado entre Outubro e Novembro de 2015	3
Quadro 8.1. Espécies bacterianas sobre as quais alguns componentes presentes no TTO podem ter ação antibacteriana	28
Quadro 8.2. Tipos de lesões presentes na acne	35
Quadro 8.3. Classificação da acne em ligeira, moderada e severa	36
Quadro 9.1. Lista das 26 fragrâncias com potencial alergénico identificadas pela diretiva europeia	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 8.1. Concentrações dos principais componentes do TTO segundo a ISO 4730:2017	19
Tabela 8.2. Propriedades físicas do TTO segundo a ISO 4730:2017	19
Tabela 8.3. ZIs do TTO para várias bactérias gram-positivas e gram-negativas em comparação com a gentamicina e cefoxitina, respetivamente	26
Tabela 8.4. MICs do TTO para diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas	27
Tabela 8.5. ZIs do TTO para várias espécies de <i>Candida</i> spp. em comparação com o fluconazol	29
Tabela 8.6. MICs do TTO para diferentes espécies de <i>Candida</i> spp.	30
Tabela 8.7. Atividade antioxidante expresso em EC ₅₀ do TTO em comparação com antioxidantes naturais	33
Tabela 9.1. Possíveis agentes sensibilizadores encontrados no TTO por percentagem de testes positivos em vários casos reportados na literatura	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ATTIA – *Australian Tea Tree Industry Association*

CE – Comissão Europeia

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC₅₀ – Concentração para obter metade do efeito máximo

EIG – Efeitos Indesejáveis Graves

HSV-1 – Vírus *Herpes Simplex* tipo 1

HSV-2 – Vírus *Herpes Simplex* tipo 2

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento

MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*

MICs – *Minimal Inhibitory Concentrations*

OE – Óleo essencial

OEs – Óleos essenciais

TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances*

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*

TTBP – *Tea Tree Breeding Program*

TTO – *Tea Tree Oil*

UV – Ultravioleta

VSC – *Volatile Sulphur Compounds*

ZI – Zona de inibição

ZIs – Zonas de inibição

1. Introdução

Os produtos cosméticos são utilizados há muito tempo por diferentes culturas para modificar aspetos externos e melhorar a autoestima, tendo em conta os padrões de beleza estabelecidos pela sociedade (1). Acredita-se que o seu uso iniciou-se com a civilização egípcia, a qual utilizava cremes, óleos, perfumes e maquilhagem para cuidar da sua higiene e aparência, sendo os óleos e perfumes também aplicados em práticas religiosas e divinas (1,2). Com o desenvolvimento da ciência e a preocupação crescente da sociedade com a saúde e com o cuidado da pele, a área da cosmética ganhou uma maior importância e atualmente os produtos cosméticos fazem parte do dia-a-dia de grande parte da população (1).

Nas formulações dos produtos cosméticos é frequente encontrar óleos essenciais (OEs), que são definidos como compostos aromáticos de natureza volátil e composição complexa obtidos a partir de várias partes de plantas aromáticas por destilação por arrastamento de vapor ou por expressão, no caso dos pericarpos dos citrinos. Estes compostos são incorporados nos produtos cosméticos principalmente devido às suas propriedades aromáticas e antimicrobianas, tornando os cosméticos mais atrativos para o consumidor ao mesmo tempo que funcionam como agentes conservantes (3,4). Para além disso, os OEs são compostos naturais considerados pelos consumidores como compostos seguros e não tóxicos em comparação aos ingredientes de origem sintética, os quais também estão associados a custos mais elevados e a um maior impacto ambiental (3–5). Por estas razões, o mercado dos OEs apresenta um grande potencial para a indústria cosmética e não só. A nível global, segundo um estudo feito em 2018, este mercado excedeu os 7,51 biliões de dólares americanos nesse ano e espera-se um crescimento médio anual deste mercado superior a 9% entre 2019 e 2026 (3).

O *Tea Tree Oil* (TTO) é um dos OEs mais usado em produtos cosméticos e, segundo a norma internacional ISO 4730:2017, é obtido a partir da destilação por arrastamento de vapor das folhas e ramos terminais de plantas do género *Melaleuca*, nomeadamente a partir das espécies *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel e *Melaleuca linariifolia* Smith (4,6,7). De acordo com outras fontes bibliográficas, como a Farmacopeia Europeia, também podem ser elegíveis para a produção de TTO outras espécies como a *Melaleuca dissitiflora* F. Muell. Contudo, na prática a espécie mais usada para a produção de TTO é a *M. alternifolia*, pois é uma espécie abundante, de fácil cultivo e crescimento rápido, sendo por isso considerada uma fonte de TTO constantemente renovável (6,8). Por esta razão, frequentemente na literatura os termos TTO e óleos essenciais de *M. alternifolia* são usados sem distinção.

As propriedades medicinais das folhas do género *Melaleuca* são conhecidas desde há muitos anos pelas tribos aborígenes australianas. Estas tribos maceravam as folhas destas plantas em água de modo a extrair os seus OEs, os quais eram utilizados para o tratamento da constipação, picadas de insetos, feridas ou até mesmo infeções fúngicas a nível cutâneo, entre outras aplicações (4,9). No entanto, as propriedades antissépticas, antibacterianas e antifúngicas do TTO, só foram descritas e publicadas pela primeira vez após a sua destilação em 1925 (9).

Depois de descobertas estas propriedades, o TTO começou a ser utilizado como agente antisséptico em cirurgias (9). Segundo algumas fontes bibliográficas, o TTO chegou até a ser usado pelo exército australiano durante a Segunda Guerra Mundial como repelente de insetos e como agente antisséptico e antimicrobiano nos *kits* de primeiros socorros (9,10). Contudo, com a descoberta e o aumento do uso da penicilina, o TTO perdeu a sua importância, e só voltou a ser alvo de pesquisa na década de 1970 devido ao desenvolvimento das resistências aos antibióticos e ao aumento do interesse na medicina tradicional e nos compostos naturais com potencial terapêutico (9).

Atualmente, segundo o *Committee on Herbal Medicinal Products*, o TTO pode ser utilizado para o tratamento de pequenas feridas superficiais, picadas de insetos, pequenas inflamações da mucosa oral e para o tratamento da acne moderada, bem como para o alívio do prurido e irritação no pé de atleta (11). Apesar do TTO ter sido alvo de vários estudos ao longo dos anos, ainda não existe evidência suficiente que comprove a sua eficácia terapêutica por meio de ensaios clínicos (11). Contudo, como o TTO já é utilizado há vários anos com estas finalidades, considera-se que a sua eficácia e segurança está comprovada porque existem dados que provam a sua utilização terapêutica durante pelo menos 30 anos, incluindo pelo menos 15 anos na União Europeia (11).

Atualmente, o TTO é também aplicado em vários produtos cosméticos tais como, por exemplo, geles de limpeza e esfoliação facial, champôs e condicionadores ou até mesmo em produtos para a lavagem das mãos com ação antibacteriana (**Figura 1.1.**) (12).



Figura 1.1. Alguns exemplos de produtos cosméticos contendo TTO, adaptado de (12).

De facto, a dimensão dos produtos cosméticos contendo este óleo essencial (OE) é muito vasta. Segundo uma pesquisa feita entre Outubro e Novembro de 2015, foram encontrados nos sites dos principais fornecedores de produtos cosméticos a nível europeu cerca de 1326 produtos contendo TTO, de 360 marcas diferentes (12). Para ter uma ideia da variedade destes produtos, são apresentadas no **Quadro 1.1.** todas as categorias dos produtos cosméticos contendo TTO que foram identificadas nesse estudo (12).

Quadro 1.1. Categorias de produtos cosméticos contendo TTO presentes no mercado entre Outubro e Novembro de 2015, adaptado de (12).

- Produtos para o cuidado da pele
- Produtos de banho, limpeza corporal e limpeza das mãos
- Desodorizantes
- Produtos para o tratamento de manchas
- Produtos para o cuidado do cabelo
- Produtos para o cuidado dos pés
- Produtos decorativos
- Produtos para penteados
- Produtos sem área de uso rotulada

2. Objetivo

Esta dissertação tem como objetivo descrever o uso do TTO em produtos cosméticos e cosmecêuticos, a sua composição e propriedades biológicas, bem como as principais reações adversas associadas à sua utilização. Serão também abordados aspectos relacionados com a produção do TTO e a legislação dos produtos cosméticos e cosmecêuticos.

3. Definição de cosmético, medicamento e cosmecêutico

Como esta dissertação se irá focar nas aplicações dos OEs de *M. alternifolia* em produtos cosméticos e cosmecêuticos, é importante definir o que são produtos cosméticos e cosmecêuticos e explicar de que modo estes diferem de um medicamento.

Por definição, um produto cosmético é qualquer substância ou mistura preparada para ser aplicada sobre as partes externas do corpo humano (tais como a epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou destinada a ser aplicada sobre os dentes e mucosas bucais (13). Para um produto ser classificado como cosmético, para além disso, tem de ter como função exclusiva ou principal limpar, perfumar, modificar o aspeto, proteger ou manter em bom estado estas estruturas, podendo também ser utilizados para corrigir odores corporais (13). Assim, os produtos cosméticos podem ser divididos em duas categorias: produtos de higiene corporal e produtos de beleza (14). Os produtos de higiene incluem por exemplo sabonetes, geles de banho, champôs, desodorizantes ou pastas dentífricas. Por sua vez, os produtos de beleza incluem por exemplo, tintas capilares, vernizes e maquilhagem (14).

Por outro lado, um medicamento é definido como: “toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (15).

Apesar das definições de produto cosmético e medicamento serem diferentes, por vezes a composição, o local de aplicação, a apresentação ou o modo de ação de um produto pode induzir em dúvida a sua classificação numa destas categorias (14). Quando isso acontece o produto é designado como um produto fronteira e a sua utilização deve ser avaliada de acordo com a

situação específica, tendo em conta todas as suas características e as normas orientadoras que são publicadas pela Comissão Europeia (14).

Frequentemente na literatura os termos cosmético e cosmecêutico são usados sem qualquer tipo de distinção, embora na realidade estes sejam termos diferentes. Apesar do termo cosmecêutico ser relativamente recente e da sua definição ainda não ser consensual, de uma forma simples, pode dizer-se que um cosmecêutico é um produto cosmético, no sentido em que é aplicado a nível externo, mas que tem uma ação benéfica sobre a pele. Ou seja, um cosmecêutico é um produto fronteira entre medicamento e produto cosmético. Contudo, a maioria dos cosmecêuticos é introduzida no mercado europeu da mesma forma que um cosmético, pois os cosmecêuticos não são reconhecidos a nível legal, ou seja carecem de legislação própria (16).

4. A pele, a sua composição e estrutura

A maior parte dos produtos cosméticos e cosmecêuticos são aplicados sobre a pele, por isso torna-se necessário compreender a composição e estrutura deste órgão para entender os aspetos essenciais relacionados com a formulação e função destes produtos.

A pele é o maior órgão do corpo humano e pode ser dividida em 3 camadas: epiderme, derme e hipoderme (**Figura 4.1**). A espessura de cada uma destas camadas é variável de acordo com a região anatómica e também varia de indivíduo para indivíduo (17–19).

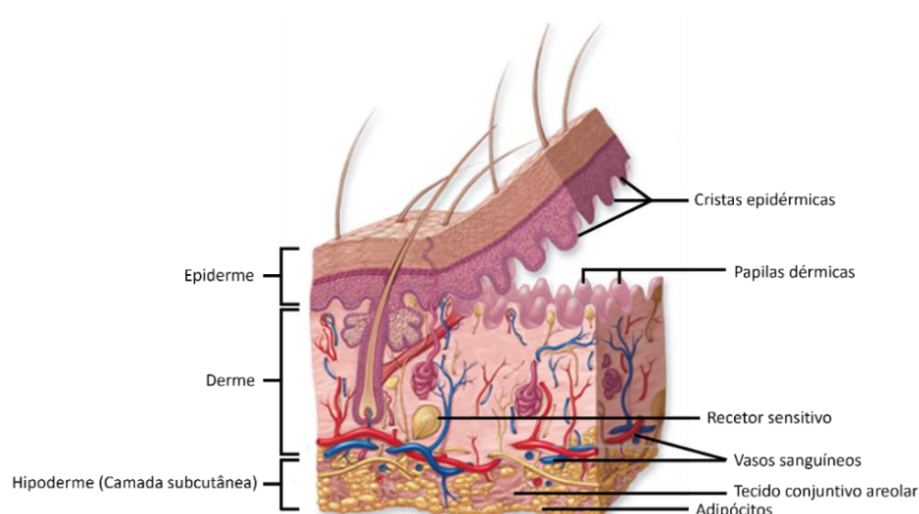


Figura 4.1. Estrutura anatómica da pele, adaptado de (18)

Destas camadas, a epiderme é a camada mais superficial e a que está em contacto direto com o exterior, servindo de barreira contra os mais variados agentes agressores, incluindo a radiação ultravioleta (UV) e microrganismos potencialmente patogénicos. A epiderme é constituída por um epitélio escamoso estratificado queratinizado organizado em 5 camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (exclusivo das palmas das mãos e da planta dos pés) e estrato córneo. No estrato basal (camada mais profunda da epiderme), os queratinócitos (células produtoras de queratina) estão dispostos numa única camada de células e possuem um elevado potencial mitótico. À medida que os queratinócitos migram do estrato basal para as camadas superiores estes vão perdendo a capacidade de divisão e vão tornando-se cada vez mais diferenciados. Este processo tem o nome de queratinização. No estrato córneo, que corresponde à camada superficial da epiderme, os queratinócitos atingem a fase final da diferenciação, perdendo o núcleo e os restantes organelos celulares e passando a designar-se por corneócitos, células mortas ricas em filamentos de queratina envolvidas por lípidos (ceramidas, colesterol e ácidos gordos) sintetizados pelos queratinócitos. O estrato córneo, devido ao seu conteúdo em queratina e lípidos, atua não só como barreira protetora contra o meio externo, mas também permite regular a perda de água da pele. Outras células da epiderme incluem os melanócitos (células produtoras de melanina), células de Langerhans (células apresentadoras de antígenos) e células de Merkel (células com função sensorial) (17–19).

À superfície da epiderme existe ainda um filme hidrolipídico (**Figura 4.2**) que consiste numa emulsão de água e lípidos resultante da secreção de suor e sebo produzidos pelas glândulas sudoríparas e sebáceas, respetivamente. Este filme hidrolipídico atua como uma barreira adicional contra a perda de água transepidérmica e contra agentes agressores externos. Ao mesmo tempo é responsável pelo pH ligeiramente ácido da pele, fundamental para o crescimento dos microrganismos benéficos para a pele (20,21).

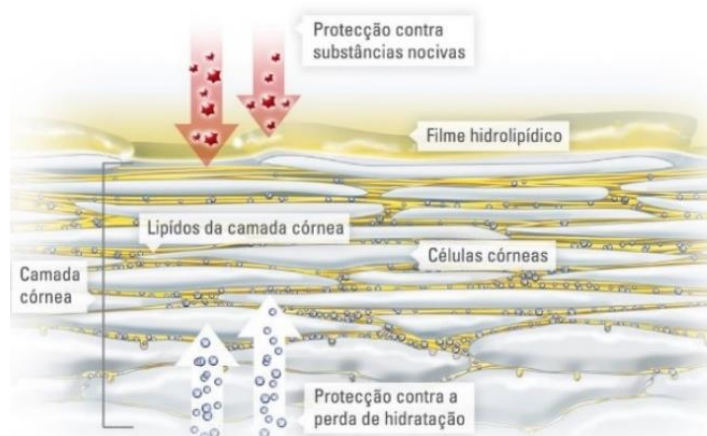


Figura 4.2. Estrato córneo e filme hidrolipídico (21)

A epiderme é um tecido não vascularizado e por essa razão necessita de um tecido de suporte que forneça os nutrientes e o oxigénio às suas células – a derme. A troca de nutrientes entre a derme e a epiderme é feita por difusão através de uma membrana basal que separa estas duas camadas da pele. Outras funções da derme que merecem destaque são o seu papel ativo na termorregulação e na receção de estímulos externos. Em termos de composição, de uma forma simples, a derme consiste num tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio e elastina que lhe dão estrutura e flexibilidade, respetivamente. Na derme existem ainda células músculo liso, terminais nervosos, estruturas anexas (glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e folículos pilosos), leucócitos, mastócitos e células dendríticas (17–19).

Por fim, a camada mais profunda da pele corresponde à hipoderme ou camada subcutânea, um tecido conjuntivo frouxo cuja função é ligar a pele aos órgãos subjacentes. Este tecido contém adipócitos, é altamente vascularizado e tem um papel importante na produção de vitamina D. Muitos fármacos são administrados neste tecido, como é o caso da insulina devido à rápida absorção que este tecido proporciona (17–19).

5. Regulamentação e Legislação dos produtos cosméticos

A nível europeu, os produtos cosméticos são regulados pelo Regulamento (CE) N.º1223/2009 que estabelece que todos os produtos cosméticos colocados no mercado devem ser seguros para a saúde humana (22).

Para que um produto cosmético possa ser colocado no mercado tem de haver na Comunidade Europeia uma pessoa responsável por esse mesmo produto cosmético, a qual pode ser o próprio fabricante ou uma outra entidade por ele a designar. A função da pessoa responsável passa por garantir que o produto cosmético cumpre o regulamento e as boas práticas de fabrico. Para isso a pessoa responsável deve assegurar a realização de uma avaliação da segurança do produto cosmético por um profissional devidamente qualificado, o qual irá emitir um relatório de segurança e que terá de ser atualizado regularmente após a colocação no mercado. A pessoa responsável deve ainda transmitir à Comissão Europeia (CE) um conjunto de informações, tais como (22):

- A categoria a que pertence o produto cosmético e a sua designação;
- O país de origem (em caso de importação);
- O Estado-Membro em que se prevê a colocação do produto cosmético;
- A presença de nanomateriais e a sua identificação segundo a denominação química (IUPAC);
- A identificação de substâncias classificadas como cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução;
- A formulação-quadro do produto com indicações da categoria ou a função dos ingredientes e a sua concentração máxima no produto cosmético.

O Regulamento (CE) N.º1223/2009 também define que todos os produtos cosméticos colocados no mercado devem ter um ficheiro de informações com a descrição do produto cosmético e do processo de fabrico, uma declaração de conformidade com as boas práticas de fabrico e o relatório de segurança. Para além disso, também devem constar do ficheiro de informações documentos que comprovem o efeito do produto cosmético sempre que isso se justifique. Depois de ser colocado no mercado, a pessoa responsável deve conservar o ficheiro de informações sobre o produto por um período de 10 anos após a data de colocação no mercado do último lote do produto cosmético (22).

Aquando da colocação do produto cosmético no mercado, a pessoa responsável deve também notificar a CE da rotulagem original e facultar uma fotografia da embalagem correspondente. De uma forma geral na rotulagem devem constar (22):

- O nome ou a firma e o endereço da pessoa responsável;
- A data de durabilidade mínima até à qual o produto cosmético continua a desempenhar a sua função quando armazenado em condições adequadas);
- As precauções especiais de utilização;
- O número de lote de fabrico;
- A função do produto cosmético;
- A lista de ingredientes por ordem decrescente até à concentração de 1%, sendo que os ingredientes com concentrações <1% podem ser apresentados sem qualquer ordem em particular.¹

Na rotulagem não devem constar qualquer tipo de alegações que atribuam características ou funções aos produtos cosméticos que estes não possuam (22).

Para além da pessoa responsável, os distribuidores também têm obrigações a cumprir de modo a garantir que o produto cosmético que disponibilizam no mercado segue os requisitos necessários em termos de rotulagem (incluindo requisitos linguísticos), que a data de durabilidade mínima especificada não está ultrapassada e que as condições de armazenamento ou transporte não prejudicam a conformidade do produto. Sempre que a pessoa responsável ou o distribuidor considerar que o produto cosmético não está de acordo com o regulamento, estes devem tomar as medidas corretivas necessárias para assegurar a conformidade do produto. Se tal não for possível, a pessoa responsável ou o distribuidor pode solicitar a retirada ou recolha do produto do mercado (22).

Sempre que o produto apresente riscos para a saúde, a pessoa responsável e o distribuidor devem informar e colaborar com as autoridades nacionais competentes dos Estados-Membros da Comunidade Europeia nos quais o produto foi disponibilizado, com o objetivo de eliminar esses riscos (22). No caso de Portugal, essa autoridade é a Autoridade Nacional do Medicamento (INFARMED), a qual possui uma Unidade de Inspeção que assegura a

¹ Na formulação de cosméticos existem algumas substâncias cujo uso é restrito ou até mesmo proibido em produtos cosméticos, estando elas identificadas no Regulamento (CE) N.º1223/2009 (22).

fiscalização do mercado de produtos cosméticos e efetua a supervisão das entidades em todo o circuito de fabrico e de distribuição em Portugal, com o objetivo de garantir o cumprimento da legislação em vigor e a proteção da saúde pública dos consumidores (23).

Assim, algumas das funções da Unidade de Inspeção do INFARMED são (23):

- Verificar a conformidade dos produtos cosméticos colocados no mercado e monitorizar a rotulagem e a distribuição indevida de produtos cosméticos contendo alegações ou reivindicações terapêuticas, em colaboração com a Direção de Produtos de Saúde;
- Inspeccionar em colaboração com a Direção de Produtos de Saúde as entidades que desenvolvam atividades de fabrico e importação de produtos cosméticos e as entidades que se apresentem como pessoas responsáveis;
- Inspeccionar e controlar as entidades que desenvolvam atividades de distribuição e disponibilização de produtos cosméticos;
- Cooperar na recolha de amostras de produtos cosméticos para comprovação da sua qualidade, em colaboração com a Direção de Comprovação da Qualidade.

6. Cosmetovigilância

Após a introdução no mercado, os produtos cosméticos continuam a ser alvo de controlo pelas autoridades competentes nos outros Estados-Membros da Comunidade Europeia. Uma das formas de efetuar esse controlo é através do sistema de cosmetovigilância que consiste na recolha, avaliação e monitorização das notificações espontâneas de efeitos indesejáveis observados durante ou após a utilização normal ou razoavelmente previsível de um produto cosmético (24).

A notificação dos efeitos adversos é muito importante de modo a melhorar a informação relativa à segurança dos produtos cosméticos e reduzir a probabilidade de recorrência de efeitos indesejáveis graves (EIG) associados ao seu uso. Entende-se por EIG situações que resultem na perda da capacidade funcional (temporária ou permanente) ou situações que resultem em invalidez, hospitalização, anomalias congénitas, risco de vida imediato ou morte (24).

Sempre que um profissional de saúde ou o utilizador final do produto cosmético suspeitem de um EIG podem fazer a sua notificação à pessoa responsável ou ao distribuidor, os quais são

obrigados pelo Regulamento (CE) N.º1223/2009 a comunicar o EIG à autoridade competente do Estado-Membro onde este ocorreu. Caso o EIG ocorra em Portugal a pessoa responsável/distribuidor final terá de preencher o Formulário A (**Anexo I**) e enviá-lo por *e-mail* para o INFARMED (24,25).

No entanto, também é possível o profissional de saúde ou o utilizador final fazer a notificação do EIG diretamente à autoridade competente do Estado-Membro onde este ocorreu. Em Portugal este tipo de notificação pode ser feito por meio da plataforma “Reporte!” no site do INFARMED (24,25).

Uma vez comunicados, os efeitos indesejáveis vão ser analisados pelo INFARMED tendo em conta fatores como os sintomas reportados, a sequência temporal entre a utilização do produto cosmético e a ocorrência do alegado efeito indesejável e o reaparecimento da sintomatologia inicial após a reexposição ao produto cosmético. O objetivo final da análise será estabelecer uma relação causal entre o efeito indesejável reportado e o uso do produto cosmético suspeito de provocar esse efeito indesejável (26).

A conclusão da investigação dos efeitos indesejáveis pelas autoridades competentes, em certas situações, pode levar a medidas corretivas como por exemplo a alteração da rotulagem do produto cosmético, ou até mesmo à retirada temporária ou definitiva do produto do mercado, caso isso se justifique (25).

7. *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel

7.1. Classificação e caracterização

Do ponto de vista taxonómico, a espécie *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel pertence ao género *Melaleuca*, o qual inclui cerca de 250 espécies, e à família Myrtaceae (9,27). A família Myrtaceae é uma família de plantas dicotiledóneas da ordem Myrtales e a oitava família de plantas mais vasta, possuindo vários géneros de interesse económico e ecológico a nível mundial (27). A espécie *M. alternifolia* é frequentemente designada pelo nome comum *Australian Tea Tree* devido às propriedades aromáticas das suas folhas que eram utilizadas para fazer chá (9).

M. alternifolia (**Figura 7.1.**) é caracterizada como sendo um arbusto ou uma pequena árvore, cuja altura pode ir dos 4 aos 7 metros, com uma casca de papel macio em camadas e ramos glabrescentes. As folhas desta planta são lineares, com 1 a 3,5 cm de comprimento e

1 mm de largura, não possuem pelos e são ricas em OEs. As folhas nascem de um pecíolo com cerca de 1 mm de comprimento e dispõem-se de forma alternada em espiral (28).



Figura 7.1. *Melaleuca alternifolia* (27)

As flores desta espécie são brancas e solitárias, ou seja, por cada bráctea apenas existe uma flor com pétalas de 2 a 3 mm de comprimento (**Figura 7.2.**). As inflorescências apresentam-se na forma de espigas com 3 a 5 cm de comprimento. Os estames (parte masculina da planta) apresentam-se na forma de vários feixes, e em cada feixe podem existir entre 30-60 estames. Os estiletos (parte feminina da planta) têm cerca de 3-4 mm. Os frutos desta espécie são espaçados ao longo dos ramos e têm a forma de uma taça com 2-3 mm de diâmetro. Cada fruto tem um orifício com 1,5-2,5 mm de diâmetro que permite a libertação e dispersão das suas sementes pelo vento (28).



Figura 7.2. Flores da espécie *Melaleuca alternifolia* (9)

7.2. Distribuição geográfica

A espécie *M. alternifolia* é nativa das regiões de Nova Gales do Sul e Queensland na Austrália (**Figura 7.3.**). No caso da região de Nova Gales do Sul, a *M. alternifolia* cresce em zonas mais planas, costeiras e de clima quente e húmido. Por sua vez, em Queensland esta espécie cresce em zonas mais elevadas caracterizadas por um clima mais fresco e seco. Teoriza-se que estas diferenças geográficas possam ser responsáveis por pequenas alterações genéticas que se traduzam em alterações na composição do TTO. Este aspeto irá ser discutido em detalhe no capítulo 8.3.1. (28,29).



Figura 7.3. Distribuição nativa da espécie *M. alternifolia* (28)

Uma espécie diz-se nativa de uma região quando surge de forma espontânea na natureza, mas isso não significa que essa mesma espécie não possa ocorrer noutras regiões por meio de cultivo. Na realidade, face ao aumento do consumo de TTO, *M. alternifolia* foi introduzida em vários países como o Brasil, China, Indonésia, Quênia, Madagáscar, Malásia, África do Sul, Tanzânia, Tailândia, Estados Unidos e Zimbábue (6). No entanto, o principal produtor de TTO a nível mundial continua a ser a Austrália (6,8).

Contudo, é importante referir que o cultivo de *M. alternifolia* fora do território nativo não é recomendado pelo *Institute of Food and Agricultural Sciences* da Universidade da Florida, pelo facto de esta ser considerada uma espécie com grande potencial invasivo e que pode ameaçar a flora local (30).

8. Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil)

8.1. Processo de produção

Inicialmente, o TTO era obtido apenas e exclusivamente de plantas selvagens da espécie *M. alternifolia* nativas do território australiano, sendo o processo de colheita feito manualmente. Contudo, face ao aumento do consumo deste OE foi necessário proceder ao cultivo desta espécie em grande escala. Paralelamente, de modo a melhorar a qualidade e o rendimento do TTO foi criado na Austrália um programa chamado de *Tea Tree Breeding Program* (TTBP) através do qual foram selecionadas e colonizadas as linhagens de *M. alternifolia* conhecidas por proporcionar OEs de melhor qualidade e com melhores rendimentos. Este programa veio então reduzir a variabilidade na composição do TTO proveniente de diferentes produtores, contribuindo simultaneamente para a sustentabilidade ambiental (29,31).

8.1.1. Plantação e colheita da *M. alternifolia*

Segundo a *Australian Tea Tree Industry Association* (ATTIA), uma organização que representa a produção industrial de TTO na Austrália (principal produtor mundial de TTO), as sementes de *M. alternifolia*, previamente selecionadas pelo TTBP, são colocadas em água durante vários dias para amolecer a sua camada externa antes de serem colocadas em viveiros (**Figura 8.1**) para germinar (processo através do qual a semente dá origem à planta). Posteriormente, quando as plantas têm entre 2 a 4 semanas é feita a sua separação em células individuais onde irão continuar o seu crescimento durante 2 a 4 meses e possam então ser transplantadas para campos de cultivo adequados ao seu desenvolvimento (31).



Figura 8.1. Plantações de *M. alternifolia* em viveiros (31)

Após serem transplantadas para campos de cultivo, a primeira colheita é feita após 12-14 meses (**Figura 8.2**). A seguir à primeira colheita as árvores são rapidamente regeneradas e podem ser efetuadas novas colheitas anualmente com melhores rendimentos após 2-3 anos (31).



Figura 8.2. Colheita de plantações de *M. alternifolia* (32)

Depois da colheita e antes da extração dos OEs pode haver ainda uma etapa de secagem. A secagem é o principal método de conservação de plantas aromáticas e medicinais e consiste em reduzir o teor de água das plantas, por evaporação, de modo a diminuir os riscos de contaminação microbiológica e evitar as reações químicas com o objetivo de preservar as suas características e aumentar o período de conservação à temperatura ambiente (33). No entanto, a secagem pode afetar a composição do TTO dependendo do método aplicado (34). Por exemplo, a aplicação de micro-ondas no processo de secagem pode danificar as células das plantas facilitando a libertação de compostos voláteis como os OEs enquanto que a aplicação de radiação na gama dos infravermelhos promove a oxidação e o rearranjo das estruturas químicas levando à produção de novos compostos (34).

8.1.2. Extração dos óleos essenciais

Os OEs são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e são armazenados em estruturas secretoras especializadas que se podem localizar em diferentes partes da planta (flores, folhas, sementes, frutos, entre outros), e a sua extração pode ser feita recorrendo a métodos de expressão ou destilação, como por exemplo, a destilação arrastamento de vapor ou hidrodestilação (35,36).

A escolha do método de extração é muito importante para obter OEs de qualidade e com as características desejadas, uma vez que a escolha de um método de extração inadequado pode alterar a composição química do OE e conseqüentemente levar à perda das suas propriedades. Assim, de um modo geral a escolha do método vai estar dependente das características da planta e da parte da planta que é usada para extrair os OEs. Por exemplo, a expressão é o método mais indicado para a extração de OEs do epicarpo de plantas do género *Citrus* (36,37).

Segundo a ISO 4730:2017, a extração do TTO com finalidades comerciais é feita por destilação por arrastamento de vapor partir das folhas e dos ramos terminais da *M. alternifolia* (7).

De uma forma geral, a destilação por arrastamento de vapor é o método de extração mais usado para extrair OEs (37). Neste método o material vegetal é colocado num destilador sobre uma rede, de modo a possibilitar a passagem de vapor de água pelo material vegetal. Esse vapor de água irá provocar a rutura da estrutura celular do material vegetal, permitindo a libertação dos OEs por ação do calor. O vapor de água também pode ser produzido por um gerador externo, tal como se verifica na **Figura 8.3**. Por isso, um dos pontos fundamentais deste processo é a temperatura de aquecimento, a qual deve ser suficiente para promover a libertação dos OEs no estado gasoso. À medida que os OEs são libertados forma-se uma mistura de voláteis que constituirão o futuro OE com vapor de água, a qual é conduzida para um condensador. Após atravessar o condensador a mistura gasosa passa para o estado líquido. Uma vez no estado líquido, devido à diferença de densidades, os OEs são facilmente separados da mistura aquosa. A quantidade de OE produzida por este método depende de quatro critérios principais: a duração do tempo de destilação, a temperatura, a pressão de operação e, mais importante, o tipo e a qualidade do material vegetal. Normalmente, o rendimento de OEs de plantas está entre 0,005 e 10% (37–39).

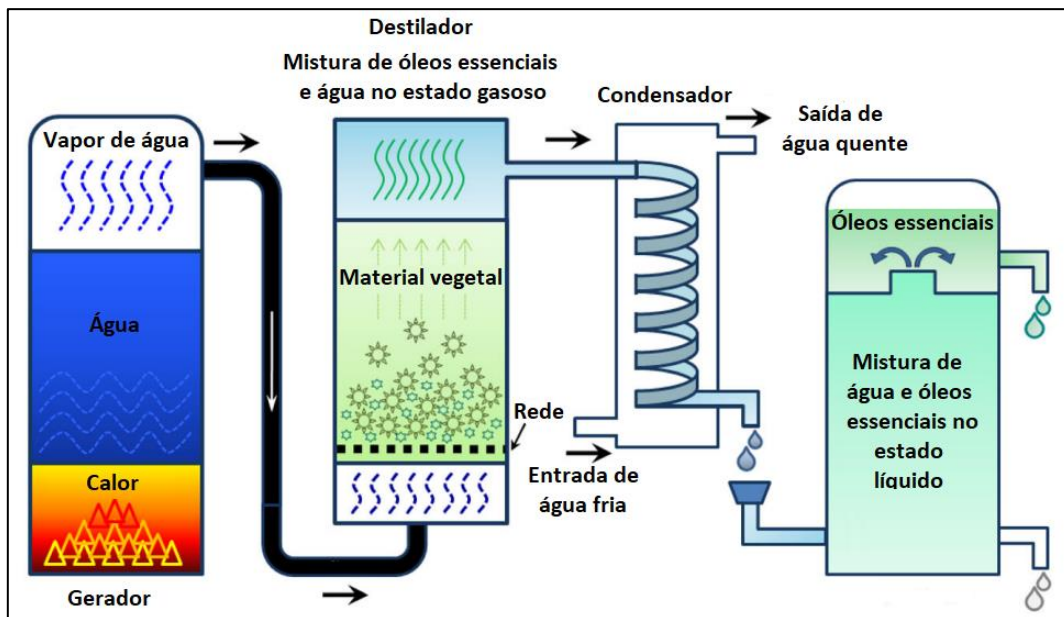


Figura 8.3. Esquema ilustrativo da extração de OEs por destilação por arrastamento de vapor em meio industrial, adaptado de (37).

A destilação por arrastamento de vapor apresenta várias vantagens relativamente a outros métodos de extração, nomeadamente pelo facto de ter uma elevada eficiência energética e permitir obter OEs com uma elevada qualidade, ser um método relativamente fácil de controlar, barato (quando aplicado em pequena escala) e que não leva à decomposição de grande parte dos componentes dos OEs. A principal desvantagem da destilação por arrastamento de vapor está associada ao preço elevado do extrator de óleos essenciais (39).

Após a extração pode haver ainda uma etapa de refinamento ou purificação, utilizando métodos como a destilação a vácuo, a cristalização ou a cromatografia em coluna. Esta etapa não é obrigatória, mas permite obter um OE de maior qualidade comparativamente ao TTO não purificado, aumentando o valor comercial do TTO (40).

8.2. Composição química e caracterização física

A composição dos OEs é bastante complexa, e os seus constituintes podem incluir álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres e terpenos em proporções variadas (36).

O TTO é um bom exemplo do grau de complexidade da composição dos OEs, dado que este pode apresentar na sua composição mais de 113 componentes, embora nem todos eles estejam presentes em simultâneo. De facto, grande parte desses componentes existe em concentrações bastante reduzidas no TTO, o que faz com que não tenham um grande impacto nas características deste OE. No entanto, existem 15 componentes considerados fundamentais para um TTO de qualidade, os quais estão representados na **Figura 8.4**, e os quais devem estar dentro dos limites de concentração definidos pela ISO 4730:2017 (**Tabela 8.1**), para que o TTO possa ser comercializado. Esta norma internacional ainda faz referência a algumas características físicas que o TTO deve ter para garantir a sua autenticidade (**Tabela 8.2**) (7).

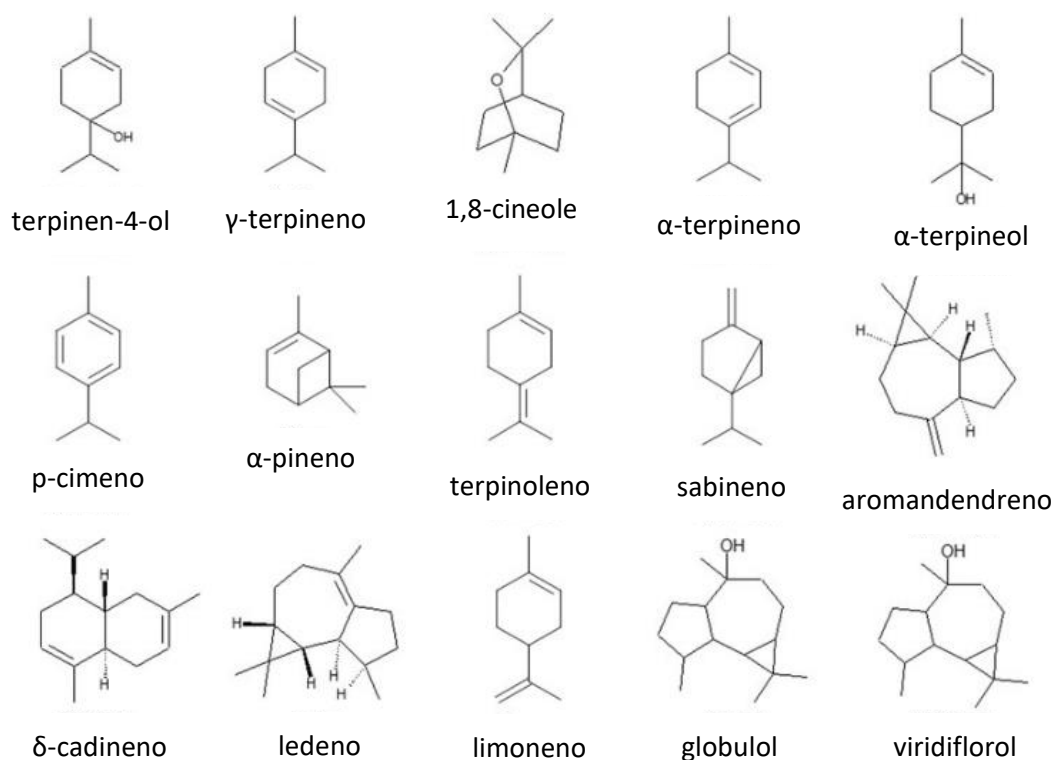


Figura 8.4. Principais constituintes presentes no TTO e as respetivas estruturas químicas, adaptado de (10).

Tabela 8.1. Concentrações dos principais componentes do TTO segundo a ISO 4730:2017, adaptado de (7).

Componente por ordem de abundância	Concentração
Terpinen-4-ol	35-48%
γ -Terpineno	14-28%
α -Terpineno	6-12%
1,8-Cineole	<0,01-10%
<i>p</i> -Cimeno	0,5-8%
Terpinoleno	1,5-5%
α -Terpineol	2-5%
α -Pino	1-4%
Sabineno	<0,01-3,5%
Aromadendreno	0,2-3%
δ -Cadineno	0,2-3%
Ledeno	0,1-3%
Limoneno	0,5-1,5%
Globulol	<0,01-1%
Viridiflorol	<0,01-1%

Tabela 8.2. Propriedades físicas do TTO segundo a ISO 4730:2017, adaptado de (7).

Propriedades físicas do TTO		
Aspetto	Líquido fluído e homogéneo	
Cor	Incolor a amarelo-claro	
Odor	Característico	
Densidade relativa (20°C)	Min: 0,885	Max: 0,906
Índice de refração (20°C)	Min: 1,475	Max: 1,482
Rotação óptica (20°C)	Min: +7°	Max: +12°
Ponto de inflamação	59 °C	
Miscibilidade com etanol (20°C)	Menos de 2 volumes de etanol a 85% para obter uma solução com 1 volume de óleo essencial	

8.3. Fatores que podem afetar a composição e qualidade

De um modo geral a atividade biológica do TTO deve-se ao terpinen-4-ol, pelo que para ter um TTO de qualidade é desejável que este óleo essencial tenha um elevado teor deste componente. Contudo, durante todo o processo de produção existem vários fatores que podem pôr em causa a composição e esses fatores devem ser estudados e contornados de forma a otimizar a qualidade do TTO. Assim, neste capítulo serão apresentados os principais fatores que podem afetar a composição e qualidade do TTO.

8.3.1. Quimiotipos de *M. alternifolia*

Mesmo antes da extração dos óleos essenciais existe um fator que deve ter sido em conta, mais concretamente, a possibilidade de existirem vários quimiotipos diferentes da mesma planta devido a uma série de fatores genéticos e ambientais, os quais podem levar à síntese de OEs com composições distintas por parte da espécie vegetal(41).

No caso de *M. alternifolia* conhecem-se 6 quimiotipos distintos. Destes quimiotipos, aquele que possui maior interesse do ponto de vista comercial é o quimiotipo que possui um OE com um maior teor em terpinen-4-ol (quimiotipo 1). Por sua vez, o quimiotipo 2 é rico em terpinoleno e o quimiotipo 3 em 1,8-cineole. Os restantes quimiotipos também são dominados pelo 1,8-cineole embora possuam percentagens variáveis de terpinen-4-ol e terpinoleno comparativamente ao quimiotipo 3 (41,42).

Segundo a informação recolhida num estudo em que foram analisados os quimiotipos de TTO de várias árvores de *M. alternifolia* em 3 regiões na Austrália, verificou-se que o quimiotipo 1 foi encontrado em maior número nas regiões perto dos rios Clarence e Richmond (no norte de New Southwales) e estava praticamente ausente na região perto do rio Severn (no sul de Queensland). Isto pode estar relacionado com o facto de as regiões de Clarence e Richmond serem relativamente semelhantes em termos geográficos, enquanto a região de Severn é mais fresca (por estar localizada a uma maior altitude) e tem um solo com areia grossa e cascalho que difere do solo de argila das outras regiões. No entanto, ainda assim na região de Clarence observaram-se algumas diferenças comparativamente à região de Richmond. Enquanto na região de Richmond o quimiotipo 1 é aquele que predomina com 79% das amostras pertencentes a este quimiotipo, na região de Clarence este quimiotipo apenas

corresponde a 46% das amostras analisadas. Esta informação pode indicar que as ligeiras variações entre as condições ambientais da região de Richmond e Clarence podem levar à seleção de um dado quimiotipo em detrimento de outros ou podem alterar a expressão epigenética de genes relacionados com a síntese de componentes presentes nos OEs, fazendo com que um determinado componente do TTO seja mais ou menos biossintetizado (41).

Para compreender melhor a existência destes quimiotipos foi proposta a existência de uma via biossintética comum aos diferentes componentes presentes no TTO (**Figura 8.5**) com a participação de diferentes enzimas, como as 1,8-cineole sintetases, as sabineno sintetases e as terpinoleno sintetases. Cada uma destas sintetases apresenta a capacidade de sintetizar vários compostos presentes no TTO. Por exemplo, as 1,8-cineole sintetases, para além da síntese do 1,8-cineole também podem sintetizar pequenas quantidades de limoneno, sabineno, β -mirceno, β -pineno, α -pineno e α -terpineol (42,43).

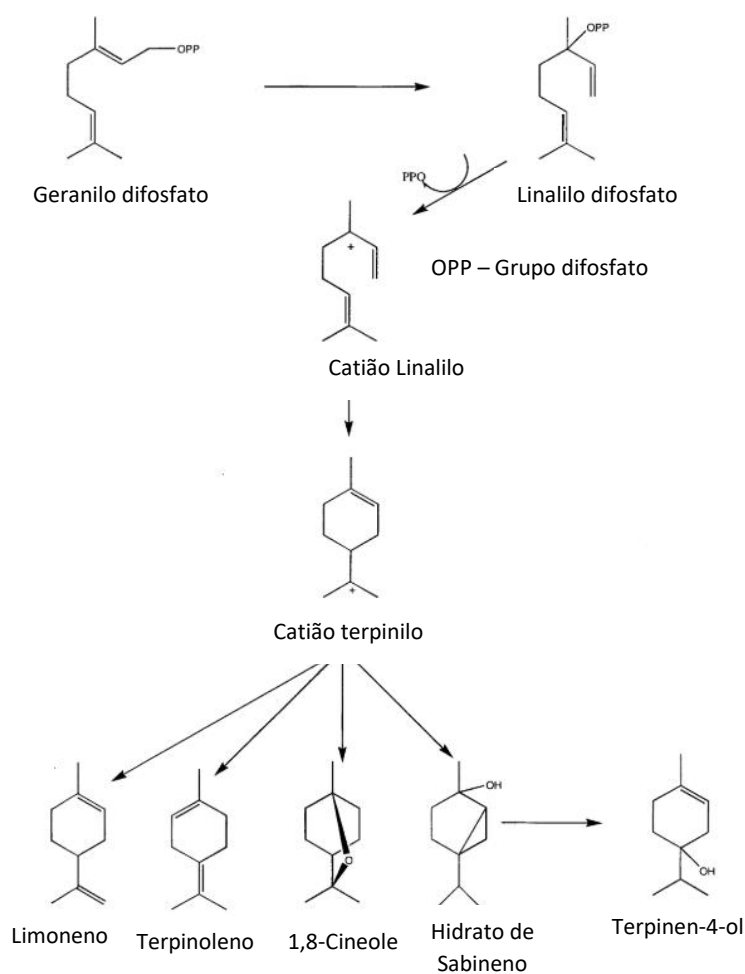


Figura 8.5. Mecanismo proposto para a síntese de monoterpênicos no TTO, adaptado de (42)

No entanto, em todos os quimiotipos foi encontrado um nível de expressão semelhante destas enzimas, pelo que a expressão dos genes que codificam estas enzimas não parece explicar o facto de existirem diferentes quimiotipos. Uma das justificações para tentar explicar esta situação assenta na hipótese de poderem existir outras enzimas que ainda não tenham sido descobertas. Outras hipóteses incluem a possibilidade de haver alterações na atividade enzimática em função de uma regulação pós-transcricional e a possibilidade dos produtos sintetizados pelas enzimas sofrerem modificações como reações de oxidação, metilação ou conjugação formando novos metabolitos (43).

Embora não se conheça o motivo exato para a existência dos diferentes quimiotipos de *M. alternifolia*, este é um importante fator a ter em conta na produção do TTO e é uma das principais razões que levou à implementação do *Tea Tree Breeding Program* na Austrália. Este programa veio permitir uma maior uniformização no que diz respeito à qualidade do TTO, através da seleção e clonagem das linhagens do quimiotipo 1, as quais estão associadas a um OE de maior qualidade, ou seja, mais rico em terpinen-4-ol.

Por outro lado, a posição das folhas na planta também pode influenciar o conteúdo de terpinen-4-ol e γ -terpineno do TTO. Existem algumas evidências que apontam para um OE mais rico nestes componentes quando a extração é feita a partir das folhas inferiores de *M. alternifolia* em comparação com as folhas superiores. Paralelamente, existem outras evidências que suportam que é possível obter um TTO mais rico em compostos voláteis, como o terpinen-4-ol, quando a extração é feita utilizando as folhas mais velhas da planta (34).

8.3.2. Métodos de secagem

Tal como foi dito no capítulo 8.1.1, a secagem pode afetar a composição do TTO dependendo do método aplicado. Num estudo foram avaliados os efeitos de 4 métodos de secagem na composição do TTO: secagem por liofilização, secagem por calor seco, secagem pelo sol e secagem por vácuo (34). Este estudo permitiu concluir que, embora em todos os métodos de secagem se tenha obtido um TTO com a mesma composição qualitativa, a secagem pelo sol foi aquela que permitiu obter um maior teor em monoterpenos, sesquiterpenos e outros componentes presentes no TTO (34).

No entanto este estudo não possui um controlo, ou seja, não existe nenhuma referência relativa à composição do TTO quando não é aplicado nenhum método de secagem com a qual se possam comparar os resultados obtidos por cada um dos métodos. Assim não é possível concluir se a secagem pelo sol e pelos outros métodos altera a composição do TTO de forma significativa. Para além disso, embora os autores concluam que houve um aumento do teor de terpinen-4-ol através da aplicação de métodos de secagem não são apresentados no estudo quaisquer resultados relativamente a este componente. Por estes motivos torna-se necessário desenvolver mais estudos para caracterizar o efeito dos diferentes métodos de secagem na composição do TTO.

8.3.3. Condições de armazenamento

Após a produção do TTO, a sua composição pode ser alterada por várias condições ambientais como a humidade, as temperaturas elevadas e a exposição à luz e ao oxigénio presente na atmosfera. Essas alterações incluem, por exemplo, a oxidação do α -terpineno, γ -terpineno e terpinoleno em *p*-cimeno e a formação de peróxidos e epóxidos, que, por sua vez, podem favorecer o aparecimento de reações de hipersensibilidade (8).

Assim, para garantir que o TTO se mantém com as propriedades desejáveis este deve ser conservado na sua embalagem de acondicionamento primário, a temperaturas iguais ou inferiores a 25°C e ao abrigo da luz e de fontes de calor, devido ao facto de ser um composto inflamável. Por precaução, mesmo quando armazenado nas condições adequadas considera-se que o TTO apresenta uma estabilidade e mantém as suas propriedades durante 2 anos após o seu acondicionamento. Após abertura esse prazo passa a ser de 12 meses (44).

8.3.4. Adulteração

A adulteração é um problema importante da indústria dos OEs que pretende otimizar os seus lucros através da adição de adulterantes, ou seja, constituintes naturais ou sintéticos semelhantes aos naturalmente presentes nos OEs em questão e que estão associados a um menor custo de produção. Assim, a adulteração afeta a qualidade e, conseqüentemente, as propriedades

dos OEs, bem como a sua segurança, favorecendo o aparecimento de reações adversas como as reações de hipersensibilidade (6).

Os adulterantes mais comumente identificados no TTO são componentes extraídos dos OEs de eucalipto e do pinho e cânfora. Por vezes, também são utilizadas como fontes de adulteração outras espécies da família Myrtaceae do género *Melaleuca* e que não estão descritas para a produção de TTO ou até mesmo de outros géneros como, por exemplo, espécies do género *Leptospermum* (6).

De modo a garantir que o TTO comercializado está livre de adulterantes a ISO 4730:2017 define que a percentagem dos enantiómeros *R* e *S* de terpinen-4-ol (principal componente do TTO), deve estar entre os 67 e 71 % do enantiómero *R* e os 29 e 33 % do enantiómero *S* (7).

8.4. Propriedades biológicas

O TTO tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos com o objetivo de compreender melhor as propriedades conhecidas pelos Aborígenes e descobrir novas valências. Neste capítulo são abordados de forma bastante breve os principais dados recolhidos sobre a atividade do TTO e dos seus constituintes, desde o seu papel anti-inflamatório e anti-histamínico, à sua atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antitumoral.

8.4.1. Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório consiste numa resposta do sistema imunitário que pode ser induzida por patógenos, danos celulares, compostos tóxicos ou outros fatores e é caracterizado por vários sinais como calor, rubor, dor, edema e perda de função. O mecanismo do processo inflamatório é bastante complexo, envolvendo a libertação de vários mediadores inflamatórios que conduzem a alterações na permeabilidade a nível vascular e ao recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (45).

Alguns dos componentes presentes no TTO, nomeadamente, o terpinen-4-ol, o α -terpineol e o 1,8-cineole, demonstram a sua atividade anti-inflamatória ao inibir a síntese de alguns desses mediadores inflamatórios como o TNF- α (sigla em inglês Fator de Necrose Tumoral, do inglês

tumor necrosis factor alpha), algumas interleucinas (IL-8, IL-1 β , IL-10) e prostaglandinas (prostaglandina E2) produzidos por monócitos após a sua ativação pelos lipopolissacáridos (componente presente na membrana celular externa das bactérias Gram-negativas) (46,47). Um efeito semelhante foi observado em macrófagos, com redução dos mesmos mediadores inflamatórios à exceção do TNF- α que permaneceu inalterado (47).

Foi também demonstrado que o terpinen-4-ol e o α -terpineol (outro componente do TTO) atuam nos monócitos suprimindo a produção de espécies reativas de oxigênio, que estão igualmente associadas a processos inflamatórios (46).

Existem ainda evidências que a aplicação tópica de terpinen-4-ol e α -terpineol podem reduzir o edema em reações de hipersensibilidade em murganhos. Posteriormente, foram efetuados estudos em humanos que suportam o efeito do terpinen-4-ol na modelação dos processos de vasodilatação e permeabilidade vascular induzidos pela produção de histamina e que estão associados a reações de hipersensibilidade (46).

Para além do TTO, também foi investigado o efeito anti-inflamatório de uma amostra de *M. alternifolia* muito rica em terpinen-4-ol, a qual pode ser obtida a partir do refinamento do TTO. Este concentrado demonstrou capacidade em inibir a fosforilação da quinase I κ B nos macrófagos. A quinase I κ B é um complexo enzimático localizado no citoplasma que pode ser fosforilado na presença mediadores inflamatórios. Em consequência da fosforilação deste complexo enzimático, o fator de transcrição NF κ B é ativado no citoplasma e migra para o núcleo, onde vai promover a transcrição de genes que estão associados à síntese de citocinas pró-inflamatórias e à expressão da óxido nítrico sintetase. Assim, a inibição da fosforilação do complexo I κ B pelo concentrado de *M. alternifolia* pode promover uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (que tem um papel fundamental na vasodilatação). Simultaneamente, o concentrado de *M. alternifolia* também aumentou a expressão da heme-oxigenase-1 através da ativação do fator de transcrição Nrf2. Esta descoberta é importante pois sabe-se que a heme-oxigenase-1, ao participar na degradação do grupo heme, produz metabolitos que têm a capacidade de inibir a óxido nítrico sintetase e a cicloxigenase-2 que são enzimas associadas a processos inflamatórios (47,48).

Tendo em conta estes dados, é de esperar que o TTO possua uma ação anti-inflamatória, essencialmente devido ao terpinen-4-ol, no entanto são necessários mais estudos para entender melhor o seu mecanismo de ação anti-inflamatório.

8.4.2. Atividade antibacteriana

O TTO é bastante conhecido pelas suas propriedades antibacterianas de amplo espectro relacionadas com a sua capacidade em inibir a respiração celular, promover alterações na permeabilidade das membranas e induzir a perda de iões de potássio, tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas (49,50).

Para ter uma ideia das suscetibilidades do TTO foi feito um estudo *in vitro* onde foram determinadas as zonas de inibição (ZIs) do TTO para um conjunto de bactérias gram-positivas e gram-negativas em comparação com as zonas de inibição de dois antibióticos distintos, os quais serviram de controlo positivo (**Tabela 8.3**) (51).

Tabela 8.3. ZIs do TTO para várias bactérias gram-positivas e gram-negativas em comparação com a gentamicina e cefoxitina, respetivamente, adaptado de (51).

Bactérias gram-positivas	ZI do TTO (mm)	ZI da gentamicina (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	9,33 ± 1,70	31 ± 3,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	10,67 ± 1,25	28 ± 0,5
<i>Micrococcus luteus</i>	4,67 ± 0,47	26 ± 2,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,33 ± 0,47	31 ± 1,0
Bactérias gram-negativas	ZI do TTO (mm)	ZI da cefoxitina (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,00 ± 0,82	22 ± 1,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6,00 ± 0,82	25 ± 2,0
<i>Salmonella enterica</i>	7,33 ± 1,25	25 ± 1,5
<i>Serratia marcescens</i>	6,67 ± 0,94	27 ± 2,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biofilme)	6,00 ± 0,00	26 ± 1,0
<i>Salmonella enterica</i> (biofilme)	6,00 ± 0,82	25 ± 1,0

De acordo com o artigo científico do qual este estudo foi retirado, uma zona de inibição (ZI) inferior a 5 mm é representativa uma fraca atividade antimicrobiana, uma ZI entre 5 e 10 mm é representativa de uma atividade antimicrobiana moderada e uma ZI superior a 10 mm é representativa de uma forte atividade antimicrobiana. Assim, a partir da **Tabela 8.3.** podemos observar que o TTO aparenta ter um efeito inibitório moderado na maior parte das bactérias, à exceção da bactéria *Enterococcus faecalis*, a qual aparenta ser mais suscetível ao TTO, e da bactéria *Micrococcus luteus*, que aparenta ser menos suscetível (51).

No mesmo estudo foram determinadas para as mesmas espécies bacterianas as concentrações mínimas inibitórias (sigla em inglês MICs, do inglês *Minimal Inhibitory Concentrations*) do TTO necessárias para inibir o crescimento bacteriano em 50 e 90% de algumas espécies analisadas num desses estudos (**Tabela 8.4**) (51).

Tabela 8.4. MICs do TTO para diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas, adaptado de (51).

Bactérias gram-positivas	MIC 50 (µL/mL)	MIC 90 (µL/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	14,25	18,36
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,86	18,45
<i>Micrococcus luteus</i>	13,58	18,68
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,52	14,26
Bactérias gram-negativas	MIC 50 (µL/mL)	MIC 90 (µL/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,46	12,32
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12,25	15,46
<i>Salmonella enterica</i>	11,82	16,36
<i>Serratia marcescens</i>	13,45	16,24
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biofilme)	25,46	28,59
<i>Salmonella enterica</i> (biofilme)	23,18	25,43

Observando a **Tabela 8.4** não se notam grandes diferenças entre as MICs para bactérias gram-positivas comparativamente às gram-negativas, à exceção dos biofilmes de bactérias gram-negativas em que a suscetibilidade ao TTO é menor. Contudo, existem estudos mais antigos que apontam para uma maior suscetibilidade do TTO em gram-positivas do que em gram-negativas (51). Esta variação de resultados pode estar relacionada com o facto de as amostras de TTO usadas nos estudos terem uma composição variável dentro dos requisitos da ISO 4730:2017, o que pode resultar em diferentes MICs (50). Apesar das MICs serem variáveis todos os autores concordam que o TTO tem uma boa capacidade inibitória no crescimento bacteriano (51). Contudo, neste artigo não são apresentados quaisquer controlos com os quais se possam comparar as MICs do TTO, pelo que seria importante em estudos futuros incluir um termo de comparação com outros compostos de atividade antibacteriana conhecida.

Para além disso, recentemente foi estudada a capacidade que o TTO tem em atuar sobre estirpes bacterianas multirresistentes a antibióticos, o qual demonstrou não só ser eficaz como um agente isolado, mas também permitiu obter melhores resultados na inibição do crescimento bacteriano quando em combinação com antibióticos como a vancomicina e rifampicina, mesmo quando usados em concentrações inferiores às MICs identificadas nesse estudo. As estirpes analisadas incluem estirpes patogénicas resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Estas descobertas são de grande relevância dado que o aparecimento destas estirpes multirresistentes tem vindo a reduzir a eficácia dos antibióticos disponíveis (50).

Apesar da atividade antibacteriana do TTO ser principalmente atribuída ao seu componente maioritário, o terpinen-4-ol, existem outros componentes do TTO que também podem contribuir para essa atividade, tendo em conta a suscetibilidade de algumas espécies bacterianas a estes componentes (50,52). No **Quadro 8.1** são apresentados alguns dos componentes do TTO e as espécies bacterianas sobre as quais estes componentes podem atuar (52).

Quadro 8.1. Espécies bacterianas sobre as quais alguns componentes presentes no TTO podem ter ação antibacteriana, adaptado de (52).

Componente	Espécie bacteriana
1,8-Cineole	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i>
Terpinen-4-ol	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus gordonii</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; <i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina; <i>Porphyromonas gingivalis</i>
α-Terpineol	<i>Streptococcus gordonii</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; <i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Sabineno	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus mutans</i> ; <i>Streptococcus sanguinis</i> ; <i>Streptococcus sobrinus</i> ; <i>Streptococcus criceti</i>
α-Pino	<i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Porphyromonas gingivalis</i>

Assim, embora existam vários dados que suportem a eficácia *in vitro* do TTO em reduzir o crescimento bacteriano é necessário continuar a investigar a atividade antibacteriana do TTO, o seu mecanismo e a sua aplicabilidade em termos clínicos, especialmente tendo em conta as descobertas mais recentes relativas ao sinergismo deste OE com antibióticos.

8.4.3. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica do TTO foi investigada ao longo dos anos em várias espécies de fungos incluindo *Candida* spp., *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Todas estas espécies de fungos demonstraram alguma suscetibilidade ao TTO, apresentando resultados promissores no contexto de algumas patologias como a dermatite seborreica e onicomicose (51,53–55).

A atividade antifúngica do TTO deve-se essencialmente ao terpinen-4-ol, α -terpineol, terpinoleno e 1,8-cineole. Destes componentes, aquele que tem uma maior atividade antifúngica é o terpinen-4-ol, provocando alterações na morfologia e na permeabilidade das membranas plasmática e mitocondrial dos fungos, para além de retardar a síntese de ergosterol (um componente presente na membrana destes microrganismos). Contudo, a atividade antifúngica do terpinen-4-ol isoladamente é relativamente baixa e pouco comparável à atividade do TTO, sugerindo que a associação com outros componentes ativos é fundamental para a sua ação antifúngica (46,56).

Para ter uma ideia da atividade antifúngica do TTO também foram determinadas as ZIs para várias espécies de *Candida* spp. em comparação com o fluconazol, um antifúngico de referência (**Tabela 8.5**).

Tabela 8.5. ZIs do TTO para várias espécies de *Candida* spp. em comparação com o fluconazol, adaptado de (51).

Espécie fúngica	ZI do TTO (mm)	ZI do fluconazol (mm)
<i>Candida albicans</i>	10,67 ± 1,70	25 ± 2,0
<i>Candida glabrata</i>	7,67 ± 2,62	31 ± 1,5
<i>Candida krusei</i>	6,33 ± 0,47	31 ± 3,0
<i>Candida tropicalis</i>	8,33 ± 1,89	31 ± 1,0

Tal como foi dito no capítulo anterior, os autores consideram uma zona de inibição (ZI) inferior a 5 mm representativa uma fraca atividade antimicrobiana, uma ZI entre 5 e 10 mm representativa de uma atividade antimicrobiana moderada e uma ZI superior a 10 mm representativa de uma forte atividade antimicrobiana. Assim, a maior parte dos resultados apresentados na **Tabela 8.5** apontam para um efeito inibitório moderado para a maior parte das

espécies de *Candida* spp., à exceção da espécie *Candida albicans* em que o efeito inibitório foi superior.

Foram ainda determinadas as MICs para as mesmas espécies (**Tabela 8.6**) que, comparativamente aos resultados da **Tabela 8.4**, apontam para uma menor suscetibilidade do TTO para as espécies do género *Candida* spp. Isto pode indicar uma menor atividade antifúngica do TTO em comparação ao efeito antibacteriano. Contudo é importante reforçar que os resultados apresentados para as MICs do TTO não possuem um controlo com o qual se possam estabelecer comparações. Assim, é importante realizar mais estudos para melhor caracterizar a atividade antifúngica do TTO (51).

Tabela 8.6. MICs do TTO para diferentes espécies de *Candida* spp. (51).

Espécie fúngica	MIC 50 ($\mu\text{L/mL}$)	MIC 90 ($\mu\text{L/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	22,52	26,76
<i>Candida glabrata</i>	24,33	29,85
<i>Candida krusei</i>	23,15	26,32
<i>Candida tropicalis</i>	21,86	27,46

8.4.4. Atividade antiviral

O exemplo mais bem estudado *in vitro* é a ação do TTO contra o vírus *Herpes Simplex* do tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), que apresentou a capacidade para inibir a formação de placas virais em 50% quando aplicado numa concentração de 0,0009% e 0,0008%, respetivamente. O efeito dessa inibição aumenta com a concentração de TTO e com uma concentração de 0,003% é possível reduzir o título viral de HSV-1 em 98,2% e de HSV-2 em 93,0% (57).

Também foram efetuados estudos que revelaram dados promissores contra os vírus influenza e, mais recentemente, contra os coronavírus (58,59).

O mecanismo de ação do TTO nos vírus não é claro, mas os modelos computacionais apontam para uma interação com as proteínas presentes na superfície dos vírus (como a hemaglutinina no caso do influenzavírus ou a proteína S dos coronavírus) que estabelecem ligações com recetores presentes nas células hospedeiras, impedindo a entrada e a fusão dos

vírus. No caso de vírus envelopados os estudos computacionais apontam ainda para a capacidade que alguns componentes do TTO têm em inserir-se no envelope e induzir alterações nas propriedades físicas desta estrutura. Estes estudos, embora limitados, indicam que os principais constituintes responsáveis pela atividade antiviral do TTO podem ser o terpinen-4-ol, o γ -terpineno e o 1,8-cineole (58).

O TTO também demonstrou um efeito inibitório na produção de componentes acídicos nos lisossomas e endossomas. Esta descoberta é importante, pois alguns vírus necessitam de um ambiente ácido nestas vesículas citoplasmáticas para iniciar o processo de desencapsidação, como é o caso do influenza vírus (59).

Já com o concentrado de *M. alternifolia* foi possível obter efeitos viricidas contra duas estirpes do vírus do Nilo Ocidental numa concentração máxima não citotóxica de 0,0075%. Para além do seu efeito viricida, o concentrado de *M. alternifolia* também diminuiu a produção e libertação de vírus das células hospedeiras (59).

8.4.5. Atividade antiparasitária

O TTO demonstrou ser ativo contra vários parasitas incluindo protozoários (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Acanthamoeba castellanii*, *Trichomonas vaginalis*, *Eimeria* e *Ichthyophthirius multifiliis*), nemátodos (*Haemonchus contortus* e *Anisakis simplex*), cestodos (*Echinococcus ortleppi*), e monogenos (*Gasterosteus* spp. e *Dactylogyrus minutus*) (60).

A atividade antiparasitária do TTO está essencialmente relacionada com a capacidade que alguns dos seus componentes têm em inibir a acetilcolinesterase destes parasitas, como é o caso do 1,8-cineole. A acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, pelo que a sua inibição leva a um aumento da concentração de acetilcolina nas fendas sinápticas do parasita. Um aumento deste neurotransmissor irá levar a uma estimulação excessiva dos recetores de acetilcolina do tipo nicotínico e, conseqüentemente, a um aumento da contração muscular induzindo a paralisia e a morte do parasita (60).

Para além disso a ação anti-inflamatória e anti-histamínica do TTO, atribuída essencialmente ao terpinen-4-ol, também podem contribuir para a ação antiparasitária deste OE,

dados que os parasitas induzem uma resposta inflamatória no organismo do hospedeiro com produção de histamina para criarem um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (60).

8.4.6. Atividade antioxidante

Os antioxidantes possuem a capacidade de evitar ou retardar o processo oxidativo provocado por radicais livres. Os radicais livres são compostos que promovem danos no DNA das células e que, por sua vez, estão relacionados com os processos de mutagênese e carcinogênese, induzindo o aparecimento de várias doenças. Os antioxidantes vão neutralizar estes radicais livres e podem ser sintetizados pelas próprias células (antioxidantes endógenos) ou podem ser obtidos de fontes externas (antioxidantes exógenos). Uma das principais fontes de antioxidantes exógenos são as plantas aromáticas e medicinais. Assim, compostos extraídos de plantas como os óleos essenciais são frequentemente estudados com o objetivo de avaliar o seu potencial antioxidante (61,62).

Uma das formas de analisar a atividade antioxidante de um composto consiste em determinar a concentração necessária desse composto para neutralizar ou inibir agentes oxidantes, como os radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), os radicais hidroxilo e as espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (sigla em inglês TBARS, do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*). Destes agentes oxidantes, os radicais hidroxilo são aqueles que possuem um maior potencial oxidante sobre as membranas biológicas, proteínas e lípidos, embora tenham um tempo de semivida bastante curto (63).

Assim, foi efetuado um estudo no qual se determinou a concentração necessária de TTO para se obter 50% do efeito máximo (EC_{50}) dos radicais livres de DPPH (ensaio 1) e dos radicais hidroxilo (ensaio 2). Foi ainda determinada a concentração necessária deste óleo essencial para inibir a ação das TBARS em 50% (ensaio 3). Os mesmos ensaios foram realizados para a vitamina C, vitamina E, quercetina e ácido α -lipoico, que são moléculas naturais conhecidas pela sua ação antioxidante, com o objetivo de estabelecer uma comparação do efeito antioxidante destas moléculas com o TTO. Na **Tabela 8.7** são apresentados os resultados de cada um dos ensaios (63).

Tabela 8.7. Atividade antioxidante expresso em EC₅₀ do TTO em comparação com antioxidantes naturais, adaptado de (63)

Amostra	Ensaio 1 (µL/mL)	Ensaio 2 (µL/mL)	Ensaio 3 (µL/mL)
Vitamina C	7,79	7,43	185,7
Vitamina E	34,59	113,1	14,19
Quercetina	4,46	9,64	7,82
Ácido α-lipoico	305,6	1877	3414
TTO	48,35	43,71	135,9

Observando a tabela anterior é possível concluir que a atividade antioxidante do TTO é bastante variável de ensaio para ensaio. No ensaio 1 este óleo essencial demonstrou uma atividade contra os radicais livres de DPPH apenas superior ao ácido α-lipoico. Já no ensaio 2 a atividade do TTO contra os radicais hidroxilo demonstrou ser superior à vitamina E e ao ácido α-lipoico. Finalmente no ensaio 3 observou-se um maior efeito inibitório do OE de *M. alternifolia* no teste TBRS comparativamente à vitamina C e ao ácido α-lipoico. Em todos os ensaios a atividade do TTO antioxidante foi superior à do ácido α-lipoico (63).

Tendo em conta estes resultados, o TTO aparenta ser um OE com propriedades antioxidantes promissoras, e pensa-se que isso se deve essencialmente aos monoterpenos presentes na sua composição, principalmente aqueles com grupos metileno ativos como o terpinene-4-ol, γ-terpineno e o α-terpineno (63).

8.4.7. Atividade antitumoral

Estudos mais recentes apontam para a possibilidade de o TTO poder vir a ser aplicado no tratamento tópico do cancro da mama, dado que este óleo essencial impediu a proliferação e reduziu a viabilidade *in vitro* de linhagens celulares associadas ao cancro da mama sem provocar efeitos citotóxicos sobre outras células como os fibroblastos e as células mononucleares do sangue periférico. O mecanismo proposto para esta ação tem por base a indução da interrupção do ciclo celular e o aumento da expressão de genes relacionados com a morte celular programada (64).

O TTO também demonstrou eficácia contra células de melanoma *in vitro* e foi capaz de reduzir o crescimento do melanoma subcutâneo *in vivo*. Esta atividade foi atribuída ao terpinen-4-ol devido à sua capacidade *in vitro* em reduzir a proliferação celular, interromper o ciclo celular, induzir necrose ou apoptose e interferir com a migração e invasão tumoral. Para além disso, o TTO revelou um efeito sinérgico na indução da apoptose quando aplicado em conjunto com fármacos anticancerígenos como o dabrafenib e o trametinib. Aliando estes resultados com a baixa toxicidade do TTO e a sua natureza lipofílica, a qual facilita a sua absorção cutânea, o TTO pode ser considerado uma boa opção na prevenção de melanoma e outros tipos de cancro de pele que necessita de ser investigada mais detalhadamente (65).

Outro estudo aponta ainda para o potencial que o TTO possui no campo da leucemia ao inibir o crescimento de células tumorais da linhagem K562 em 50% numa concentração de 3,125µg/mL após 48h de incubação (66).

Assim, o TTO parece apresentar um grande potencial na prevenção e tratamento em vários tipos de cancro diferentes, pelo que o estudo das suas propriedades antitumorais é de extrema importância, particularmente em ensaios *in vivo*.

8.5. Interesse e aplicações

O TTO é um componente com bastante potencial na área da cosmética essencialmente devido às suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes descritas no capítulo anterior. No entanto, existem alguns desafios no que diz respeito à sua aplicabilidade em produtos cosméticos e em cosmeceúticos. De uma forma geral, os OE como o TTO são compostos altamente voláteis, com baixa solubilidade em água e que se degradam facilmente quando expostos à luz, calor, humidade ou ar. Consequentemente, estas características podem resultar numa baixa biodisponibilidade e condicionar a sua ação, para além de potenciarem efeitos adversos. Por isso muitas vezes os OEs necessitam de um sistema que lhes dê estabilidade e permita preservar a sua composição. Geralmente estes sistemas são desenvolvidos com recurso à micro- e nanotecnologia e a partir do uso de materiais poliméricos ou lipídicos (35,67).

8.5.1. Acne vulgaris

A acne vulgaris é a segunda doença de pele mais prevalente no mundo e pode afetar tanto adolescentes como adultos, embora seja mais frequente no período da adolescência. Esta doença possui uma componente multifatorial relacionada com fatores hormonais, ambientais, genéticos e alimentares, podendo ser ainda desencadeada por situações de stress ou por determinados medicamentos. A acne é mais frequente ao nível da face, no entanto pode afetar outras regiões do corpo incluindo o pescoço, peito e costas. O mecanismo desta doença pode ser explicado pelo aumento da produção de sebo e da proliferação de queratinócitos que em conjunto favorecem a colonização bacteriana e o aparecimento de lesões cutâneas, as quais podem ser acompanhadas de um processo inflamatório (**Quadro 8.2**). É com base na gravidade dessas lesões e do processo inflamatório que a acne pode ser classificada em ligeira, moderada ou severa (**Quadro 8.3**). O aparecimento destas lesões também pode ter um grande impacto nos pacientes a nível psicológico e social, pelo que o seu tratamento é importante e não deve ser descurado (68,69).

Quadro 8.2. Tipos de lesões presentes na acne, adaptado de (70)

<u>Comedões</u>	Caracterizados pela obstrução dos poros dos folículos pilosos em consequência do aumento da produção de sebo pelas glândulas sebáceas. Os comedões designam-se por comedões fechados ou pontos brancos quando os poros dos folículos pilosos permanecem fechados. Por sua vez, os comedões abertos ou pontos negros resultam de uma dilatação desses poros, permitindo a oxidação do sebo, o qual adquire uma cor mais escura
<u>Pápulas e Pústulas</u>	Quando se começa a desenvolver um processo inflamatório ligeiro, os comedões passam a designar-se por pápulas ou pústulas. O que distingue estes dois tipos de lesões é o facto das pápulas não possuírem pús no seu interior ao contrário das pústulas
<u>Nódulos quísticos</u>	Lesões maiores que as pápulas e pústulas e associadas a um processo inflamatório mais intenso

Quadro 8.3. Classificação da acne em ligeira, moderada e severa, adaptado de (68)

<u>Ligeira</u>	Sem processo inflamatório; Presença de comedões abertos e fechados
<u>Moderada</u>	Pequeno processo inflamatório; Presença de pápulas e/ou pústulas; Comedões mais evidentes; Risco de progressão para outras zonas do corpo
<u>Severa</u>	Processo inflamatório significativo; Presença de nódulos quísticos; Pápulas e pústulas mais evidentes; Risco elevado de formação de cicatrizes

Atualmente existem vários tratamentos farmacológicos disponíveis para a acne, estando a escolha do tratamento dependente da sua gravidade. De uma forma geral, os tratamentos tópicos são preferenciais aos tratamentos sistémicos, pois têm uma ação mais dirigida e menos efeitos adversos. Os tratamentos tópicos mais usados incluem por exemplo retinoides, peróxido de benzoilo e ácido azeláico. Contudo, muitos destes tratamentos estão associados a alguns efeitos adversos como sensação de queimadura ou descamação cutânea, o que leva a que muitos dos pacientes optem por tratamentos alternativos. Tendo em conta a sua etiologia bacteriana, a antibioterapia também é uma das opções mais prescrita para o tratamento da acne, no entanto, devido ao desenvolvimento de estirpes resistentes, o uso de antibióticos está a ser cada vez menos efetivo. Por estas razões a procura por tratamentos alternativos eficazes e menos tóxicos tem sido cada vez mais relevante (69,71–73).

A aplicação de produtos cosméticos contendo TTO é uma alternativa popular ao uso de tratamentos farmacológicos na acne ligeira a moderada, devido à sua ação antibacteriana e anti-inflamatória (74). De facto, o TTO revelou ter atividade antibacteriana *in vitro* contra o principal agente bacteriano responsável pela acne (*Propionibacterium acnes*) numa MIC entre os 0,05 e os 2,0 % (v/v). Esta variação de concentrações é explicada por diferenças no teor de terpinen-4-ol do TTO, o principal componente responsável pela atividade antibacteriana. Por exemplo, num estudo recente foram analisados 3 lotes de TTO, os quais revelaram uma MIC de 0,25% (v/v). Neste estudo foram usados como controlos positivos uma placa com apenas o meio e outra placa com o veículo de diluição (óleo mineral), nas quais se verificou crescimento bacteriano como esperado. Como controlo negativo foi usada uma placa contendo 3 µg de um antibiótico (ampicilina) na qual não se verificou qualquer crescimento (75).

Num estudo realizado em pacientes com acne ligeira a moderada foi demonstrada a capacidade do TTO reduzir significativamente a inflamação e as lesões cutâneas quando aplicado numa concentração de 5% comparativamente ao grupo controlo, apresentando uma boa tolerância com apenas alguns casos de prurido, queimadura e descamação cutânea. Estes efeitos foram comparados num outro estudo com os efeitos do peróxido de benzoilo a 5% e verificou-se que, apesar de o TTO ter uma ação mais lenta, este era melhor tolerado pelos pacientes do que o peróxido de benzoilo (73).

Um estudo mais recente avaliou os efeitos de um gel comercializado para o tratamento da acne ligeira a moderada contendo TTO (200 mg/g) em 18 pacientes. Os resultados foram semelhantes aos estudos anteriores, com uma redução das lesões nos pacientes em cerca de 54% após 12 semanas de aplicação e com apenas alguns casos de efeitos adversos classificados como ligeiros. Em comparação com os dados disponíveis na literatura, que apontam para uma capacidade de redução de lesões entre os 36 e 48% para o peróxido de benzoilo e de 31 a 47% para a clindamicina, este estudo concluiu que o TTO pode ser uma boa opção para o tratamento da acne, embora sejam necessários mais estudos a ser efetuados numa amostra mais representativa (74).

De modo a tentar obter uma maior eficácia, foi desenvolvido um estudo em que se avaliou a aplicabilidade de um hidrogel contendo TTO. A vantagem deste sistema de libertação reside no facto de os hidrogéis terem uma elevada porosidade, permitindo a administração de ingredientes ativos nas camadas mais internas da pele. Contudo, a incorporação de OEs neste tipo de sistemas é dificultada pelo facto de os hidrogéis não possuírem afinidade por substâncias lipídicas. Assim, para facilitar a incorporação do TTO neste sistema foram usadas β -ciclodextrinas, que são compostos cíclicos constituídos por 7 unidades de glucose e que possuem um ambiente interno hidrofóbico e um ambiente externo hidrofílico e que facilitam a encapsulação dos OEs. Para além disso, foram ainda adicionados a este sistema oligo-holósidos de quitosano, pectina e carboximetilcelulose para reduzir a quantidade de TTO incorporado no hidrogel, uma vez que se sabe que o TTO pode estar associado a algumas reações adversas a nível da pele. Os dados obtidos revelaram que este hidrogel possibilitou uma maior atividade antimicrobiana e uma menor toxicidade do que o TTO isoladamente, pelo que é uma boa opção para o tratamento da acne (72).

Outra alternativa para melhorar a eficácia do TTO é associá-lo a outros componentes com ação antibacteriana e anti-inflamatória. Assim foi desenvolvido um creme com própolis (20%), TTO (3%) e *Aloe vera* (10%) e foi comparada a sua ação com um creme de eritromicina a 3%.

Aquele creme possibilitou uma melhoria do eritema das pápulas e cicatrizes mais proeminente e mais rápida do que o creme de eritromicina, com efeitos notórios após 15 dias de utilização. Foi também reportada após 30 dias de aplicação uma redução no número de lesões e o índice de severidade da acne em 64 e 68%, respectivamente. Estes valores são superiores aos do creme de eritromicina em que se obteve uma redução de 47 e 50%, respectivamente. Estes resultados apontam também para uma melhor eficácia comparativamente à ação isolada de cada um dos compostos. Por fim, a ação deste creme não demonstrou ação irritante sobre a pele (71).

Num outro estudo foi estudada a ação anti-acne *in vitro* de um hidrogel contendo TTO e ácido azelaico. Esta formulação demonstrou uma maior atividade antibacteriana comparativamente ao uso isolado de ácido azelaico e uma maior tolerância do que na ausência deste sistema. Os testes *in vivo* demonstraram ainda a capacidade desta formulação em reduzir as lesões, a secreção sebácea e seborreia (69).

Todos estes estudos apontam para que o uso de produtos cosméticos e cosmeceúticos contendo TTO possa ser uma alternativa a considerar face aos tratamentos farmacológicos disponíveis para a acne ligeira a moderada ou para complementar a ação destes tratamentos.

8.5.2. Dermatite seborreica e caspa

A dermatite seborreica é caracterizada por placas eritematosas, gordurosas e escamosas que se desenvolvem em zonas da pele onde existe uma maior produção de sebo, nomeadamente no couro cabeludo, nas sobrancelhas, na face e na parte superior do tórax. A manifestação desta condição é bastante variável, existindo pacientes que experienciam sintomas ligeiros como uma leve descamação e produção de caspa, enquanto outros experienciam sintomas mais graves como foliculite inflamatória (infecção bacteriana dos folículos pilosos) e blefarite (inflamação em torno das pálpebras). É estimado que a dermatite seborreica afete 1 a 3% dos adultos imunocompetentes e que a sua incidência aumente em indivíduos imunodeprimidos, afetando maioritariamente homens. De uma forma geral, os pacientes diagnosticados com dermatite seborreica verificam um aumento da severidade desta condição nos meses secos e de inverno, e uma melhoria nos meses mais quentes durante o verão. Embora o mecanismo desta doença seja pouco conhecido, sabe-se que há uma associação desta patologia com o fungo do género *Malassezia*. Por este motivo a utilização de agentes antifúngicos é uma das escolhas mais eficazes para o tratamento da dermatite seborreica. Contudo, a escolha do tratamento depende

da gravidade da dermatite seborreica, estando os agentes antifúngicos normalmente reservados para os casos mais severos. Outras opções farmacológicas incluem agentes queratolíticos e anti-inflamatórios. Nos casos mais ligeiros podem ser utilizados produtos cosméticos e cosmeceuticos com ação antifúngica, anti-inflamatória e sebo-reguladora (76,77).

A caspa é uma das manifestações ligeiras mais comuns da dermatite seborreica em que há descamação no couro cabeludo sem inflamação (78). O tratamento da caspa é normalmente feito recorrendo a champôs com ingredientes naturais, uma vez que os ingredientes de origem sintética têm um maior potencial para provocar reações cutâneas indesejáveis. Desta forma, foi investigada a possibilidade do TTO ser aplicado neste contexto devido às suas propriedades antifúngicas (53).

Num estudo foi comparada a ação de champôs contendo TTO em diferentes concentrações com 5 champôs anticaspa disponíveis no mercado. Os champôs com TTO revelaram uma capacidade de limpeza entre os 23,0 e os 30,7% que se assemelha à gama dos 28,6 a 30,5% dos champôs comercializados. Foi também analisada a atividade antifúngica *in vitro* dos champôs de TTO contra *Candida albicans* e verificou-se que havia uma maior capacidade inibitória comparativamente a uma solução de TTO puro, a qual pode estar relacionada com outros ingredientes presentes na formulação dos champôs que tenham um efeito sinérgico contra o crescimento de fungos, como por exemplo o ácido salicílico. Contudo, a zona de inibição dos champôs anticaspa comercializados demonstrou ser superior à dos champôs com TTO. Mesmo assim os champôs contendo TTO podem ser uma alternativa a considerar aos champôs anticaspa comercializados devido à sua atividade antifúngica. No entanto, é necessário efetuar mais estudos, especialmente para avaliar a atividade do TTO contra fungos do género *Malassezia*, os principais fungos associados à caspa e dermatite seborreica, uma vez que esta pode diferir da atividade antifúngica estudada para a espécie *Candida albicans* (53).

Num outro estudo foi formulado um gel niosomal de TTO para o tratamento da caspa. Este gel niosomal com TTO na concentração de 2% apresentou uma maior zona de inibição em relação ao gel convencional de TTO na mesma concentração tanto para *Candida albicans* como para *Malassezia furfur*. A zona de inibição para esta segunda espécie foi inferior, o que aponta para uma menor suscetibilidade contra este microrganismo comparativamente à espécie *Candida albicans*. Outra vantagem do gel niosomal comparativamente ao gel convencional reside na capacidade deste sistema proporcionar uma ação prolongada, reduzindo a frequência de aplicação (54).

Embora os estudos sejam escassos, é possível concluir que o TTO pode ter algum interesse na redução da caspa associada com a dermatite seborreica.

8.5.3. Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento da pele é um processo natural que ocorre de forma gradual e que envolve uma série de fatores internos e externos que levam à produção de espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio promovem alterações nas células e na matriz extracelular da pele como a diminuição dos níveis de colágeno e elastina. Estas alterações contribuem para uma pele com menos elasticidade, mais áspera e com alterações de pigmentação, para além de promoverem o aparecimento de rugas e a perda da tonalidade natural da pele (67,79).

Uma das formas de prevenir o envelhecimento cutâneo e melhorar o aspeto da pele é através do uso de antioxidantes, os quais vão neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio (79).

Assim, foi desenvolvido um estudo para investigar a possibilidade do TTO ser utilizado contra o envelhecimento cutâneo, mais concretamente contra o fotoenvelhecimento (envelhecimento provocado pela radiação solar), devido ao seu potencial antioxidante. Nesse estudo foi elaborada uma nanoemulsão de TTO numa concentração de 2% concebida para melhorar a estabilidade do TTO e para que a formulação conseguisse penetrar nas camadas mais profundas da pele e exercer o um efeito mais pronunciado nestas camadas. Os efeitos da nanoemulsão foram avaliados após 90 dias de aplicação e comparados com um grupo controlo e com um grupo tratado com TTO sem um sistema de libertação. Observou-se um aumento significativo da ecogenicidade da derme em ambos os grupos tratados com TTO, o que aponta para um aumento da densidade de colágeno e que pode estar associado ao efeito antioxidante do TTO. Este aumento da densidade de colágeno foi comprovado com o recurso a técnicas de microscopia. Para além disso, observou-se um aumento da espessura da epiderme no grupo tratado com TTO sem um sistema de libertação e um aumento dos queratinócitos no grupo tratado com a nanoemulsão, o que aponta para a possibilidade do TTO contribuir para um aumento da renovação da epiderme (67).

Tendo em conta todos os resultados deste estudo, o TTO apresenta um elevado potencial para melhorar o aspeto de uma pele sujeita ao processo de fotoenvelhecimento. Contudo, são necessários mais estudos para comprovar estas evidências.

8.5.4. Halitose, placa bacteriana, cáries e gengivite

A halitose é o termo designado para indicar a presença de mau hálito, o qual pode ser provocado por diferentes fatores que promovem a produção de compostos voláteis caracterizados por um mau odor, nomeadamente compostos voláteis de enxofre (sigla em inglês VSC, do inglês *volatile sulphur compounds*). Estes compostos podem ser produzidos por bactérias gram-negativas anaeróbias presentes na cavidade oral, como por exemplo *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Assim, uma forma de tratar a halitose é através de agentes que evitem a formação de placa bacteriana ou contribuam para a sua remoção. Simultaneamente, podem ser utilizados compostos odoríficos para mascar o mau hálito (80).

A placa bacteriana é ainda um dos fatores que contribui para o aparecimento de cáries. A cáries é uma condição desenvolvida pela acumulação de compostos ácidos produzidos pelo metabolismo das bactérias gram-positivas, mais concretamente pela fermentação de hidratos de carbono como a sacarose, glucose e frutose. Consequentemente, a acumulação destas bactérias e destes compostos ácidos leva à desintegração da estrutura dos dentes (81).

A clorhexidina é um dos agentes mais utilizados para prevenir a formação de placa bacteriana devido à sua ação bactericida e bacteriostática. Para além disso, a clorhexidina também é uma das escolhas preferenciais para o tratamento de gengivites (inflamação das gengivas frequentemente provocada por infeções bacterianas). No entanto, o seu uso pode promover alguns efeitos adversos, tais como, alterações do paladar, descamação e sensação de queimadura na mucosa oral, manchas nos dentes e aumento da deposição de cálcio nas gengivas. Por isso, têm sido investigadas alternativas ao uso da clorhexidina (80,82).

Uma dessas alternativas pode ser o TTO, uma vez que este OE demonstrou capacidade *in vitro* em inibir o crescimento de bactérias gram-negativas (*P. gingivalis* e *P. endodontalis*) e positivas (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp.) responsáveis por promover o aparecimento de halitose e cáries, respetivamente. Para além disso, no âmbito da halitose, o TTO demonstrou capacidade *in vitro* em reduzir a produção de VSC pelas bactérias *P. gingivalis* e *P. endodontalis*, mesmo quando aplicadas concentrações inferiores à MIC (80,81).

Assim, no contexto da gengivite, foi efetuado um estudo com o objetivo de investigar se realmente uma solução bucal de TTO a 0,12% podia ser uma alternativa relativamente à utilização de uma solução bucal de clorhexidina na mesma concentração. Os resultados

permitiram concluir que ambas as soluções são eficazes no tratamento de gengivites após 14 dias de aplicação, devido à sua ação antimicrobiana, podendo a solução bucal de TTO ser uma melhor opção pelo facto de também possuir uma ação anti-inflamatória. Adicionalmente, a solução de TTO apresentou resultados positivos na melhoria do hálito e não revelou efeitos indesejáveis como alterações do paladar e da coloração dos dentes. No entanto, os dados são um pouco limitados, tendo em conta o número reduzido de participantes (82)

Num outro estudo foi avaliado o efeito de uma pasta de dentes contendo TTO e própolis num grupo de pacientes durante 7 e 28 dias, verificando-se uma redução da placa bacteriana. Apesar de menos reduzido, também se observou um resultado semelhante no grupo controlo, o qual pode ser explicado pela ação mecânica induzida pela escovagem dos dentes. A pasta de dentes contendo TTO e própolis também demonstrou diminuir a inflamação e o sangramento das gengivas, apontando para uma ação anti-inflamatória. Para além disso, foram ainda feitos exames microbiológicos, os quais demonstraram uma redução no número de algumas espécies de microrganismos nos pacientes que aplicaram a pasta contendo TTO e própolis comparativamente ao grupo controlo. Todos estes resultados apontam assim para uma ação antimicrobiana e anti-inflamatória sinérgica destes dois ingredientes ativos (83).

8.5.5. Onicomicose

A onicomicose é uma infeção fúngica ao nível das unhas provocada principalmente por fungos dermatófitos, particularmente *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, e que afeta 2 a 8% da população mundial (55).

Devido à sua etiologia, o tratamento da onicomicose é geralmente feito recorrendo a antifúngicos tópicos ou orais. No entanto, este tipo de fármacos tem uma ação demorada, o que condiciona a adesão à terapêutica. Simultaneamente, o risco de hepatotoxicidade resultante de interações farmacológicas faz com que o tratamento oral, que é o mais eficaz, seja contraindicado em muitos pacientes que fazem outras terapêuticas sistémicas. No caso dos tratamentos tópicos, o problema prende-se com o facto de a superfície da unha constituir uma barreira à penetração dos fármacos antifúngicos, devido à sua natureza hidrofílica e à sua estrutura queratinizada que reduzem a difusão de moléculas lipofílicas ou com elevado peso molecular. Por fim, a outra limitação do uso de antifúngicos para o tratamento da onicomicose

está relacionada com a resistência antimicrobiana, a qual diminui a eficácia dos antifúngicos. Assim, torna-se necessário desenvolver estratégias terapêuticas alternativas (55,84).

Por isso, foi investigado o efeito *in vitro* do TTO contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, o qual foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colónias destes fungos, apontando para uma diminuição do crescimento destes fungos (55).

Embora, os estudos relativos ao uso isolado do TTO para o controlo da onicomicose sejam escassos, os dados disponíveis apontam para que uma abordagem terapêutica em combinação com este OE possa ser benéfica, especialmente para evitar o desenvolvimento de resistências aos antifúngicos mais utilizados devido à sua ação sinérgica. Contudo, o TTO também apresenta uma natureza lipofílica, o que dificulta a sua aplicabilidade, pelo que a sua associação com fármacos antifúngicos como o tioconazol requer um sistema de libertação que permita ultrapassar essa limitação (56,84).

8.5.6. Higiene das mãos

A higiene das mãos é essencial para a prevenção de infeções quer em ambiente médico, quer na comunidade. Porém, o uso regular de produtos de higiene como detergentes causa irritação cutânea com frequência, podendo também estar na origem de dermatites de contacto. No caso dos detergentes o dano na pele é induzido por desnaturação das proteínas e diminuição da capacidade de retenção de água no estrato córneo, alterações nos lípidos intracelulares e redução da coesão dos queratinócitos. Já os produtos de higiene à base de álcool, para além de induzirem irritação, também causam secura na pele. Estas alterações em última análise podem modificar a flora microbiana característica da pele. Por estes motivos é importante desenvolver produtos com ação antisséptica, mas que não perturbem a estrutura e a microbiota natural da pele (85).

Num estudo comparou-se a ação antisséptica de um desinfetante contendo TTO com outros desinfetantes contendo álcool e cloreto de benzalcónio. Os resultados indicam que o desinfetante com TTO tem uma ação antisséptica mais eficaz do que os outros desinfetantes analisados, permitindo uma maior redução dos valores de adenosina trifosfato (um indicador do nível de contaminação microbiana), bem como uma maior redução da contagem microbiana. Por outro lado, ao contrário do que era esperado não se observou uma diminuição da perda de água transepidérmica significativa comparativamente aos outros desinfetantes. Pensa-se que

isto possa estar relacionado com outros componentes presentes na composição dos desinfetantes que permitam uma ação hidratante, dado que o álcool e o cloreto de benzalcónio não possuem esta capacidade. Assim, não é possível afirmar que o TTO possui uma melhor ação hidratante sobre a pele comparativamente aos outros desinfetantes. Igualmente não foi possível comprovar que o TTO provoca menos efeitos indesejáveis sobre a pele (85).

Num outro estudo comparou-se a ação de um sabonete líquido de TTO a 2% com sabonetes líquidos de clorhexidina 2% e triclosan 0,5%. Os dados deste ensaio clínico suportam a evidência de que o TTO possui ação antisséptica, uma vez que permite reduzir o número de microrganismos de forma quase tão eficaz como o triclosan e mais eficaz do que a clorhexidina. Para além disso, existem outros pontos a favor do uso de TTO como desinfetante destacados por alguns dos participantes do ensaio como o facto de ter um aroma característico agradável e de ser considerado mais seguro do que os outros desinfetantes analisados, dado que não se verificou nenhuma reação adversa cutânea durante o estudo. No entanto, este estudo foi realizado num período relativamente curto e com poucos participantes, pelo que seria necessário analisar estes efeitos numa amostra mais representativa e durante mais tempo para obter resultados mais fiáveis (86).

9. Reações adversas associadas ao uso de produtos cosméticos com *Tea Tree Oil*

Embora os OEs sejam compostos naturais não significa que o seu uso seja completamente seguro (52). Na realidade existem vários casos de dermatites de contacto reportados em consequência do uso de OEs (87).

A dermatite de contacto consiste numa resposta inflamatória da pele desenvolvida após a exposição direta da pele a uma substância específica, e os sintomas incluem inflamação, rubor, prurido, pele seca e espessa. A dermatite de contacto pode ser classificada em duas componentes: uma componente irritante e uma componente alérgica. A dermatite de contacto irritante é a mais comum e ocorre imediatamente depois da exposição, sem que ocorra uma resposta imunológica. Já a dermatite de contacto alérgica pressupõe a presença de um alergénio, ou seja, uma substância capaz de induzir uma resposta celular do sistema imunológico através da ativação dos linfócitos T CD4⁺, os quais reconhecem o alergénio e libertam citocinas, culminando numa reação de hipersensibilidade que se irá manifestar 48 a 72 h depois da exposição (4,87).

A dermatite de contacto de componente alérgica tem uma prevalência estimada de 20,1% na população a nível global e pode ser provocada pela exposição a produtos cosméticos. De facto, após os metais, os produtos cosméticos são os principais responsáveis por induzir este tipo de reações alérgicas, as quais são frequentemente atribuídas a fragrâncias e conservantes presentes na sua composição. Na realidade, atualmente existem 26 fragrâncias conhecidas pelo seu potencial alergénico (**Quadro 9.1**), 18 das quais podem ser encontradas na composição de OEs. Devido ao seu potencial alergénico, estas fragrâncias têm um limite de concentração de 0,01% em produtos cosméticos que pressupõem lavagem após aplicação e 0,001% em produtos cosméticos que não pressupõem lavagem após aplicação. Sempre que essa concentração não seja respeitada é obrigatória a identificação da fragrância na rotulagem. Esta obrigatoriedade é fundamental para facilitar o diagnóstico de dermatite de contacto alérgica e identificar se alguma destas fragrâncias é o alérgeno responsável pela dermatite. Para além disso, a descrição destas fragrâncias no rótulo ajuda a evitar a exposição de indivíduos com este diagnóstico e o reaparecimento de reações de hipersensibilidade (4,87).

Quadro 9.1. Lista das 26 fragrâncias com potencial alergénico identificadas pela diretiva europeia, adaptado de (4)

<ul style="list-style-type: none"> • Amilcinamal • Álcool amilcinamílico • Álcool anisílico • Álcool benzílico • Benzoato de benzilo • Cinamato de benzilo • Salicilato de benzilo • Álcool cinamílico • Cinamal • Citral • Citronelol • Cumarina • Eugenol 	<ul style="list-style-type: none"> • Farnesol • Geraniol • Hexilcinamaldeído • Hidroxicitronelal • Hidroximetilpentilciclo-hexenocarboxaldeído • Isoeugenol • D-Limoneno • Linalol • Carbonato de metil-heptino • 3-Metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1-il)-3-buten-2-ona • Extrato de musgo de carvalho • Extrato de musgo de árvore • 2-(4-terc-butilbenzil)propionaldeído
--	---

Para ter uma ideia da utilização destas fragrâncias em produtos cosméticos foi publicado um estudo em 2018 no qual foram analisados 5588 produtos cosméticos, dos quais 85,5%

continham pelo menos uma das 26 fragrâncias com potencial alergénico conhecido. Destas fragrâncias o linalol e o limoneno foram os mais frequentemente encontrados, estando presentes em 49,5% e 48,5% dos produtos cosméticos (88). É importante destacar estes dois componentes uma vez que os mesmos são bastante frequentes na composição de OEs (4). Por exemplo, o limoneno, apesar de não ser o componente mais frequente, é um dos componentes presentes no TTO, com uma concentração variável entre os 0,5-1,5% (7).

A relação entre o TTO e as dermatites de contacto é frequente, tendo sido reportados alguns casos ao longo dos anos. De facto, de todos os OEs o TTO é aquele que tem sido mais reportado por provocar este tipo de reações adversas. Apesar do TTO ser considerado um agente sensibilizador fraco a moderado existem alguns fatores que podem influenciar o seu potencial para provocar dermatites de contacto como a sua concentração, a frequência de aplicação e a oxidação de alguns dos seus componentes (8,52,87).

Sabe-se que quando, por exemplo, um produto cosmético contendo TTO é aplicado, a probabilidade de ocorrer uma reação adversa como uma dermatite de contacto é menor comparativamente ao TTO na sua forma não diluída. No entanto, mesmo quando aplicado em concentrações entre os 5 e 10%, dependendo da formulação, o TTO pode provocar dermatites de contacto alérgicas, embora estas sejam menos graves (8,52).

O potencial para o TTO provocar reações alérgicas pode estar relacionado com a facilidade que alguns dos componentes dos OEs têm em penetrar na pele (devido à sua natureza lipofílica) e consequentemente formar ligações covalentes com proteínas presentes na pele. A ligação a estas proteínas favorece o seu reconhecimento por células do sistema imune e o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade (52,87).

Apesar de o TTO ter uma composição bastante complexa e dos dados disponíveis serem muito limitados, acredita-se que as reações de hipersensibilidade sejam maioritariamente atribuídas ao ascaridol, um produto resultante da oxidação do TTO, dado que em vários estudos cerca de 84% dos pacientes reportados com dermatite de contacto alérgica após a exposição ao TTO testaram positivo para este agente sensibilizador (**Tabela 9.1**) (8). Para além disso, estudos *in chemico* para avaliar os efeitos adversos do TTO também apontam para o potencial que o ascaridol tem em promover reações de hipersensibilidade (89). Outros dos principais possíveis agentes sensibilizadores são o terpinoleno e o α -terpineno, os quais podem ser encontrados na composição do TTO não oxidado (8).

Observando a **Tabela 9.1**, o *p*-cimeno parece estar pouco relacionado com as reações de hipersensibilidade, apesar de ser um produto resultante da oxidação do TTO frequentemente encontrado em amostras envelhecidas, o que pode parecer contraditório com aquilo que foi dito no capítulo 8.3.3. Contudo, como o *p*-cimeno é o produto final do processo de oxidação do α -terpineno (**Figura 9.1**), embora seja um produto estável, este acaba por ser um bom indicador do estado de oxidação do TTO. Na realidade, teoriza-se que os produtos intermediários desta reação possam estar associados a algumas reações de hipersensibilidade, devido à sua instabilidade e reatividade (89).

Tabela 9.1. Possíveis agentes sensibilizadores encontrados no TTO por percentagem de testes positivos em vários casos reportados na literatura, adaptado de (8).

Alergénio	Testes Positivos (%)
Ascaridol	84
Terpinoleno	78
α -Terpineno	77
1,2,4-Tridroximentano	62
α -Felandreno	43
Limoneno	40
Mirceno	16
Aromadendreno	10
D-Carvona	8
L-Carvona	7
Terpinen-4-ol	6
Viridifloreno	6
Sabineno	5
1,8-Cineole	2
<i>p</i> -Cimeno	2
α -Pino	0
β -Pino	0
γ -Terpineno	0
α -Terpineol	0

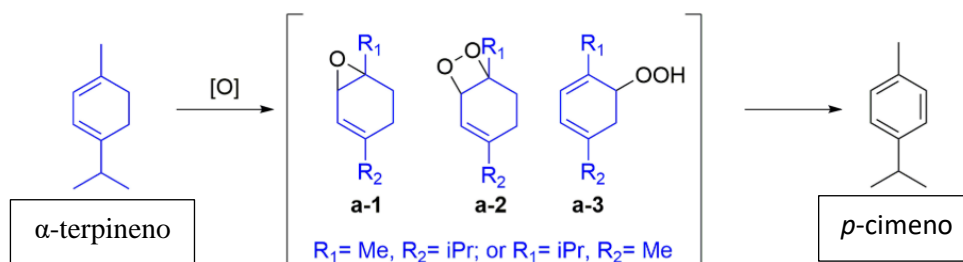


Figura 9.1. Mecanismo proposto para a oxidação do α -terpineno em *p*-cimeno, adaptado de (89).

Por outro lado, o TTO também pode aumentar a permeabilidade da pele a outros ingredientes presentes em formulações cosméticas, favorecendo a sua absorção e os seus efeitos indesejáveis, pelo que este deve ser um aspeto a ter em consideração no desenvolvimento de produtos cosméticos (52).

Assim, considerando a capacidade que os OEs têm para promover reações de irritação cutânea e hipersensibilidade, não é aconselhado a utilização de cosméticos com este tipo de ingredientes em peles sensíveis ou sensibilizadas. Isto prende-se com o facto de uma pele sensível ou sensibilizada apresentar por natureza uma menor tolerância e uma maior reatividade a estes produtos, devido a alterações que ocorrem ao nível da barreira cutânea e que promovem a penetração de substâncias irritantes, as quais estimulam o desenvolvimento de um processo inflamatório localizado (90).

10. Conclusões

Nos últimos anos tem-se observado um aumento da procura de ingredientes de origem natural na indústria cosmética, pelo facto de estes serem considerados como ingredientes seguros por parte dos consumidores, serem mais fáceis de produzir do que ingredientes de origem sintética e estarem associados a um menor impacto ambiental.

Um dos ingredientes naturais mais usado pela indústria cosmética é o TTO, um OE com elevado potencial devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais promissoras. De facto, existem vários estudos que apontam para a

aplicabilidade deste OE em produtos cosméticos e cosmecêuticos na acne, dermatite seborreica, envelhecimento cutâneo, saúde oral, onicomicose e higiene das mãos.

Contudo, existem algumas barreiras à utilização do TTO em produtos cosméticos e cosmecêuticos, nomeadamente pelo facto do TTO ter uma baixa solubilidade em água e ser facilmente degradado quando exposto à luz, calor, humidade ou ar. Estas barreiras podem não só condicionar a ação do TTO, mas também potenciar algumas reações adversas como as reações de hipersensibilidade e dermatites de contacto, as quais já foram reportadas durante o uso de produtos contendo TTO. Por isso a aplicação do TTO em produtos cosméticos e cosmecêuticos normalmente é limitada a pequenas concentrações para reduzir o risco de reações adversas.

Recentemente, de modo a ultrapassar estas barreiras, foram elaborados vários estudos nos quais o TTO foi incorporado em sistemas tecnológicos desenvolvidos com o objetivo de aumentar a estabilidade do TTO, preservar a sua composição, melhorar a sua penetração cutânea e permitir uma ação mais prolongada no local desejado. Os resultados destes estudos são promissores, abrindo novos horizontes relativamente à aplicação do TTO em produtos cosméticos e cosmecêuticos.

Apesar de haver muito interesse no uso do TTO por parte da indústria cosmética e deste OE já ser amplamente utilizado em produtos cosméticos e cosmecêuticos é importante criar mais evidências que suportem a sua aplicação, uma vez que muitos dos estudos elaborados são limitados.

11. Bibliografia

1. González-Minero FJ, Bravo-Díaz L. The use of plants in skin-care products, cosmetics and fragrances: past and present. *Cosmetics*. 2018;5(3):doi:10.3390/cosmetics5030050.
2. Chaudhri SK, Jain NK. History of cosmetics. *Asian J Pharm*. 2009;3(3):164–7.
3. Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G, Maggi F. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*. 2021;26(3):doi.org/10.3390/molecules26030666.
4. Sarkic A, Stappen I. Essential oils and their single compounds in cosmetics - a critical review. *Cosmetics*. 2018;5(1):doi:10.3390/cosmetics5010011.
5. Amberg N, Fogarassy C. Green consumer behaviour in cosmetic market. *Resources*. 2019;8(3):doi:10.3390/resources8030137.

6. Bejar E. Adulteration of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia*). *Bot Adulterants Bull.* 2017;1–8.
7. Australian Tea Tree Industry Association. ISO4730: 2017 Standard [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 11]. Available from: <https://teatree.org.au/standards.php>
8. de Groot AC, Schmidt E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis.* 2016;75(3):129–43.
9. Saller R, Berger T, Reichling J, Harkenthal M. Pharmaceutical and medicinal aspects of australian tea tree oil. *Phytomedicine.* 1998;5(6):489–95.
10. Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi SA, et al. Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: from farm to pharmacy. *Phyther Res.* 2017;31(10):1475–94.
11. European Medicines Agency. Tea tree oil [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 12]. p. 1–3. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-summary/tea-tree-oil-summary-public_en.pdf
12. Rieder BO. Consumer exposure to certain ingredients of cosmetic products: The case for tea tree oil. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017;108:326–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.012>
13. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº. 189/2008, de 24 de setembro. *Diário da República.* 2008;1ª série(185):6826–905.
14. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Cosméticos [Internet]. [cited 2021 Dec 26]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>
15. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de agosto. *Diário da República* 1ª série [Internet]. 2006;1ª série(167):6297–383.
16. Hassoun LA, Maibach HI, Sivamani RK. Regulatory overview of cosmeceuticals. In: Baran R, Maibach HI, editors. *Textbook of cosmetic dermatology.* 5th ed. Florida: CRC Press; 2017. p. 182.
17. Yousef H, Alhaji M, Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022 [cited 2022 Jul 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
18. Mescher AL. Skin. In: Mescher AL, editor. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas* [Internet]. 15th ed. McGraw-Hill Education; 2018. Available from: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160663113>
19. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, skin [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022 [cited 2022 Jul 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/>
20. Souto EB, Yoshida CMP, Leonardi GR, Cano A, Sanchez-Lopez E, Zielinska A, et al. Lipid-polymeric films: composition, production and applications in wound healing and skin repair. *Pharmaceutics.* 2021;13(8):doi.org/10.3390/pharmaceutics13081199.
21. Eucerin. Compreender a pele - estrutura e função da pele [Internet]. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://www.eucerin.pt/sobre-a-pele/conhecimentos-basicos-da-pele/estrutura-e-funcao-da-pele>
22. União Europeia. Regulamento (CE) Nº1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho. *J Of da União Eur.* 2009;59–208.

23. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Inspeção de cosméticos [Internet]. 2016 [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos/inspecao-de-cosmeticos>
24. Comissão Europeia. Orientações para a comunicação de efeitos indesejáveis graves [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1440983/Orientações+para+a+comunicação+de+efeitos+indesejáveis+graves/1590f3a1-f338-41f5-84ef-c26418385413>
25. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Cosmetovigilância [Internet]. 2016 [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/cosmetovigilancia>
26. Comissão Europeia. Anexo I: Avaliação da causalidade dos efeitos indesejáveis associados aos produtos cosméticos [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1440983/Avaliação+da+causalidade+dos+efeitos+indesejáveis+associados+aos+produtos+cosméticos/64b15453-bc17-4c16-a8a5-21a736090233>
27. Shah G, Baghel US. *Melaleuca alternifolia* : a review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. Int J ChemTech Res. 2017;10(7):418–27.
28. Plants of the World Online. *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:597833-1>
29. Shepherd M, Wood R, Raymond C, Ablett G, Rose T. Ecotype variation in early growth, coppicing, and shoot architecture of tea tree (*Melaleuca alternifolia*). Ind Crops Prod. 2015;76:844–56.
30. Institute of Food and Agricultural Sciences of University of Florida. *Melaleuca alternifolia* [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://assessment.ifas.ufl.edu/assessments/melaleuca-alternifolia/>
31. Australian Tea Tree Industry Association. Growing tea trees [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 17]. Available from: https://attia.asn.au/teatree_about_growing.php
32. Australian Tea Tree Industry Association. Harvesting tea tree [Internet]. 2009 [cited 2022 Jun 17]. Available from: https://attia.asn.au/teatree_about_harvesting.php
33. Ferreira A. Secagem e acondicionamento de plantas aromáticas e medicinais [Internet]. 2014. Available from: https://epam.pt/wp-content/uploads/2015/02/Guia_epam_secagem_fev2015.pdf
34. Wei C, Ma Z, Qiao J, Lin J, Li G. Effects of different drying methods on volatile composition of *Melaleuca alternifolia* essential oil. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2020;559(1):doi:10.1088/1755-1315/559/1/012010.
35. Battisti MA, Caon T, Machado de Campos A. A short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. J Drug Deliv Sci Technol. 2021;63:doi:10.3390/molecules23102584.
36. Barbieri C, Borsotto P. Essential oils: market and legislation. In: El-Shemy H, editor. Potential of essential oils [Internet]. London: IntechOpen; 2018. p. 107–27. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/61798>
37. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. J Food Sci. 2014;79(7):1231–49.

38. Chemat F, Boutekedjiret C. Extraction // Steam Distillation. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering [Internet]. Elsevier Inc.; 2015. p. 1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11557-4>
39. Al-Hilphy ARS. Engineering interventions for extraction of essential oils from plants. In: Verma D, Goyal M, editors. Engineering Interventions in Foods and Plants. 1st ed. Apple Academic Press; 2017. p. 51–85.
40. Huynh Q, Phan TD, Thieu VQQ, Tran ST, Do SH. Extraction and refining of essential oil from australian tea tree, *Melaleuca alterfornia*, and the antimicrobial activity in cosmetic products. J Phys Conf Ser. 2012;352:doi:10.1088/1742-6596/352/1/012053.
41. Lee LS, Brooks LO, Homer LE, Rossetto M, Henry RJ, Baverstock PR. Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). Biochem Syst Ecol. 2002;30(4):343–60.
42. Shelton D, Aitken K, Doimo L, Leach D, Baverstock P, Henry R. Genetic control of monoterpene composition in the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Cheel). Theor Appl Genet. 2002;105:377–83.
43. Padovan A, Keszei A, Hassan Y, Krause ST, Köllner TG, Degenhardt J, et al. Four terpene synthases contribute to the generation of chemotypes in tea tree (*Melaleuca alternifolia*). BMC Plant Biol. 2017;17:doi.org/10.1186/s12870-017-1107-2.
44. Australian Tea Tree Industry Association. Stability of pure Australian Tea Tree Oil. 2020.
45. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 2018;9(6):7204–18.
46. Yadav E, Rao R. A promising bioactive component terpinen-4-ol: a review. Int J Pharmacogn. 2016;3(8):336–45.
47. Sandner G, Heckmann M, Weghuber J. Immunomodulatory activities of selected essential oils. Biomolecules. 2020;10(8):doi:10.3390/biom10081139.
48. Lee S-Y, Chen P-Y, Lin J-C, Kirkby NS, Ou C-H, Chang T-C. *Melaleuca alternifolia* induces heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 cells through activation of the Nrf2-ARE pathway. Am J Chin Med. 2017;45(8):1631–48.
49. Puvača N, Čabarkapa I, Petrović A, Bursić V, Prodanović R, Soleša D, et al. Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and its essential oil: Antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production. Worlds Poult Sci J. 2019;75(2):235–46.
50. Oliva A, Costantini S, De Angelis M, Garzoli S, Božović M, Mascellino MT, et al. High potency of *Melaleuca alternifolia* essential oil against multi-drug resistant gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2018;23(10):doi:10.3390/molecules23102584.
51. Borotová P, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Tvrđá E, Kačániová M. Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. Plants. 2022;11(4):doi.org/10.3390/plants11040558.
52. Yadav E, Kumar S, Mahant S, Khatkar S, Rao R. Tea tree oil: a promising essential oil. J Essent Oil Res. 2017;29(3):201–13.
53. Umar H, Mahmood T, Hussain T, Aslam R, Shahzad Y, Yousaf AM. Formulation and in vitro characterization of tea tree oil anti-dandruff shampoo. Curr Cosmet Sci. 2021;1(1):doi.org/10.2174/2666779701666210426085302.

54. Sreedhar A, Mallya R, Apte M. Development and characterization of anti-dandruff niosomal hair gel containing tea tree oil. *Int J Pharm Sci Res.* 2020;11(1):91–103.
55. Marcos-Tejedor F, González-García P, Mayordomo R. Solubilization in vitro of tea tree oil and first results of antifungal effect in onychomycosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2021;39(8):395–8.
56. Welder WM. *Melaleuca alternifolia* australian tea tree oil as an effective antifungal agent topically for *Tinea unguium* (onychomycosis). *J Phytopharm.* 2020;9(6):419–22.
57. Carson CF, Hammer KA, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):50–62.
58. Romeo A, Iacovelli F, Scagnolari C, Scordio M, Frasca F, Condò R, et al. Potential use of tea tree oil as a disinfectant agent against Coronaviruses: a combined experimental and simulation study. *Molecules.* 2022;27(12):doi.org/10.3390/molecules27123786.
59. Reichling J. Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds - a scientific approach. *Planta Med.* 2021;88(08):587–603.
60. Lam NS, Long X, Su X zhuan, Lu F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomed Pharmacother.* 2020;130:doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110624.
61. National Cancer Institution. Antioxidants and cancer prevention [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 25]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/antioxidants-fact-sheet>
62. Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z. Evaluation of antioxidant activity of australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J Agric Food Chem.* 2004;52(10):2849–54.
63. Zhang X, Guo Y, Guo L, Jiang H, Ji Q. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Biomed Res Int.* 2018;2018:doi.org/10.1155/2018/2396109.
64. Assmann CE, Cadoná FC, Bonadiman B da SR, Dornelles EB, Trevisan G, Cruz IBM da. Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:1253–61.
65. Di Martile M, Garzoli S, Sabatino M, Valentini E, D’Aguanno S, Ragno R, et al. Antitumor effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol in combination with target therapy in melanoma models. *Cell Death Discov.* 2021;7:doi.org/10.1038/s41420-021-00510-3.
66. Byahatti SM, Bogar C, Bhat K, Dandagi G. Evaluation of anticancer activity of *Melaleuca alternifolia* (i.e., tea tree oil) on colon cancer cell line (HT29) - an in vitro study. *J Adv Clin Res Insights.* 2018;5(4):99–103.
67. Hugo Infante V, Maria Maia Campos P, Darwin M, Lohan S, Schleusener J, Schanzer S, et al. Cosmetic formulations with *Melaleuca alternifolia* essential oil for the improvement of photoaged skin: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical study. *Photochem Photobiol.* 2022;doi.org/10.1111/php.13660.
68. Qadir A, Ullah SNMN, Gupta DK, Khan N. Phytoconstituents-loaded nanomedicines for the management of acne. *J Cosmet Dermatol.* 2022;21(8):3240–55.
69. Bisht A, Hemrajani C, Upadhyay N, Nidhi P, Rolta R, Rathore C, et al. Azelaic acid and *Melaleuca alternifolia* essential oil co-loaded vesicular carrier for combinational

- therapy of acne. *Ther Deliv.* 2022;13(1):13–29.
70. American Skin Association. Acne [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.americanskin.org/resource/acne.php>
 71. Mazzarello V, Donadu MG, Ferrari M, Piga G, Usai D, Zanetti S, et al. Treatment of acne with a combination of propolis, tea tree oil, and *Aloe vera* compared to erythromycin cream: two double-blind investigations. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2018;10:175–81.
 72. Ghosh B, Bhattacharya D, Mukhopadhyay M. A hydrogel sheet mask with tea tree essential oil entrapment and targeted dose delivery capability. *Mater Today Proc.* 2022;57:77–83.
 73. Winkelman WJ. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clin Dermatol.* 2018;36(3):299–305.
 74. Malhi HK, Tu J, Riley T V., Kumarasinghe SP, Hammer KA. Tea tree oil gel for mild to moderate acne; a 12 week uncontrolled, open-label phase II pilot study. *Australas J Dermatol.* 2017;58(3):205–10.
 75. Ossa-Tabares JC, Llanos CJ, García AM. Evaluación de las características físicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomédica.* 2020;40(2):693–701.
 76. Sowell J, Pena SM, Elewski BE. Seborrheic dermatitis in older adults: pathogenesis and treatment options. *Drugs and Aging.* 2022;39:315–21.
 77. Piquero-Casals J, Hexsel D, Mir-Bonafé JF, Rozas-Muñoz E. Topical non-pharmacological treatment for facial seborrheic dermatitis. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2019;9:469–77.
 78. Adalsteinsson JA, Kaushik S, Muzumdar S, Guttman E, Ungar J. An update on the microbiology, immunology and genetics of seborrheic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2020;29(5):481–9.
 79. Zhang S, Duan E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. *Cell Transplant.* 2018;27(5):729–38.
 80. Graziano TS, Calil CM, Sartoratto A, Franco GCN, Groppo FC, Cogo-Müller K. In vitro effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatile sulphur compounds by oral bacteria. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(6):582–9.
 81. Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G, Benvenuti S. Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res.* 2018;32(5):544–51.
 82. Ripari F, Cera A, Freda M, Zumbo G, Zara F, Vozza I. Tea tree oil versus chlorhexidine mouthwash in treatment of gingivitis: a pilot randomized, double blinded clinical trial. *Eur J Dent.* 2020;14(1):55–62.
 83. Piekarcz T, Mertas A, Wiatrak K, Rój R, Kownacki P, Śmieszek-Wilczewska J, et al. The influence of toothpaste containing australian *Melaleuca alternifolia* oil and ethanolic extract of polish propolis on oral hygiene and microbiome in patients requiring conservative procedures. *Molecules.* 2017;22(11):doi:10.3390/molecules22111957.
 84. Vörös-Horváth B, Das S, Salem A, Nagy S, Böszörményi A, Kőszegi T, et al. Formulation of tioconazole and *Melaleuca alternifolia* essential oil pickering

- emulsions for onychomycosis topical treatment. *Molecules*. 2020;25(23):doi:10.3390/molecules25235544.
85. Youn BH, Kim YS, Yoo S, Hur MH. Antimicrobial and hand hygiene effects of tea tree essential oil disinfectant: a randomised control trial. *Int J Clin Pract*. 2021;75(8):doi.org/10.1111/ijcp.14206.
 86. Gnatta JR, de Brito Poveda V, Padoveze MC, Graziano KU, Turrini RNT, da Silva MJP. *Melaleuca alternifolia* essential oil soap: a potential alternative for hand hygiene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(7):1517–20.
 87. Omeragic E, Dedic M, Elezovic A, Becic E, Imamovic B, Kladar N, et al. Application of direct peptide reactivity assay for assessing the skin sensitization potential of essential oils. *Sci Rep*. 2022;12:doi.org/10.1038/s41598-022-11171-2.
 88. Bennike NH, Oturai NB, Müller S, Kirkeby CS, Jørgensen C, Christensen AB, et al. Fragrance contact allergens in 5588 cosmetic products identified through a novel smartphone application. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2018;32(1):79–85.
 89. Avonto C, Chittiboyina AG, Wang M, Vasquez Y, Rua D, Khan IA. In chemico evaluation of tea tree essential oils as skin sensitizers: impact of the chemical composition on aging and generation of reactive species. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(7):1108–17.
 90. Bioderma. O essencial sobre pele sensível [Internet]. [cited 2022 Sep 13]. Available from: <https://www.bioderma.pt/sua-pele/pele-sensivel/pele-sensivel-intolerante/o-essencial-sobre-pele-sensivel>

8) Evolução do(s) EIG														
<input type="checkbox"/> Recuperação <i>Em caso de recuperação, especificar quanto tempo levou a recuperar:</i>														
<input type="checkbox"/> Melhoria	<input type="checkbox"/> Efeitos posteriores (sequelas)	<input type="checkbox"/> Persistência dos efeitos <input type="checkbox"/> Desconhecida												
<input type="checkbox"/> Outros:														
9) Condições subjacentes relevantes														
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecidas <i>Se sim, especificar:</i>														
<input type="checkbox"/> Tratamento(s) relevante(s):														
<input type="checkbox"/> Utilização concomitante de outros produtos (fármacos, suplementos alimentares...):														
10) Informações médicas relevantes/Anamnese														
<input type="checkbox"/> Alergias, especificar: <i>Caso tenham sido previamente realizados testes, especificar o tipo e os resultados:</i>														
<input type="checkbox"/> Doenças cutâneas, especificar:														
<input type="checkbox"/> Outra(s) doença(s) subjacente(s) relevante(s):														
<input type="checkbox"/> Especificidades cutâneas, incluindo fotótipo:														
<input type="checkbox"/> Outras (exemplo: condições climáticas específicas ou exposição específica):														
11) Gestão do caso														
a) Tratamento(s) dos EIG														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)</th> <th style="width: 20%;">Dose</th> <th style="width: 20%;">Duração</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>			Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)	Dose	Duração									
Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)	Dose	Duração												
b) Outra(s) medida(s):														
Duração/dados complementares:														
c) Gravidade do efeito indesejável														
c-1) Incapacidade funcional (se aplicável)														
Descrição:														
<input type="checkbox"/> Se temporária, especificar a duração:	<input type="checkbox"/> Declaração médica disponível													
<input type="checkbox"/> Avaliação de perito disponível														
<input type="checkbox"/> Tratamento corretivo da incapacidade funcional:														
c-2) Invalidez (se aplicável), especificar a %:														
Descrição:														
<input type="checkbox"/> Avaliação de perito disponível	<input type="checkbox"/> Declaração médica disponível													
c-3) Hospitalização (se aplicável):														
Duração da hospitalização:	Nome e morada do hospital:													
Tratamento recebido durante a hospitalização:														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)</th> <th style="width: 20%;">Dose</th> <th style="width: 20%;">Duração</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>			Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)	Dose	Duração									
Fármacos prescritos: nome do produto (DCI)	Dose	Duração												
Tratamento prescrito ou medidas adotadas após hospitalização:														
c-4) Anomalias congénitas (se aplicável) :														
<input type="checkbox"/> Detetadas durante a gravidez	<input type="checkbox"/> Avaliação de perito disponível													
<input type="checkbox"/> Detetadas após o parto														

c-5) Risco vital imediato (se aplicável):

Tratamento e medidas específicas:

c-6) Morte (se aplicável):

Data: dd/mm/aaaa

Diagnóstico:

Declaração médica disponível

12) Investigação complementar

Sim Não *Se sim, especificar :*

Testes de alergias:

Resultados de Testes cutâneos realizados com os produtos cosméticos suspeitos:

Produtos testados	Métodos utilizados	Zona de teste (área do corpo)	Resultados

Testes cutâneos realizados com as substâncias (se disponíveis, anexar os resultados completos a este formulário)

Outros resultados de testes de alergias:

Investigação adicional (especificar, incluindo os resultados):

13) Resumo da pessoa responsável ou do distribuidor

a) Exposição do caso (Narrativa)

b) Seguimento do caso

Indicar o número de identificação do caso atribuído pela autoridade competente (se disponível):

c) Avaliação da causalidade

Muito provável Provável Não claramente atribuível Improvável Excluída Impossível de avaliar

d) Gestão

Este EIG já foi apresentado a uma autoridade competente?: Sim Não Não sabe
Se sim, a que autoridade competente foi notificado? :

e) Medidas corretivas

Sim Não *Se sim, especificar :*

f) Observações