

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

CRISTINA MAIRA TURIM SANTOS MIGUEL

**Óleo essencial de Pataqueira (*Conohea scoparioides* Cham. & Schltdl.) como
conservante natural em Cosméticos**

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

CRISTINA MAIRA TURIM SANTOS MIGUEL

**Óleo essencial de Pataqueira (*Conohea scoparioides* Cham. & Schltdl.) como
conservante natural em Cosméticos**

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.

São Paulo
2021

CRISTINA MAIRA TURIM SANTOS MIGUEL

**Óleo essencial de Pataqueira (*Conohea scoparioides* Cham. & Schltl.) como
conservante natural em Cosméticos**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre

Área de concentração: Insumos Farmacêuticos

Orientador: Prof. Dr Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Miguel, Cristina Maira Turim Santos
M634o Óleo essencial de Pataqueira (*Conobea scoparioides* Cham. &
Schltdl.) como conservante natural em Cosméticos / Cristina
Maira Turim Santos Miguel. -- São Paulo, 2021.
86p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa
de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.

Orientador: Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch

1. Conservantes. 2. Óleos Essenciais. 3. *Conobea scoparioides*.
4. Atividade Antimicrobiana. 5. Sinergia. I. T. II. Moreno, Paulo
Roberto Hrihorowitsch, orientador.

615.321 CDD

Nome: MIGUEL, Cristina Maira Turim Santos

Título: Óleo essencial de Pataqueira (*Conobea scoparioides* Cham. & Schltdl.) como conservante natural em Formulação Cosmética.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do Mestre.

Aprovado em:

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Orientador /Presidente

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

São Paulo, ____ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação de mestrado aos meus estimados pais, Geraldo (in memoriam) e Edna, meu amado esposo André Ricardo e aos meus filhos queridos André e Mariana por sempre me apoiarem em todos os sentidos para que a realização do meu sonho se tornasse realidade. Meu adorado pai, onde quer que esteja sei que sentirá orgulho de mim. Família amada, eu jamais serei capaz de demonstrar minha gratidão por tudo que fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por permitir que todo o trabalho fosse possível de ser realizado.

A minha amada família meus pais, Geraldo (in memoriam) e Edna, meu amado esposo André Ricardo e aos meus filhos queridos André e Mariana que me apoiaram nessa longa jornada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e compreensão. Sempre disposto a ajudar e mostrar qual o melhor caminho a ser seguido.

À Professora Dra. Telma M. Kaneko da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, que me acolheu no primeiro dia de visita ao seu laboratório, onde tudo começou.

À Professora Dra. Patrícia S. Lopes, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, por me indicar aos professores Telma e Paulo.

À Professora e amiga Elda Maria Cecílio Marcondes por permitir que esse meu tão sonhado caminho fosse possível.

À Professora Dra. Maria Cláudia Marx Young, laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo, por permitir a realização da análise da composição do óleo essencial da pataqueira.

Ao professor Dr. Marcus Scotti, Departamento de Química Centro de Ciências Exatas e da Natureza Universidade Federal da Paraíba, pela disponibilidade e ajuda na compreensão do delineamento experimental e nas análises de estatística aplicada.

À professora Dra. Cristina Helena dos Reis Serra e a técnica Dra. Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, pela sua grande colaboração na realização da formulação cosmética.

À professora Dra. Mariza Landgraf, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, pela sua benevolência em permitir que utilizasse as instalações laboratoriais para realização de todo o projeto e também pelas suas adoráveis aulas de microbiologia.

Ao professor Dr. Uelinton Manoel Pinto, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, que todas as vezes que precisei me acolheu com tanta generosidade nas aulas de microbiologia e no laboratório.

À professora Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, por me receber tão carinhosamente no laboratório e também pelas aulas memoráveis de microbiologia.

Agradeço aos colegas tanto do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Felipe, Kamilla, Fabiana, Emanuela, Marcus, Letícia, Mateus como também do Laboratório de Alimentos, Diogo, Marcela, Jéssica, Emília, Loredane, Catarina que sempre me incentivaram e ajudaram em tantos momentos difíceis.

As queridas funcionárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Kátia e Lucia que sempre me auxiliaram em tudo que foi preciso com tanto carinho e dedicação.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em especial ao David da secretaria da pós graduação por toda sua ajuda, e professores os quais tive oportunidade de aprender muito.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Programa PQI.

*“Frequentemente é necessário ter mais coragem
para ousar fazer certo do que temer fazer errado”.*

Abraham Lincoln

RESUMO

MIGUEL, C. M. T. **Óleo essencial de Pataqueira (*Conobea scoparioides* Cham. & Schltdl.) como conservante natural em Cosméticos**. 2021. Dissertação (Mestrado em – Faculdades de Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021

Um dos principais grupos de conservantes utilizados na maioria dos cosméticos são os parabenos que em muitos estudos demonstraram que podem provocar reações alérgicas como dermatite de contato, entre outras sensibilizações cutâneas. A fim de minimizar esses problemas, a indústria está produzindo cosméticos livres de conservantes ou de origem natural e em associações aos sintéticos. Dentre os conservantes naturais utilizados, podemos citar os óleos essenciais como uma alternativa viável. Diante deste contexto o presente trabalho visa avaliar experimentalmente o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltdl., conhecida popularmente como pataqueira, o efeito de sua associação com parabenos e de sua eficácia como conservante em bases cosméticas. A composição do óleo essencial foi avaliada, indicando que este é composto em sua maior parte por terpenos, tendo éter metílico do timol (39,2%), timol (33,8 %) e α -felandreno (15,9%) como compostos majoritários. A atividade antimicrobiana do óleo essencial e do timol foi acessada através da concentração inibitória mínima (CIM), cujos resultados em $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial e o timol foram respectivamente: *Staphylococcus aureus* 650,70 e 284,90, *Escherichia coli* 721,53 e 271,20, *Pseudomonas aeruginosa* 1748,00 e > 2.000 , *Burkholderia cepacia* 833,03 e 1.077,70, *Candida albicans* 521,43 e 172,61 e *Aspergillus brasiliensis* 300 e 400. O efeito sinérgico da associação do óleo essencial com os parabenos foi realizado através de um delineamento experimental centroide simplex para uma mistura de metilparabeno, propilparabeno e óleo essencial frente aos mesmos micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana. As concentrações ideais obtidas pela análise estatística para cada componente em $\mu\text{g/mL}$ foram: 1120 para o metilparabeno, 350 para o propilparabeno e 675 para o óleo essencial. O teste de eficácia do sistema conservante em formulação cosmética foi efetuado empregando as concentrações ideais e mais duas concentrações superiores e uma abaixo do ideal. Para todas as cepas microbianas desafiadas o resultado do teste foi de redução total da carga microbiana inoculada nos sete dias de ensaio e nenhum aumento até o vigésimo oitavo

dia o que demonstra a eficácia da associação do óleo essencial com os conservantes sintéticos.

O óleo essencial de *C. scoparioides* apresentou um potencial antimicrobiano importante tanto sozinho como em associação com conservantes sintéticos. Estes resultados sugerem que esse óleo pode ser usado para compor um sistema conservante para formulações cosméticas contendo uma menor quantidade de sintéticos.

Palavras-chave: Conservantes. Óleos Essenciais. *Conobea scoparioides*. Atividade Antimicrobiana. Sinergia.

ABSTRACT

MIGUEL, C. M. T **Pataqueira essential oil (*Conohea scoparioides* Cham. & Schltldl.) as a natural preservative in cosmetics** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

One of the main groups of preservatives used in most cosmetics are parabens, that many studies have shown that they can cause allergic reactions such as contact dermatitis, among other skin sensitizations. To minimize these problems, the industry is producing cosmetics preservative free or using natural products instead and their combination with the synthetics. Among the natural preservatives used, we can mention essential oils as a viable alternative. In this context, the present work aims to experimentally evaluate the antimicrobial potential of the *Conohea scoparioides* Cham. & Schltldl. essential oil, popularly known as pataqueira, the effect of its association with parabens and its effectiveness as a preservative in cosmetic bases. The essential oil composition was analyzed, indicating that it is composed mostly of terpenes, with thymol methyl ether (39.2%), thymol (33.8%) and α -phelandrene (15.9%) as major compounds. The antimicrobial activity of essential oil and thymol was accessed through the minimum inhibitory concentration (MIC), whose results in $\mu\text{g/mL}$ for essential oil and thymol were respectively: *Staphylococcus aureus* 650.70 and 284.90, *Escherichia coli* 721, 53 and 271.20, *Pseudomonas aeruginosa* 1748.00 and $> 2,000$, *Burkholderia cepacia* 833.03 and 1,077.70, *Candida albicans* 521.43 and 172.61 and *Aspergillus brasiliensis* 300 and 400. The synergistic effect of the association of essential oil with parabens was performed through a centroid simplex experimental design for a mixture of methylparaben, propylparaben and essential oil against the same microorganisms used in the antimicrobial activity evaluation. The ideal concentrations obtained by statistical analysis for each component in $\mu\text{g/mL}$ were: 1120 for methylparaben, 350 for propylparaben and 675 for essential oil. The effectiveness test of the preservative system in cosmetic formulation was carried out using the ideal concentrations plus two higher concentrations and one below the ideal. For all challenged microbial strains, the test result was a total reduction of the inoculated microbial load in the seven days of testing and no increase until the twenty-eighth day, which demonstrates the effectiveness of the association of essential oil with synthetic preservatives.

C. scoparioides essential oil showed an important antimicrobial potential both alone and in association with parabens. These results demonstrated that it can be used to compose a preservative system for cosmetic formulations containing lower amounts of synthetics.

Keywords: Preservatives. Essential Oils. *Conocarpus scoparioides*. Antimicrobial activity. Synergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das paredes das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	10
Figura 2. Imagem do Mapa de distribuição geográfica da espécie <i>C. scoparioides</i>	11
Figura 3. Distribuição geográfica da espécie <i>C.scoparioides</i> no Brasil.....	12
Figura 4. Imagem da flor característica de <i>Conobea scoparioides</i>	13
Figura 5. Representação do habitat natural de <i>Conobea scoparioides</i>	14
Figura 6. Ciclo do plantio de <i>Conobea scoparioides</i>	15
Figura 7. Extração do óleo essencial através do sistema de vidro tipo Clevenger	16
Figura 8. Extração do óleo essencial em escala industrial	16
Figura 9. Fórmula estrutural do timol.....	17
Figura 10. Esquema – Padronização da suspensão microbiana Preparo da suspensão mãe	22
Figura 11. Esquema de plaqueamento utilizado no CIM	24
Figura 12. Representação Gráfica do delineamento experimental em rede simplex centroide com pontos adicionais.....	26
Figura 13. Esquema para contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação	30
Figura 14: Esquema – Teste de Eficácia do Sistema Conservante.....	33
Figura 15. Estrutura dos compostos majoritários timol e éter metílico do timol identificados no óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i>	35
Figura 16. Curva de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> em relação ao óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> e ao timol	37
Figura 17. Curva de inibição do crescimento de <i>E. coli</i> em relação ao óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> e ao timol.....	37
Figura 18. Curva de inibição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> em relação ao óleo essencial de <i>C. scoparioides</i>	38
Figura 18. Curva de inibição do crescimento de <i>B. cepacia</i> em relação ao óleo essencial de <i>C. scoparioides</i>	39
Figura 19. Curva de inibição do crescimento <i>C. albicans</i> em relação ao óleo essencial de <i>C. scoparioides</i>	39
Figura 20. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> , metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo <i>S. aureus</i>	43

Figura 21. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> , metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo frente ao micro-organismo <i>P. aeruginosa</i>	43
Figura 22. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> , metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo <i>E.coli</i>	44
Figura 23. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> , metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo <i>B. cepacia</i>	45
Figura 24 Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de <i>Conobea scoparioides</i> , metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo <i>C. albicans</i>	45
Figura 25. Controle da viabilidade das cepas microbianas quanto dos resultados das quatro	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração inibitória mínima do metilparabeno e propilparabeno	25
Tabela 2. Composições obtidas através do delineamento experimental de misturas	27
Tabela 3. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Conobea scoparioides</i>	34
Tabela 4. Concentração inibitória mínima obtida para o óleo essencial de <i>Conobea.scoparioides</i> e timol frente <i>Staphylococcus. aureus</i> , <i>Escherichia. coli</i> , <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia. cepacia</i> , <i>Candida. albicans</i> (concentração do inóculo 2×10^3 UFC/mL).	36
Tabela 5. Resultados das variáveis independentes para as diferentes composições, com a adição do óleo essencial, frente ao desafio com o inóculo de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> e <i>A.brasiliensis</i>	42
Tabela 6. Porcentagem da concentração dos componentes após associações para inibição dos micros- organismos	46
Tabela 7. Valores das CIM e das concentrações de cada componente após as associações	47
Tabela 8: Concentrações dos componentes que compõem o sistema conservante	49
Tabela 9. Controle da viabilidade das cepas microbianas utilizadas no teste de eficácia do sistema conservante	50
Tabela 10: Teste de eficácia do sistema conservante das quatro formulações com as respectivas concentrações das associações do metilparabeno, propilparabeno e o óleo essencial.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição empregada para a formulação.....	28
Quadro 2. Categorias de produtos e critérios para a eficácia antimicrobiana...	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. CONSERVANTES.....	3
2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS E USO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	7
2.3. CONOBEA SCOPARIOIDES CHAM. & SCHLTDL	11
2.4. Timol	17
3. OBJETIVO	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Óleo Essencial	20
4.2. Determinação dos perfis cromatográficos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	20
4.3. Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e seus compostos majoritários.....	21
4.4. Preparação do inóculo	21
4.5. Controle positivo	23
4.6. Ensaio da atividade antimicrobiana.....	23
4.7. Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação do óleo essencial com parabenos (SIMPLEX-CENTROIDE)	25
4.8. Preparação da formulação cosmética	28
4.9. Teste de eficácia do sistema conservante	29
4.9.1. Contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação.....	29
4.9.2 Preparação das culturas de micro-organismos.....	31

4.9.3 Execução do ensaio	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO OE POR CG-MS.....	34
5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL COM PARABENOS (SIMPLEX-CENTROIDE)	41
5.5. TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE	48
5.5.1. Manipulação da formulação cosmética	48
5.5.2. Contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação.....	50
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na demanda do mercado cosmético mundial por produtos naturais. Os conceitos atuais da sociedade contemporânea buscam com o uso de elementos e formulações da “natureza” melhorar a qualidade de vida em geral, a beleza, o bem-estar e o prazer. Essa demanda é alavancada pelo “consumo verde”, ou seja, preferência por produtos elaborados com ativos naturais. Um outro aspecto observado é a exigência do consumidor atual, que tem se tornado cada vez mais criterioso com a qualidade do produto que ele irá consumir, optando por produtos cada vez mais próximos da sua origem, ou seja, com poucos ou livres de ingredientes sintéticos (MIGUEL, 2011; PACKER; LUZ, 2007).

Um outro fator, foi a entrada de grandes empresas do setor neste segmento o forte “marketing ambiental” ou “ecológico”. O crescimento médio anual do mercado internacional de produtos naturais para cuidado pessoal encontra-se em torno de 8 a 25%. Porém os mesmos estudos mostram que para produtos sintéticos, a taxa média de crescimento encontra-se inferior, em torno de 3 a 10% (MIGUEL, 2011).

Em relação ao meio ambiente, dentre diferentes tipos de poluição, como por exemplo, do ar, da água, do solo, a indústria cosmética também possui uma contribuição importante devido às substâncias químicas empregadas na sua manufatura, que podem ser tóxicas ao meio ambiente e, por conseguinte, afetar a saúde humana (BHOMICK; RAO, 2014). Portanto, produtos cosméticos com componentes naturais apresentam grandes atrativos, por serem ecologicamente corretos, potencialmente mais saudáveis e voltados à responsabilidade social (FLOR *et al.*, 2019). Diante desse quadro, a indústria cosmética, está em busca de produtos que contenham substâncias naturais em suas formulações com propriedades fitocosméticas e/ou ação conservante, em substituição aos compostos sintéticos (PACKER; LUZ, 2007). No mercado nacional, a busca por produtos de origem natural explora de forma racional a biodiversidade brasileira, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável. A utilização de matérias-primas naturais que apresentem estudos científicos que comprovem sua segurança e eficácia são de grande interesse (FERRARI *et al.*, 2007).

Para garantir a boa qualidade de um cosmético, primeiramente é necessária a implementação de boas práticas de fabricação. Essas boas práticas de fabricação têm como objetivo a padronização de procedimentos, normas, validações, que ocorrem desde à aquisição de matérias primas de boa qualidade, através da qualificação de fornecedores, até a fase final de produção como o envase do produto. Todos esses critérios irão garantir que o produto final apresente qualidade sanitária adequada e conseqüentemente os padrões microbiológicos estarão dentro da conformidade. Esses padrões microbiológicos são definidos não só pela ausência de micro-organismos patogênicos, mas também garantem que a carga microbiana não patogênica seja a menor possível. Para garantir a longevidade da qualidade do produto cosmético, mesmo após manuseio pelo consumidor final, são utilizados e os agentes antimicrobianos, denominados de conservantes, dentro de concentrações legalmente permitidas (HALLA *et al.*, 2018).

Os conservantes apresentam dupla função numa formulação, a primeira de proteção do produto e a segunda de proteção ao consumidor. Essa última entrará em ação durante a utilização do produto, uma vez que o uso de forma descuidada pode levar a sua contaminação (FARRINGTON *et al.*, 1995). Segundo o FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020), conservantes, de forma geral, são os componentes da formulação cosmética que podem causar alergia e dermatite de contato, perdendo somente para fragrâncias como responsáveis pela ocorrência de reações adversas. Sendo assim, vem se tornando crescente a preocupação em relação à toxicidade de conservantes sintéticos, o que demonstra o interesse pela busca de produtos naturais para minimizar os efeitos tóxicos causados pelos sintéticos.

Algumas das substâncias utilizadas na composição dos produtos cosméticos também podem ter propriedades antimicrobianas, contribuindo para a conservação desses produtos, como, por exemplo, muitos óleos essenciais e alguns álcoois (ANVISA, 2004). Os óleos essenciais em formulações cosméticas, além de sua função como fragrância, têm demonstrado ação inibitória no crescimento de vários patógenos tanto Gram-positivos quanto negativos (BARAKAT, 2014). A substituição ou associação dos óleos essenciais à antioxidantes e antimicrobianos sintéticos também trouxe benefícios, aumentando o espectro de ação e, conseqüentemente, uma redução nas concentrações dos antioxidantes e conservantes artificiais (MIRANDA *et al.*, 2016). Um outro fator relevante na utilização de um conservante de origem natural seria que, na maioria das vezes, essas substâncias

apresentam outras propriedades funcionais para o produto cosmético além da propriedade antimicrobiana (KOČEVAR GLAVAČ; LUNDER, 2018).

Diante desse cenário vários estudos têm demonstrado a importância na utilização dos óleos essenciais no combate aos micro-organismos patogênicos devido a sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral como uma alternativa viável na preservação de produtos tanto na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (SANTOS, F.S.; NOVALES, 2012). Assim, dentre as associações de conservantes já existentes, a proposta deste estudo é avaliar o efeito sinérgico de um óleo essencial da flora brasileira com um grupo de conservantes sintéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSERVANTES

A função do conservante é de estender ao máximo a durabilidade de produtos perecíveis, sejam eles da área alimentícia, cosmética ou farmacêutica, a fim de aumentar a vida útil desses produtos e manter sua qualidade e segurança (SATI, 2013). Um conservante ideal deve possuir um grande espectro de ação contra todos micro-organismos e também não deve apresentar cor, odor, não interagir com outros ingredientes, apresentar grande eficácia em baixas concentrações, ter uma alta hidrossolubilidade para evitar contaminações microbianas na fase aquosa, ser estável em uma ampla faixa de pH e de temperatura, apresentar tempo de prateleira ilimitado, ser seguro para o uso quando concentrado e diluído e ter baixo custo (RODEN, 2010).

A atuação antimicrobiana dos conservantes pode estar relacionada à destruição, atraso ou bloqueio do crescimento microbiano. O aumento da carga microbiana, mesmo de não patogênicos, poderia favorecer à fermentação, acidificação, contaminação e decomposição do produto o que levaria à alteração de suas características organolépticas, podendo acarretar riscos à saúde do usuário (SATI, 2013).

Em formulações que contenham alta concentração de água, alimentícias, cosméticas ou farmacêuticas, a escolha do conservante é de grande importância pois este

deve apresentar um amplo espectro de ação tanto para bactérias quanto para fungos, para que se evite a contaminação do produto durante seu uso (VANRELL, 2007). Porém um ponto muito importante para a escolha do conservante é sua baixa toxicidade, pois, com a utilização contínua do produto, haverá uma exposição constante ao conservante pelo consumidor final. Caso o conservante apresente características alergênicas, poderá causar a uma dermatite de contato entre outros problemas aos usuários, representando um desafio à saúde pública (SCHWENSEN et al., 2015).

Para avaliar a eficácia dos conservantes em formulações cosméticas e farmacêuticas é necessário desafiá-lo. Para isto é mandatório a realização do teste de eficácia do sistema conservante (TEC) para todo o produto em desenvolvimento, lotes piloto e do produto final. O ensaio tem como o objetivo o uso do conservante na dosagem adequada com a finalidade de minimizar efeitos adversos relacionados à contaminação microbiana e assegurar uma baixa concentração do conservante em estudo, porém eficaz (ANVISA, 2019).

O teste tem como fundamento a contaminação proposital do produto com micro-organismos específicos e avaliação desta carga em intervalos definidos. Os micro-organismos utilizados geralmente são um representante das bactérias Gram positivas, Gram negativas, dos bolores e leveduras. A escolha dos micro-organismos utilizados nos testes microbianos compendiais está diretamente relacionada ao fato deles serem potenciais contaminantes patogênicos que podem ser encontrados no ambiente da manufatura de produtos farmacêuticos e cosméticos (DENYER et al., 2006).

Como representante das Gram positivas temos o *Staphylococcus aureus* que apesar de ser um micro-organismo que faz parte da microbiota da pele humana, pode tornar-se patogênico se houver alguma quebra de barreira da pele, ou queda de imunidade (BRANCO et al., 2018). *S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais comuns encontradas em infecções de pele como furúnculos, impetigo, conjuntivite, foliculite (TAN et al, 2013).

Para as Gram negativas são exigidas duas bactérias mandatárias, uma fermentadora sendo a *Escherichia coli*, que é um indicativo de contaminação fecal o que sugere uma falta de higiene do local de fabricação e/ou dos colaboradores (OKEKE; LAMIKANRA, 2001). A segunda uma não fermentadora, como *Pseudomonas*

aeruginosa, comumente encontrada na tubulação de água e resistente à alguns agentes bactericidas. Ambas são fortes representantes de contaminação em cosméticos e presença de *P. aeruginosa* pode levar a sérias infecções oculares entre outras patologias (BUDECKA et al, 2014).

Como levedura temos *Candida albicans*, pois alguns cosméticos podem apresentar ingredientes ricos em nutrientes provenientes de substratos orgânicos como açúcar, proteínas, lipídeos, o que favorece o crescimento de leveduras osmofílicas, tipo *C. albicans*. Essas leveduras podem alterar a estabilidade da formulação devido à fermentação do açúcar se estiver presente na formulação. O grupo dos bolores é representado por *Aspergillus brasiliensis*, pois este está presente no ar habitualmente, podendo contaminar e germinar produtos farmacêuticos e cosméticos, promovendo descoloração e deterioração (DENYER; BAIRD, 2007).

Porém qualquer micro-organismo poderá ser desafiado, caso este seja uma ameaça ao produto. Como exemplo, temos *Burkholderia cepacia*, uma bactéria Gram negativa não fermentadora, considerada um patógeno oportunista frequentemente e encontrado em produtos cosméticos e farmacêuticos. Este micro-organismo tem apresentado um aumento da resistência frente a agentes antimicrobianos, como os conservantes.(JIMENEZ; SMALLS, 2000).

Dentre os conservantes mais utilizados temos os nitritos, nitratos, benzoatos, sulfitos, sorbatos, parabenos, formaldeído, os antioxidantes como o hidroxitolueno butilado (BHT, 2,6 di-*terc*-butil metil fenol), hidroxianisol butilado (BHA, 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol / 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol) e galato de propila, os anti-enzimáticos, como ácido cítrico e ácidos eritórbicos, entre outros. (SATI, 2013). Dentre vários conservantes utilizados para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes listados pela ANVISA na RDC N°29 de 2012, encontram-se os parabenos.

Os parabenos constituem uma série homóloga do ácido 4-hidroxibenzóico esterificado na posição C4, incluindo os derivados metil-, etil-, propil-, isopropil-, butil-, isobutil, heptil- e benzilparabenos. Devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade, solubilidade, amplo espectro de ação frente às bactérias e fungos e são relativamente seguros à saúde do usuário (MATWIEJCZUK; GALICKA, 2020). Dentre os parabenos temos o metilparabeno e o propilparabeno como os mais utilizados em formulações

cosméticas (YAZAR et al., 2011). Os estudos demonstraram que, utilizados em baixas concentrações apresentam atividade antimicrobiana mais efetiva em formulações com pH abaixo de 8 e são mais eficazes frente às bactérias Gram-positivas em comparação às Gram-negativas (SONI et al., 2002). O metilparabeno cuja atividade antimicrobiana já foi muito estudada, é mais efetivo contra fungos do que para bactérias, e apresenta uma baixa resposta contra algumas espécies de *Pseudomonas* (HERMAN et al., 2013). Devido a utilização em alguns casos exacerbada de conservantes em produtos tanto farmacêuticos quanto cosméticos, tem-se observado uma crescente resistência dos micro-organismos patógenos como: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos o que leva a um insucesso no uso de determinados conservantes nas formulações (SANTOS, F.S.; NOVALES, M. G 2012).

Determinadas formulações cosméticas também podem apresentar características auto conservantes. Uma tecnologia, conhecida como "Hurdle Technology", descreve a junção de diferentes fatores de conservação com a finalidade de evitar a deterioração do produto final, proporcionando à formulação um meio hostil que impeça o crescimento microbiano (VARVARESOU et al., 2009).

Dentre as etapas necessárias para que um produto apresente características de auto conservação, podemos citar os princípios básicos, como: boas práticas de fabricação, embalagem apropriada, fórmulas água em óleo, compostos com baixa atividade de água como por exemplo: pó de talco, amido de milho, desodorantes (KABARA, 1997). Além disso, existem ingredientes antimicrobianos multifuncionais tanto sintéticos quanto naturais que favorecem a produção de um cosmético auto conservante. Dentre os sintéticos podemos citar: monoésteres de glicerol, a etilhexilglicerina, o caprilato de glicerila, que por exemplo, atuam tanto como um coemulsificante usado para estabilizar emulsões de água e óleo e também como um agente antimicrobiano.

Quanto aos antimicrobianos funcionais de origem natural, temos os derivados de plantas, óleos essenciais e extratos, dentre vários exemplos encontrados na literatura, podemos citar: os óleos essenciais de *Calamintha officinalis* Moench, *Lavandula officinalis* Chaix, *Rosmarinus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Mill utilizados em cremes, emulsões e shampoos (HERMAN, 2019).

Essas substâncias de origem natural, ao serem adicionadas à uma formulação cosmética, além de apresentarem ação antimicrobiana, acrescentam ao produto uma característica inovadora, por englobarem compostos biologicamente ativos denominados de aditivos funcionais (ADASZYŃSKA, M., SWARCEWICZ, M, 2011).

Uma outra razão para utilização de conservantes naturais a formulações cosméticas é a preferência observada pelos consumidores, os quais associam a presença de ingredientes naturais nas formulações, como um diferencial positivo. Portanto os óleos essenciais são de grande importância neste segmento já que apresentam propriedades farmacológicas, cosméticas e antimicrobianas a um baixo custo (MUYIMA et al., 2002).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS E USO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, de uma forma geral, são misturas complexas e heterogêneas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e de aparência oleosa. São encontrados em diferentes órgãos das plantas como nas sementes, flores, folhas, cascas do caule e frutos, e conseqüentemente apresentam diferentes composições químicas. Dentre os componentes encontrados em um óleo essencial, temos uma enorme variabilidade de classes, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas cumarinas, até compostos contendo enxofre, entretanto, quimicamente, a grande maioria é constituída de derivados terpeneoídicos ou de fenilpropanoídicos (SIMÕES *et al.*, 2007). A fragrância característica de um óleo é devida, na maioria das vezes, a prevalência de um a três desses componentes (COSTA, 2010).

Fatores como ambiente, tipo de cultivo, temperatura, umidade relativa, teor de hidratação do terreno, processo de obtenção, ciclo vegetativo, podem levar a ocorrência de uma grande diversidade na composição quantitativa do mesmo óleo essencial. Outro fator importante para a variabilidade dos componentes de um óleo essencial dentro da mesma espécie são os chamados quimiotipos. Essa variação se caracteriza por uma alteração qualitativa da composição química dentro da mesma espécie que pode ocorrer devido ao isolamento genético das populações (SIMÕES *et al.*, 2007).

A extração dos óleos essenciais, em escala laboratorial, geralmente é realizada por método de destilação por arraste a vapor com extrator do tipo Clevenger (SILVA *et al.*, 2015). Somente no caso dos cítricos a extração é feita através de prensagem (FEITOSA *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais são utilizados nas indústrias alimentícia, química, farmacêutica, mas sobretudo na indústria cosmética, ocupando 14% do mercado de cosméticos no Brasil. Conseqüentemente o volume de na produção dos óleos essenciais tem aumentado consideravelmente devido ao evidente crescimento da indústria cosmética brasileira. (FERRAZ *et al.*, 2009).

A sua utilização principal seria como fragrância, mas também por suas propriedades farmacológicas conhecidas, como por exemplo, ação antiespasmódica, carminativa, cardiovascular, sobre o SNC, anestésica local, anti-inflamatória e antisséptica. Esta última ocorre em decorrência da presença de alguns compostos fenólicos, aldeídos e álcoois (SIMÕES *et al.*, 2007). Contudo, devido à grande variedade de estruturas na composição dos óleos essenciais, não se pode atribuir sua característica antimicrobiana à presença de um único componente. Porém, se seu integrante em maior concentração tem uma ação antimicrobiana, esse exercerá a maior atividade (MORENO *et al.*, 2013).

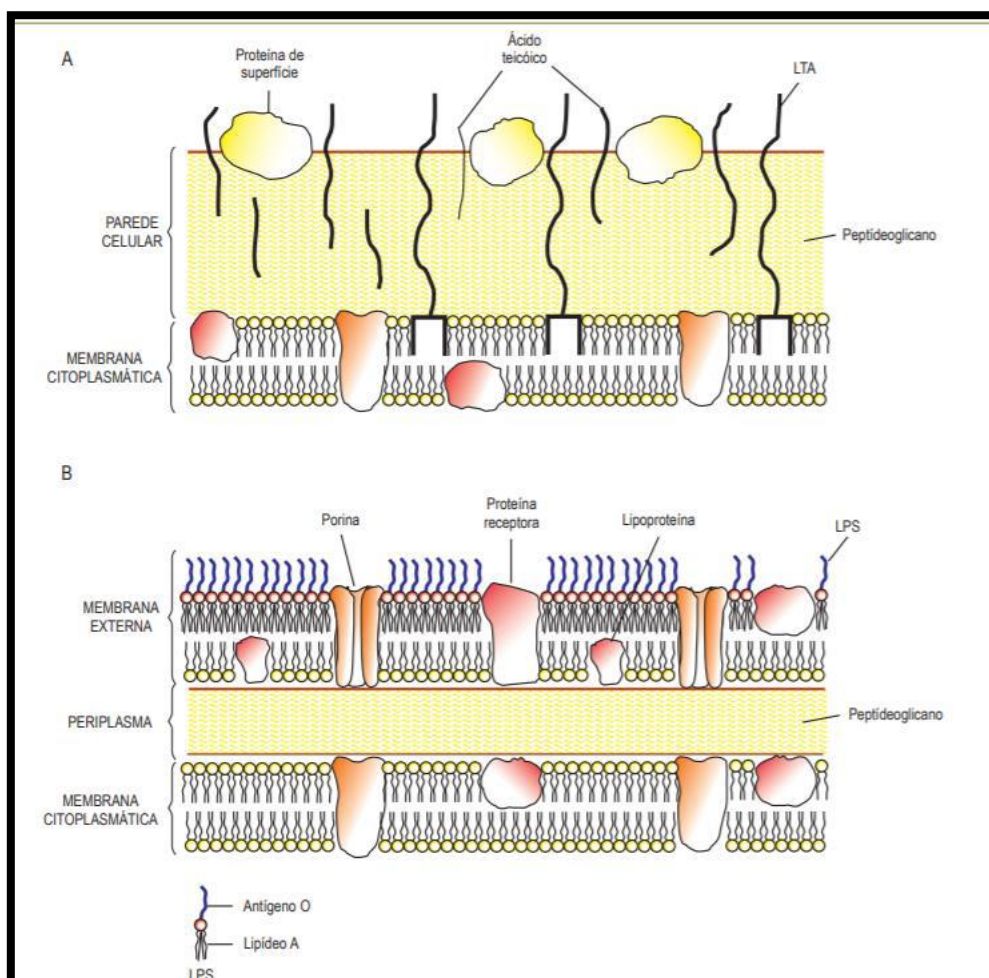
Devido suas propriedades antimicrobianas, esta classe de metabólitos tem sido utilizada para a preservação efetiva de formulações cosméticas. Em um estudo anterior alguns óleos essenciais apresentaram eficácia como conservantes naturais, a saber: *Rosmarinus officinalis.*, *Lavandula officinalis*, *Pteronia incana* DC., *Artemisia afra* Jacq. *ex Willd.*, *Eucalyptus globulus* Labill., *Laurus nobilis* L., *Salvia officinalis* L. e *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (PAPAGEORGIU *et al.*, 2010).

Dentre os métodos utilizados para a avaliação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais temos: mínima concentração inibitória através de difusão em ágar ou microdiluição em caldo, e subsequentemente a realização do teste de eficácia do sistema conservante em formulação cosmética. (CARSON; RILEY, 1995), (MANGENA; MUYIMA, 1999), (MUYIMA *et al.*, 2002), (MACCIONI *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais são ativos frente a bactérias e fungos. Com relação às bactérias observamos que as Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas, devido a diferença na composição da parede celular, conforme podemos observar na Figura 1. Nas Gram-positivas a parede celular é constituída principalmente por um peptidoglicano, cerca de 90 a 95%, e ainda por algumas moléculas de ácido teóico e proteínas ligadas ao componente principal (Fig. 1A). Essa estrutura facilita a penetração de moléculas hidrofóbicas e, conseqüentemente, dos componentes dos óleos essenciais. A entrada dessas substâncias na célula bacteriana levará a desarranjos internos promovendo a lise celular e morte. Para as bactérias Gram-negativas, a parede celular consiste em uma fina camada de peptidoglicano e a presença de uma membrana externa constituída por uma dupla camada de fosfolipídios ligados à membrana interna por lipopolissacarídeos. A permeabilidade da membrana externa está relacionada a presença de proteínas, denominadas porinas, que são canais hidrofílicos transmembrana, permitindo que solutos hidrofílicos entrem na célula bacteriana (Fig. 1B). Assim, compostos hidrofóbicos, como os componentes dos óleos essenciais, têm maior resistência a permear, o que faz com que as Gram-negativas sejam mais robustas frente às substâncias lipofílicas (NAZZARO et al., 2013).

Estudos demonstraram que a ação antifúngica de alguns óleos essenciais pode promover uma alteração tanto na membrana plasmática quanto na membrana mitocondrial fúngica, que são responsáveis por formar uma barreira referente à passagem de íons, como H^+ , K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , e no controle da entrada e saída de organelas. Com a alteração da permeabilidade das membranas, muitas funções celulares serão modificadas, como o transporte de soluto, a regulação do metabolismo, a manutenção do estado de energia celular, a respiração, entre outros (COX et al., 2000).

Figura 1. Esquema das paredes das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas



A. Representação da parede das bactérias Gram-positivas, B. Representação da parede das bactérias Gram-negativas; LPS: lipopolissacarídeos; LTA: ácido lipotécico.

Fonte: (TRABULSI; ALTERTHUM 2008).

Óleos essenciais podem ser associados aos parabenos com intuito de aumentar o espectro de ação conservante e conseqüentemente elevam o tempo de prateleira do produto. Em um estudo anterior foi realizada a associação de metilparabeno com os óleos essenciais de *L. officinalis*, *M. alternifolia* e *Cinnamomum zeylanicum* Blume e observou-se que a eficácia foi maior in vitro do que em emulsão, porém observou-se a redução da carga microbiana constatada através do teste de eficácia do sistema conservante (HERMAN *et al.*, 2013).

Pelo fato de o Brasil apresentar uma vasta quantidade de plantas aromáticas, estas podem ser exploradas também como um dos componentes em uma mistura conservante, além de seu valor como fragrância. Dentre essas plantas, a pataqueira (*Conocarpus scoparioides* Cham. & Schldl.), cujo óleo essencial já é utilizado tradicionalmente em

banhos de cheiro nas regiões do Pará, tem despertado um grande interesse na indústria cosmética, sendo usado em linhas de perfumes tanto de água de banho e essência (NATURA CAMPUS, 2015). O óleo dessa espécie merece maior atenção na indústria cosmética por já ter reconhecido seu potencial antimicrobiano, além de ser uma espécie nativa.

2.3. CONOBEA SCOPARIOIDES CHAM. & SCHLTDL

A pataqueira ou “vassourinha do brejo”, *Conobea scoparioides*, cujo gênero recentemente deixou de pertencer à família *Scrophulariaceae* sendo incluída em *Plantaginaceae* (MORAIS, A.A *et al*, 1972), é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica (REFLORA, 2019). Conseqüentemente, podemos encontrá-la em áreas alagáveis na Colômbia, Peru, Equador, Paraguai, México, em alguns estados do sul do Brasil e estados brasileiros da região norte, nordeste, centro-oeste e sudeste, conforme representado na Figura 2 (VIANA *et al.*, 2011).

Figura 2. Imagem do Mapa de distribuição geográfica da espécie *C. scoparioides*



Fonte: Global Biodiversity Information Facility– GBIF, 2019

Na Figura 3 observamos a distribuição geográfica no Brasil, cujas ocorrências confirmadas encontram-se no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco), Centro-Oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná).

Figura 4. Imagem da flor característica de *Conobea scoparioides*

Fonte: Disponível em: www.plantsystematics.org/imgs/Plantaginaceae/Conobea_scoparioides acesso 14/05/2019

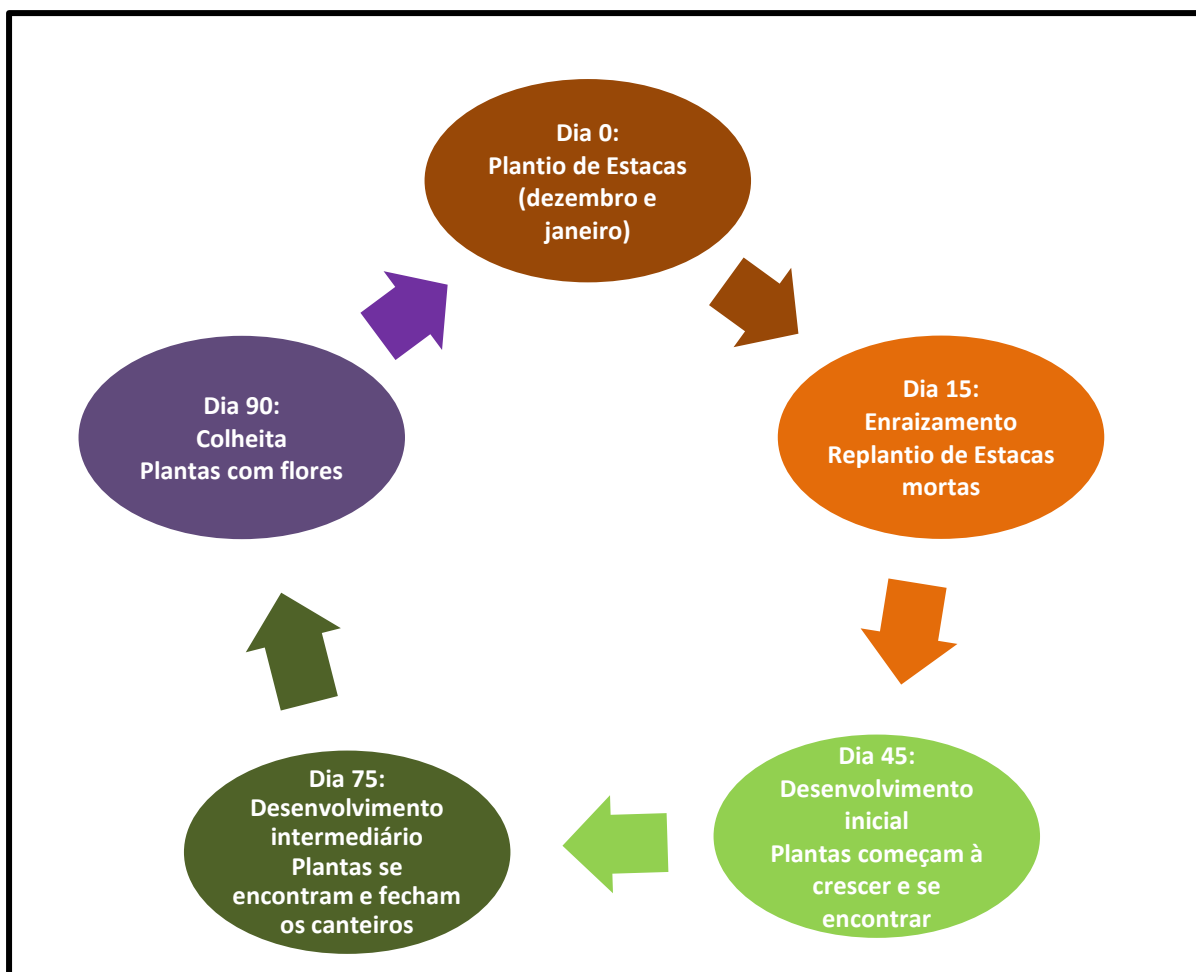
A pataqueira é uma erva muito utilizada como ingrediente para banho de cheiro, apresenta aplicação médica utilizada como por exemplo na cura do beribéri (MORAIS *et al.*, 1972) ainda é considerada uma alternativa terapêutica para quimioterapia antiprotozoária (COSTA *et al.*, 2014). Em comunidades do pacífico Colombiano a utilizam como purgativo, acaricida, antifúngico contra micose cutânea, antimalárico e leishmanicida (MINA *et al.*, 2011). Devido a presença de uma substância chamada cucurbitacina, obtida a partir do extrato de seus caules e folhas, foram relatados efeitos anti-inflamatório, pois esta substância tem uma ação antagônica às células de adesão. (MUSZA *et al.*, 1994).

Esta espécie é encontrada em terras úmidas de beiras de rios e igarapés, como pode ser visto na Figura 5 o local de ocorrência de uma população em uma localidade nos arredores de Manaus.

Figura 5. Representação do habitat natural de *Conobea scoparioides*

Fonte:(COSTA *et al.*; 2014)

A planta apresenta um ciclo de vida muito rápido, cresce, floresce e ligeiramente entra em senescência e morre (COSTA *et al.*, 2014). Sua propagação ocorre de forma natural através de sementes (sexuada) e por estacas (assexuada) de ramos de 10 a 15 cm de comprimento com 2 a 3 nós (ARAÚJO *et al.*, 2017). Para que ocorra o seu desenvolvimento são necessárias áreas semi-inundadas, solo arenoso e clima tropical úmido, com alta temperatura e umidade do ar elevada (COSTA *et al.*, 2014). Portanto o seu plantio deve ocorrer em meados de dezembro e janeiro para o aproveitamento das chuvas e a redução da necessidade de irrigação. A colheita deve ser realizada três meses após o plantio, podendo estender-se para 4 a 5 meses em áreas menos manejadas de acordo com o esquema representado na figura 6. Canteiros irrigados produzem em média 2,5 Kg da planta fresca por m², o que resulta em 0,16% do óleo essencial, a colheita deve ser feita no momento exato da floração para obtenção da maior quantidade possível na extração do óleo essencial (NATURA CAMPUS, 2015).

Figura 6. Ciclo do plantio de *Conobea scoparioides*

Fonte: Figura elaborada pela autora

A secagem poderá ser realizada através da utilização de um secador de leito misto fixo e a extração do óleo essencial de pataqueira se dá através das partes aéreas. O processo de extração laboratorial é normalmente realizado através da hidrodestilação utilizando sistema de vidro tipo Clevenger modificado e acoplado a um condensador conforme mostra a figura 6. Em escala industrial a hidrodestilação utiliza equipamentos como dorna, condensador e vaso separador, conforme figura 7 Para o seu armazenamento é necessário a utilização de frasco âmbar e livre de oxigênio (COSTA *et al.*, 2014).

Figura 7. Extração do óleo essencial através do sistema de vidro tipo Clevenger



Fonte: Foto da autora no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química USP

Figura 8. Extração do óleo essencial em escala industrial



Fonte: <https://www.oleos essenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais>, acesso 01/07/2019

Entre as características mais marcantes dessa espécie, destacam-se os constituintes timol, éter metílico do timol e α -felandreno, presentes no óleo essencial da espécie, que possuem odores agradáveis (ARAÚJO *et al.*, 2017), os quais são de interesse para o mercado brasileiro de perfumes e cosméticos (NATURA CAMPUS, 2015).

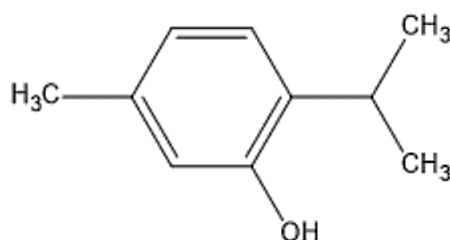
Segundo (MAIA et al., 2000) na análise de 3 amostras de óleo essencial extraído da pataqueira encontrada em 3 regiões diferentes do norte e nordeste do Brasil, foram identificados 32 compostos, dentre os principais, conforme descrito anteriormente, temos o timol, éter metílico do timol, *p*-cimeno e α -felandreno. O timol sendo o principal componente, apresenta propriedades antimicrobianas, principalmente quando associado a antimicrobianos sintéticos, como por exemplo a clorexidina, que em conjunto inibem a proliferação de bactérias da região bucal. A atividade antibacteriana do timol está relacionada com sua capacidade em diminuir a atividade enzimática e/ou interromper a integridade da membrana bacteriana alterando as reações proteicas tanto de bactérias Gram positivas e negativas (EVANS; MARTIN, 2000).

Conforme mencionado acima o óleo de pataqueira além de ter propriedades aromáticas também apresenta componentes com características antimicrobianas comprovadas, o que tem despertado interesse tanto das indústrias farmacêuticas como a de cosméticos (COSTA, 2010). Estas características corroboram no interesse em avaliar a sua atuação como um conservante natural, tanto isoladamente quanto em associação com o conservante sintético.

2.4. TIMOL

Isolado de várias plantas pertencentes a diferentes famílias, como Lamiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Plantaginaceae, Ranunculaceae e Apiaceae, o timol (2-isopropil-5-metilfenol), é considerado um dos principais fenóis monoterpênicos presentes em óleos essenciais, com inúmeras utilidades, tanto em indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (MARCHESE *et al.*, 2016).

Figura 9. Fórmula estrutural do timol



Fonte: Figura elaborada pela autora

O timol apresenta várias propriedades, sendo utilizado como antioxidante, anti-inflamatório, anestésico local, e principalmente como antisséptico, tanto bactericida e fungicida (MARCHESE *et al.*, 2016). Essas características antifúngicas e antibacterianas apresentam-se superiores às do fenol, sendo considerado um dos mais fortes antimicrobianos entre os monoterpenos (ARAÚJO *et al.*, 2007). Estudos de mais de duas décadas demonstraram que este composto fenólico apresenta um amplo espectro antibacteriano atuando tanto em micro-organismos Gram-negativos quanto positivos, como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (YAN WANG, 2018).

O seu mecanismo de ação frente aos micro-organismos, acredita-se estar relacionado à interação com a membrana citoplasmática, através da sua ligação com a porção polar da camada lipídica, devido a sua natureza hidrofóbica e fenólica (RADULOVIC *et al.*, 2013), o que pode levar a interrupção do fluxo de elétrons, transporte ativo, coagulação do conteúdo celular e o vazamento de material celular como ATP e ácidos nucleicos (MARCHESE *et al.*, 2016). Em decorrência da sua interação com a camada lipídica bacteriana tanto o timol quanto o seu isômero carvacrol facilitam a permeação de antibióticos pela célula bacteriana (MILADI *et al.*, 2016).

Estudos observaram a interferência do timol frente à produção de ergosterol nos fungos, como *C. albicans*. O ergosterol é um tipo de esteróide presente na membrana das células vegetais e fúngicas, portanto a intervenção do timol na sua produção promoverá um desequilíbrio na estrutura e superfície eletrostática da membrana celular, promovendo uma alteração de sua permeabilidade e aumento de fluidez. Dentre os outros mecanismos envolvidos na ação antifúngica do timol, podemos mencionar a interferência na respiração celular, inibição da germinação de esporos e conseqüentemente a proliferação fúngicas (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Como o timol é um dos componentes principais do óleo essencial de *C. _scoparioides*, e por apresentar características antimicrobianas comprovadas, desperta o interesse em avaliar o potencial da ação do óleo essencial como um conservante natural, tanto isoladamente quanto em associação com o conservante sintético.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Devido à crescente demanda da indústria cosmética em reduzir o uso de conservantes sintéticos em suas formulações, o presente estudo tem como objetivos investigar a atividade antimicrobiana óleo essencial de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltld e verificar a viabilidade de sua aplicação como um adjuvante farmacotécnico natural em formulações cosméticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Análise do perfil químico do óleo essencial de *C. scoparioides* por cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas.
- ✓ Determinar as concentrações inibitórias mínimas para o óleo essencial pelo teste de microdiluição frente a modelos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do componente principal do óleo essencial (timol) pelo teste de microdiluição frente a modelos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;
- ✓ Avaliar o efeito da associação do óleo essencial com os conservantes sintéticos metilparabeno e propilparabeno através de delineamento simplex-centroide;
- ✓ Avaliar a eficácia do sistema conservante obtido da associação do óleo essencial com os parabenos em uma formulação cosmética.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Conochea scoparioides* Cham. & Schltldl, utilizado foi uma amostra comercial obtida da International Flavors & Fragrances (IFF) (Santana do Parnaíba, São Paulo), a qual é utilizada na indústria de cosmética.

4.2. DETERMINAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

A análise da composição do óleo essencial da pataqueira foi realizada em duplicata, no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo, supervisionado pela Dra. Maria Cláudia Marx Young. Utilizou-se o CG-EM Agilent® (série 6890) acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), e energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm) e as condições cromatográficas foram as seguintes: Hélio como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min, temperatura do injetor e detector a 250°C. Temperatura inicial 40°C mantida por 1 minuto e aumento subsequente do aquecimento em 3°C/min até 240°C.

A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos espectros de massas e índices de retenção calculados (determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de n-alcanos) com os espectros de massa encontrados na literatura e na biblioteca instalada no equipamento (Adams, NIST, Willey).

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS.

Neste trabalho foram utilizadas 6 cepas, 4 bacterianas e 2 fúngicas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Burkholderia cepacia* (ATCC 25416) *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). As cepas foram obtidas da Fiocruz-Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

4.4. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

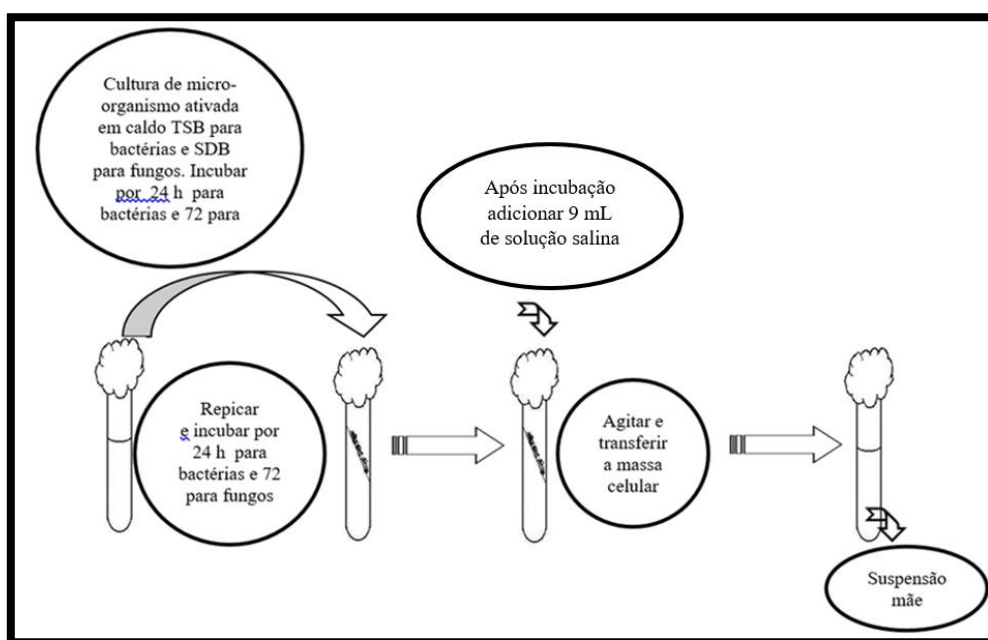
As culturas dos micro-organismos em estoque foram reativadas em caldo adequado, primeiramente e depois estriadas em tubo inclinado com o meio de cultura correspondente, caldo caseína soja (TSB) Difco® e ágar caseína soja (TSA) Difco® para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B.cepacia* e caldo Sabouraud dextrose (SDB) Difco® e ágar Sabouraud dextrose (SDA) Difco® para *A. brasiliensis* e *C. albicans*. Após a incubação do ágar inclinado cultivado, é feita uma lavagem da cultura com 9mL de solução salina 0,9%, onde obtém-se uma massa celular que chamamos de suspensão mãe, conforme esquematizado na figura 10.

A padronização da densidade do inóculo foi feita através da comparação da turbidez da solução do micro-organismo com uma solução de sulfato de bário padronizada para 0,5 na escala de McFarland (NCCLS/CLSI, 2003). A densidade óptica do tubo do inóculo foi determinada em espectrofotômetro (Micronal®) 630 nm. Sendo este valor estimado em $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

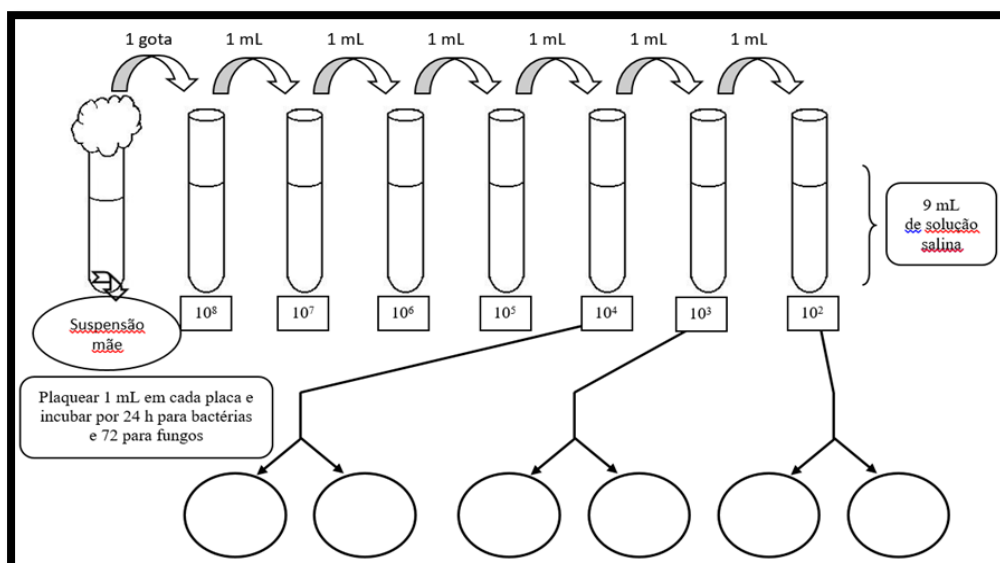
Para *A. brasiliensis*, o inóculo foi preparado através da semeadura em tubos inclinados e após seu crescimento, foi usada a técnica da lavagem com solução salina 0,85% de 3 tubos inclinados. O produto da extração (3 extrações por tubo) foi transferido para um frasco estéril. A densidade do inóculo foi padronizada através da verificação da turbidez em comparação com 0,5 na escala de McFarland o que equivale à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Para confirmação da padronização dos micro-organismos, foram realizadas diluições decimais do inóculo de 10^8 a 10^2 . Após as diluições decimais, as que se encontravam entre 10^4 a 10^2 foram semeadas em duplicata através da técnica de *pour plate* utilizando o ágar adequado para cada micro-organismo de acordo com a figura 10. Após a incubação (24 h- para bactérias e 72 para fungos), foram realizadas as leituras das placas. Sendo assim selecionadas as placas que se apresentavam na diluição 10^3 , a qual será utilizada no ensaio da concentração mínima inibitória.

Figura 10. Esquema – Padronização da suspensão microbiana Preparo da suspensão mãe



Diluições e semeadura:



4.5. CONTROLE POSITIVO

Soluções de 1 mg/mL foram preparadas com os antibióticos ciprofloxacino, amicacina, e/ou cloranfenicol para bactérias, e nistatina para fungos. Para cada controle positivo tomou-se 10 µL dessa solução para que a concentração final fosse de 0,05 mg/mL em cada réplica.

4.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

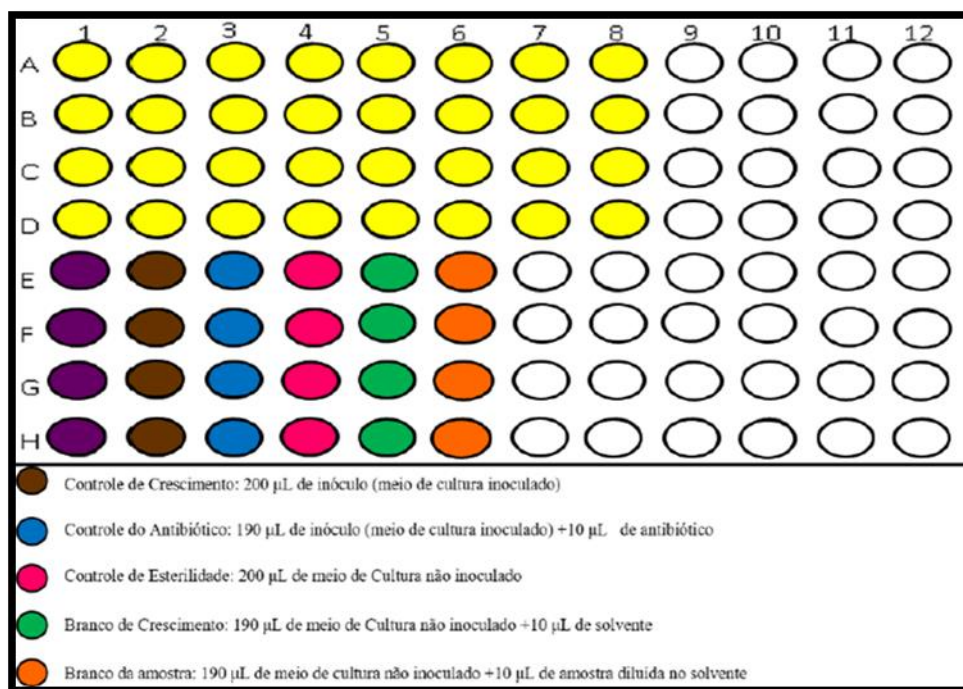
Para o ensaio da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 µL, já estabelecido no grupo (MORENO *et al.*, 2009).

O preparo das soluções do óleo essencial e do timol foram realizadas utilizando balões de 5 ml, partindo-se da pesagem de 1g em ambos os casos. O solvente utilizado foi uma solução de metanol (Sigma Aldrich®): dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth®) (1:1, v/v), cuja concentração inicial no frasco foi de 2000µg/mL. Desta concentração inicial, ou seja, desta primeira triagem foram realizadas 5 diluições e submetidas ao teste da mínima concentração inibitória. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo em dias diferentes e com 4 repetições por ponto.

Foram utilizadas para os controles: 200 µL de TSB ou SDB (controle do meio de cultura); 200 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste (controle de crescimento), 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste e 10 µL de solvente (DMSO: MeOH 50:50 v/v) (controle do solvente), e 10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo em estudo (controle positivo ou de atividade antimicrobiana). Para correção de alguma absorbância das amostras, foram preparados controles com 10 µL das mesmas e 190 µL de meio de cultura não inoculado. Após a incubação de 24 horas a 35 °C, para bactérias, ou 48 horas a 25 °C, para leveduras, foram realizadas as leituras a 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®). Para *A. brasiliensis* o ensaio foi semelhante, no

entanto com incubação por 72 horas a 25 °C com leitura visual dos resultados, considerando presença ou ausência de crescimento.

Figura 11. Esquema de plaqueamento utilizado no CIM



Fonte: Produção da própria autora

Com os valores de absorbância das amostras e dos controles é possível calcular a porcentagem de inibição de crescimento microbiano. As equações utilizadas encontram-se a seguir:

$$\text{Valor 1} = (\text{Abs Controle de solvente}) - (\text{Abs Branco de crescimento})$$

$$\text{Valor 2} = (\text{Abs Amostra}) - (\text{Abs Branco da amostra})$$

$$\text{Valor 3} = \text{Crescimento microbiano (\%)} \rightarrow \text{Valor 2} * 100 / \text{Valor 1}$$

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \text{Valor 3}$$

Após a realização da primeira triagem com todos os micro-organismos, caso as amostras do óleo essencial e timol apresentaram inibição de crescimento de 100% foram realizadas novas diluições a fim de encontrar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A curva de concentração de crescimento foi obtida para cada repetição e a equação da curva foi usada para calcular a CIM através do software estatístico GraphPad Prism®.

4.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL COM PARABENOS (SIMPLEX-CENTROIDE)

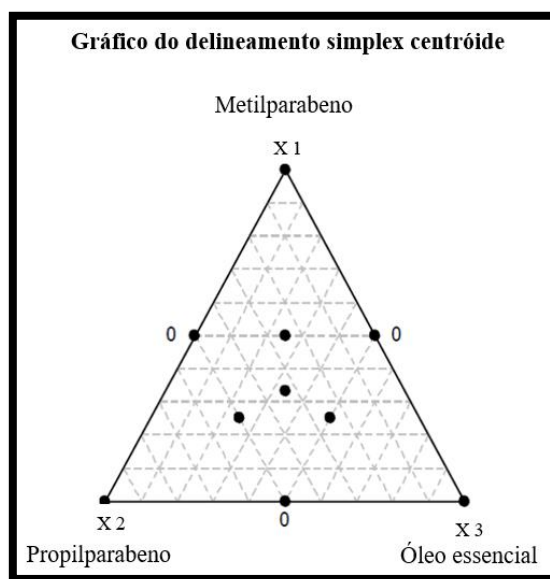
Para este experimento foi utilizado o planejamento experimental em rede simplex centroide com pontos adicionais de uma mistura de três componentes, composto por dez ensaios diferentes para determinação dos valores de todos os seus coeficientes (NETO *et al.*, 2010). Os resultados foram apresentados na forma de gráficos de superfície resposta. As variáveis selecionadas neste estudo foram as CIM's do metilparabeno e do propilparabeno pré determinados no estudo de (ISSA, 2015), exceto para *B.cepacia* cuja CIM's foram determinadas neste estudo. Os dados utilizados estão descritos na tabela 1 abaixo juntamente com a CIM do óleo essencial de *Conobea scoparioides* definida neste estudo. Para isso foram definidos dez pontos experimentais de composições (Tabela 2). As variáveis independentes selecionadas neste estudo foram a CIM do metilparabeno (x1), a CIM do propilparabeno (x2), e o óleo essencial de *Conobea scoparioides* nas concentrações dos CIM pré-determinadas para cada micro-organismo (x3). O solvente DMSO: MeOH (1:1) foi utilizado como controle.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima do metilparabeno e propilparabeno

Micro-organismo	Metilparabeno (µg/mL)	Propilparabeno (µg/mL)
	CIM	CIM
<i>S. aureus</i>	2000	500
<i>P. aeruginosa</i>	1000	500
<i>E. coli</i>	1000	350
<i>B.cepacia</i>	1400	500
<i>C. albicans</i>	550	125
<i>A.brasilensis</i>	700	200

Legenda: µg/mL microgramas por mililitro, CIM: concentração inibitória mínima

Figura 12. Representação Gráfica do delineamento experimental em rede simplex centroide com pontos adicionais.



Fonte: (ISSA, 2015)

Na figura 12 temos a demonstração de um sistema ternário que consistem em pontos representados em um triângulo equilátero de três fatores independentes e todas as possíveis misturas dos três componentes, chamadas misturas ternárias (LARSON, R.; FARBER, B 2010).

As dez composições foram preparadas, de acordo com o delineamento em rede simplex centroide com pontos adicionais para misturas de três componentes. A Tabela 2 apresenta as composições estudadas.

Tabela 2. Composições obtidas através do delineamento experimental de misturas

Composições	Metilparabeno	Propilparabeno	Óleo Essencial
Proporções dos componentes nas composições (%)			
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33	33	33
8	50	25	25
9	25	50	25
10	25	25	50

Legenda: % porcentagem_da CIM

Para o experimento da verificação da atividade antimicrobiana das composições, foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 4.6.

Após a incubação de 24 horas a 37 °C para as bactérias e de 48 horas a 25 °C para leveduras foi medida absorção e, 630 nm em um leitor de microplacas (LGC Biotecnologia).

Para *A. brasiliensis* o ensaio foi semelhante, no entanto com incubação por 72 horas a 25 °C e não foi realizada a leitura no leitor de microplaca. A determinação foi visual, considerando presença ou ausência de crescimento.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada micro-organismo em teste, e os resultados obtidos foram inseridos na rotina de planejamento do Matlab®, onde através de análise de regressão de misturas, foram obtidos modelos matemáticos que representaram a interferência de cada componente nos parâmetros analisados.

Através dos dados obtidos no estudo do delineamento experimental para avaliar o efeito da associação do óleo essencial com parabeno foram selecionadas as concentrações dos componentes utilizadas como conservante na formulação cosmética.

4.8. PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA

A formulação selecionada para executar o teste de eficácia do sistema conservante foi uma emulsão não iônica (Polowax[®]), por apresentar maior compatibilidade do óleo essencial com os componentes da formulação, as proporções e os ingredientes empregados estão descritos no quadro 1. Para o ensaio, foram preparados quatro lotes de 200ml cada.

Quadro 1. Composição empregada para a formulação

Fase	Composição	Função	Proporção (%)*
A Lipídica	Polowax	Base auto emulsionante não iônica	3
	Óleo Mineral	Emoliente, umectante e solvente	2
B Hidrofílica	Propilenoglicol	Emoliente e umectante	5
	Água destilada	Veículo	q.s.p

*m/m

Em um recipiente foram misturados os componentes da fase B e aquecidos até 80°C com agitação constante com bastão de vidro. Após, a fase B foi deixada resfriar até 65° C. Enquanto a Fase B resfriava, os componentes da fase A foram misturados e aquecidos até 80°C. Ao atingir essa temperatura, a fase B foi vertida na fase A, com homogeneização de forma constante até atingir a temperatura ambiente. Os conservantes foram adicionados diretamente à emulsão após o seu resfriamento.

O motivo de preparar quatro lotes iguais dessa formulação foi devido ao objetivo de testar o sistema conservante com a mistura óleo essencial/parabenos em quatro concentrações diferentes. Essas concentrações foram pré-determinadas através dos resultados obtidos com a análise em rede simplex usando os dados conjuntos dos gráficos de resposta de superfície descritos no item 5.3.

4.9. TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE

O teste de eficácia do sistema conservante, tem como propósito a verificação da eficácia do sistema conservante eleito baseado nos resultados obtidos no item 4.7. A sua realização foi feita de acordo com a (USP, 2015), o ensaio tem como fundamento a contaminação proposital do produto com micro-organismos pré-definidos e a avaliação da carga microbiana ocorre em intervalos de tempos definidos.

4.9.1. CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS E VERIFICAÇÃO DA INATIVAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE NA FORMULAÇÃO

Para realização do teste de eficácia do sistema conservante das quatro formulações primeiramente é necessário realizar a contagem do número total de micro-organismos mesófilos para assegurar a qualidade sanitária, juntamente com a verificação da inativação do sistema conservante. O ensaio foi baseado na metodologia descrita na Farmacopéia Americana (USP, 2015).

O objetivo da verificação da inativação do sistema conservante, além de assegurar que os micro-organismos desafiados não serão inibidos pelos conservantes, mas também por componentes da formulação ou por algum componente dos meios de cultura utilizados, o que acarretaria a um resultado falso negativo.

A verificação da inativação de qualquer interferência é realizada através da inoculação de uma quantidade menor ou igual a 100 UFC de cada micro-organismo que será desafiado, conforme descrito a seguir:

Os inóculos foram preparados conforme descrito no item 4.4 a fim de encontrar a padronização desejada de até 100_UFC/mL das mesmas cepas bacterianas e fúngicas que foram utilizadas na determinação da CIM.

Pesou-se 10 g de cada formulação manipulada em um frasco com 90mL de um caldo estéril contendo os inativantes dos parabenos, como o Polissorbato 80 (5g/L) e

lecitina de soja (7g/L), essa diluição é a 10^{-1} . Dessa diluição foram transferidos 10mL para um outro frasco contendo 90mL do mesmo caldo estéril com os inativantes utilizados na primeira diluição, obtendo-se a diluição 10^{-2} .

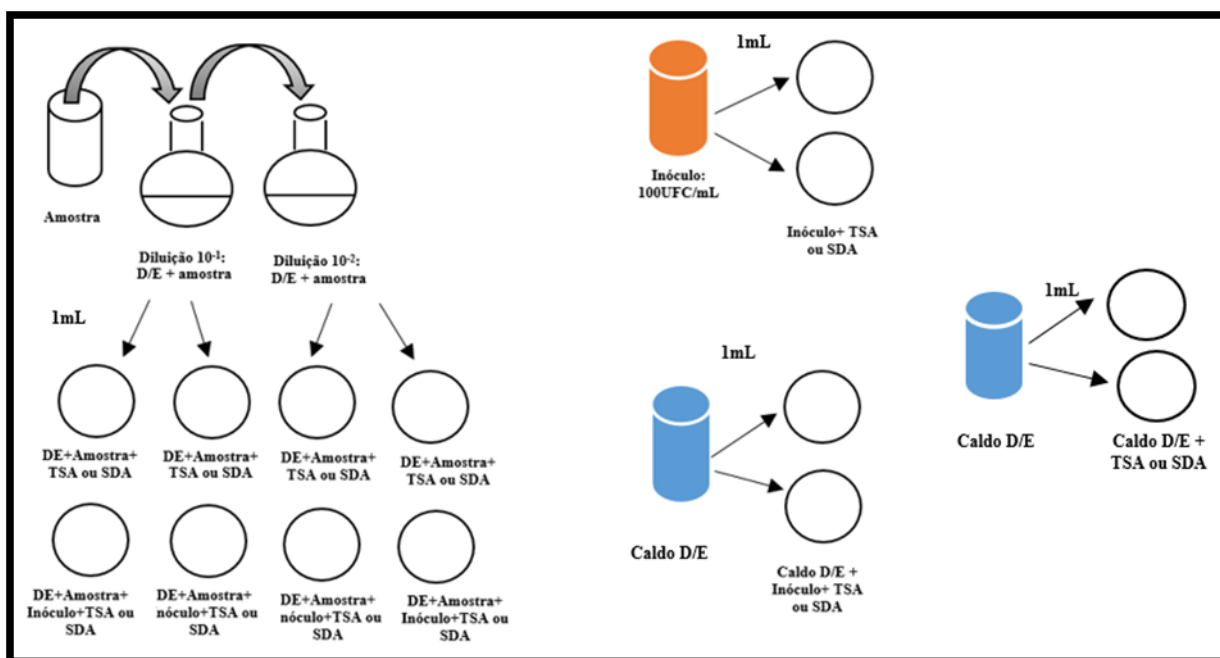
Este caldo pode ser caseína soja acrescido desses neutralizantes ou um caldo já pronto como o caldo neutralizante Dey-Engley® (D/E). Em nosso ensaio foi utilizado o caldo Dey-Engley (Hexis®).

Para o teste de limite microbiano, foram adicionados em cada placa de Petri estéril 1mL da diluição 10^{-1} mais o ágar TSA para bactérias ou SDA para bolores e leveduras.

Quanto a verificação da inativação do sistema conservante, foram adicionados em cada placa 1ml da diluição 10^{-1} mais 1 mL do inóculo e ágar TSA ou SDA. O mesmo procedimento foi realizado para diluição 10^{-2} .

Paralelamente como controle foram feitas duas placas com o caldo D/E, inóculo e o ágar TSA ou SDA, duas placas com inóculo e o ágar TSA ou SDA e duas placas somente com o caldo D/E e o ágar TSA ou SDA. Na figura13 abaixo, encontra-se o esquema do -procedimento realizado.

Figura 13. Esquema para contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação



Fonte: Produção da própria autora.

As placas foram incubadas a 30-35°C por 24 a 48 horas para bactérias e 20-25°C por 72 horas para bolores e leveduras. Foram realizadas as leituras das placas e o resultado final foi obtido através da média das duplicatas.

Em relação à leitura dos controles, observou-se se houve inibição microbiana quando comparado o controle 2 (caldo D/E+ inóculo+ ágar) em relação ao controle 1 (inóculo+ ágar). Caso não haja inibição no controle 2, este será utilizado como a referência para a taxa de recuperação.

O cálculo da taxa de recuperação foi realizado através da recuperação de 50% de UFC/mL dos ensaios 10^{-1} e 10^{-2} em relação ao número de UFC/mL do controle 2.

Após a contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação foi realizada a padronização dos micro-organismos para o teste de eficácia do sistema conservante.

4.9.2 PREPARAÇÃO DAS CULTURAS DE MICRO-ORGANISMOS

Preparar para o teste, suspensão dos micro-organismos requeridos, a partir de culturas recentes de acordo com o item 4.4.

4.9.3 EXECUÇÃO DO ENSAIO

Para a execução do ensaio foram pesados 20g das formulações em frascos estéreis para cada micro-organismo a ser testado, cujo inóculo foi de 1% do volume da amostra e a sua concentração esteve entre 10^6 no produto.

No primeiro dia de teste (tempo zero), foi inoculado separadamente cada micro-organismo em 20 g produto acondicionado em frasco estéril, homogeneizado e foi realizada somente a verificação da viabilidade das cepas utilizadas, através de sua inoculação em solução fisiológica.

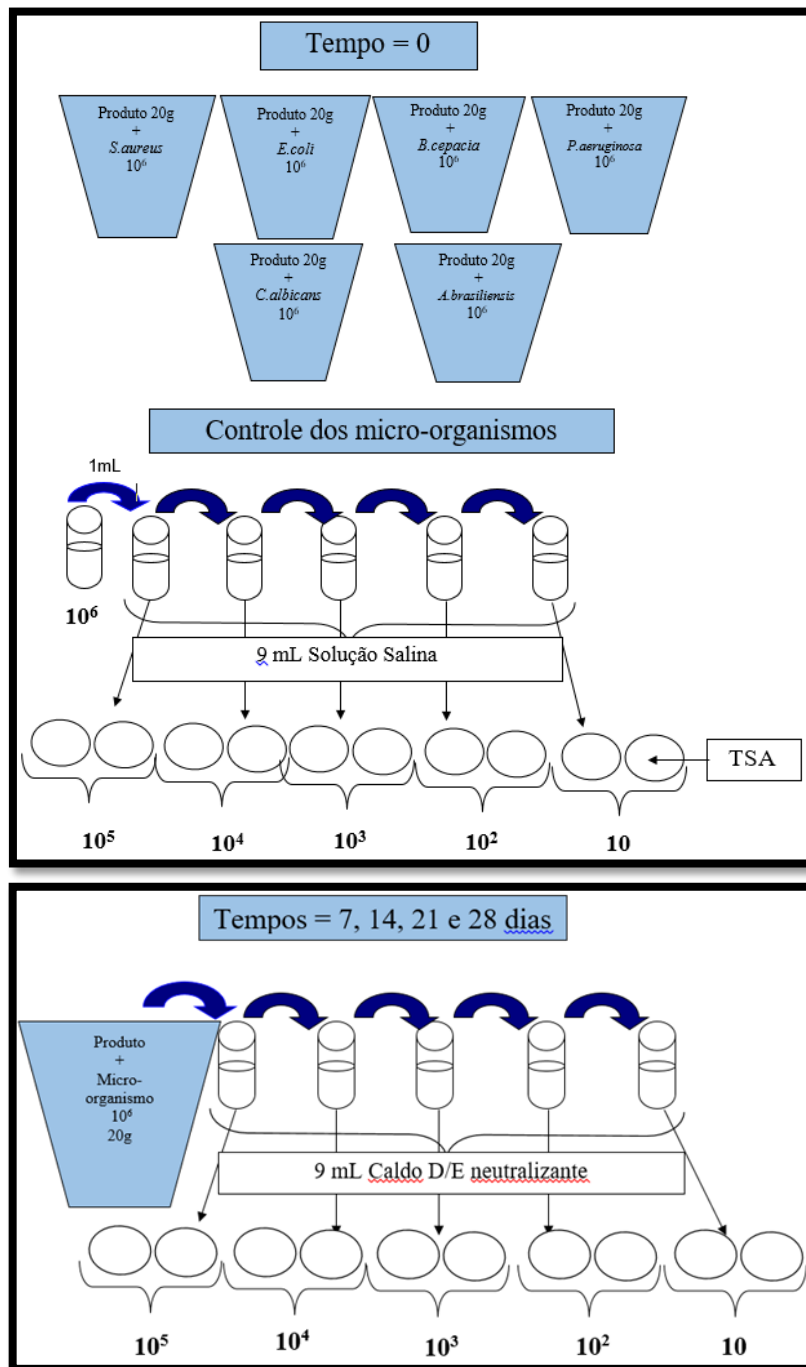
Após 7 dias, foi inoculado 1mL das formulações, em tubo de ensaio contendo 9 mL de diluentes apropriados acrescidos de neutralizantes. Para este ensaio foi utilizado o caldo D/E (Hexis®).

Após a inoculação do produto em 9mL de caldo D/E, foram efetuadas diluições decimais seriadas até 10^5 em tubos de ensaio contendo diluentes apropriados acrescidos de inativantes, e plaqueados em duplicata 1ml de cada diluição. Foi adicionado de 15 a 20ml o meio de cultura TSA (Difco®) para bactérias e SDA (Difco®) para fungos.

As placas foram incubadas invertidas em $35^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h, contendo o meio de cultura TSA para as bactérias. No caso do fungo e o bolor, as placas invertidas com meio SDA foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 72 h.

O mesmo procedimento foi repetido em intervalos de 7 dias para os tempos de 14, 21 e 28 dias. A figura 14 representa o esquema do Teste de Eficácia do Sistema Conservante.

Figura 14: Esquema – Teste de Eficácia do Sistema Conservante



Fonte: Produção da própria autora

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO OE POR CG-MS

As análises por CG-MS indicaram que o óleo essencial continha pelo menos 10 compostos dos quais 9 foram identificados. A tabela 3 relaciona os compostos identificados tanto no primeiro ensaio quanto no segundo, os índices de retenção calculados e os encontrados na literatura, bem como a porcentagem de cada um deles no óleo essencial.

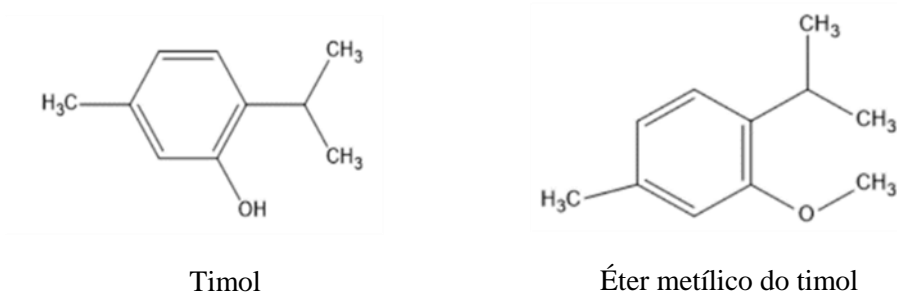
Tabela 3. Composição química do óleo essencial das folhas de *Conobea scoparioides*.

Composto	M IR 1e2 _a	IR (lit.) _b	% Ensaio 1	% Ensaio 2
3-octanona	980	979	1,9	1,6
α -felandreno	995	1002	15,9	15,2
<i>p</i> -cimeno	1014	1020	4,5	6,4
3-isopropenil-5,5-dimetil- ciclopenteno	1039	10280	0,5	0,7
N.I.:93(100%), 91(54%), 77(38%), 136(36%), 79 (36%)	1060	-	0,9	0,5
álcool 2,4,6-trimetil benzílico*	1021	1282	-	0,4
linalol	1106	1095	0,7	-
éter metílico do timol	1224	1232	39,2	41
timol	1302	1289	33,8	33,6
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1466	1432	1,3	1,1
octacosano	2673	2800	1,3	-
Identificados	-	-	99,1	100
Não Identificados	-	-	0,9	-

Legenda: a. média do tempo de retenção-coluna DB-5 amostras 1 e 2;
b. Índice de retenção- coluna DB- 5; *artefato; N.I.= não identificado.

Nos dois ensaios, os monoterpenos foram responsáveis pela maior parte da composição química do óleo essencial comercial da pataqueira, sendo representados pelos compostos majoritários éter metílico do timol, timol e α -felandreno respectivamente, cujas estruturas podem ser vistas na figura 15.

Figura 15. Estrutura dos compostos majoritários timol e éter metílico do timol identificados no óleo essencial de *Conobea scoparioides*.



Fonte: Produção da própria autora

Na literatura há relatos de uma composição distinta para o óleo essencial de *C. scoparioides* daquela encontrada no presente estudo (MORAIS *et al.*, 1972) encontraram como constituintes principais o *p*-cimeno (27,8%), terpineno (22,4%) e timol (20,6%). A análise de uma amostra de Santa Rosa Saija (Colômbia) mostrou que o composto principal, tanto em folhas frescas ou secas, é o α -felandreno, seguido pelo timol (GONZÁLEZ; HURTADO., 2011). As diferenças na composição do óleo essencial entre plantas da mesma espécie podem estar relacionadas com a sazonalidade da colheita, tipo de solo, clima da região, diferença populacional, diferenças genéticas e umidade relativa do ar (MILLEZI *et al.*, 2014). Na literatura, também há relatos para uma composição do óleo essencial dessa espécie semelhante àquelas reportadas no atual estudo. No estudo de (COSTA, 2010) componentes principais e suas concentrações relativas foram muito próximas as descritas aqui: éter metílico do timol e timol com 40,0 e 38,5% respectivamente. Observa-se que apesar das diferenças de composição química do óleo essencial de *C. scoparioides* encontradas na literatura, o timol sempre está entre os componentes majoritários. Assim, como vários estudos demonstraram a ampla atividade antimicrobiana do timol (WANG; YAM, 2018), podemos supor que esse óleo essencial poderá possuir um potencial antimicrobiano também.

5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. scoparioides* foi avaliada frente a seis micro-organismos distintos, três bactérias Gram-negativas, uma Gram-positiva e dois fungos, um filamentosos e outro leveduriforme.

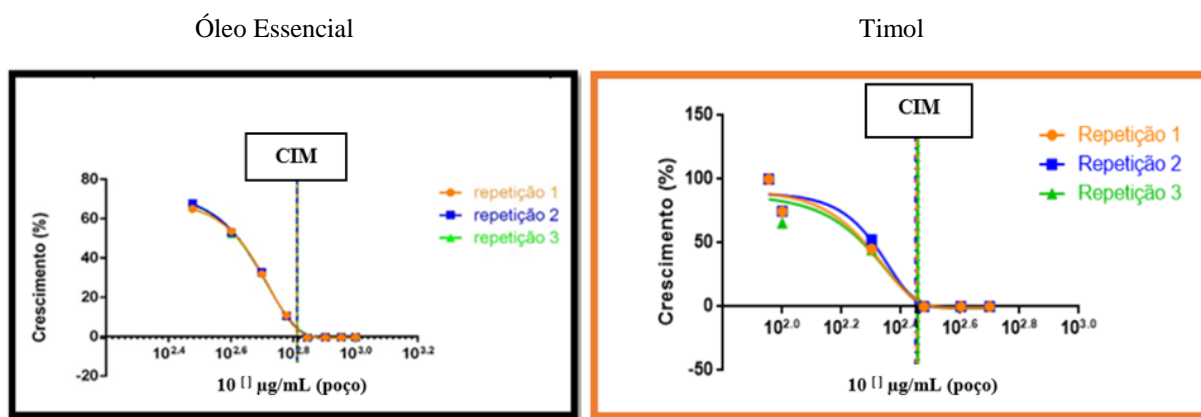
Usando esses micro-organismos, foi feita uma triagem do potencial antimicrobiano do óleo essencial em estudo. Após a triagem, as amostras foram diluídas em série e os resultados foram estatisticamente tratados para a obtenção de suas respectivas concentrações inibitórias mínimas (CIM), conforme representado nas Figuras 16-19. A média, o desvio padrão (DP) e o Intervalo de confiança de 95% (CI₉₅) foram calculados para cada amostra, os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima obtida para o óleo essencial de *Conobea.scoparioides* e timol frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* (concentração do inóculo 2×10^3 UFC/mL).

Micro-organismos	<i>C. scoparioides</i> óleo essencial (µg/ mL)			Timol (µg/ mL)		
	CIM	DP	CI ₉₅	CIM	DP	CI ₉₅
<i>Staphylococcus aureus</i>	650,70	1,72	0,04	284,90	3,40	3,80
<i>Escherichia coli</i>	721,53	2,48	0,06	271,20	9,90	11,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1748,00	133,95	5,35	> 2.000	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	833,03	1,18	0,10	1.077,70	19,80	22,40
<i>Candida albicans</i>	521,43	14,40	0,43	172,61	2,70	3,10

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima, DP: desvio padrão, CI₉₅: intervalo de confiança.

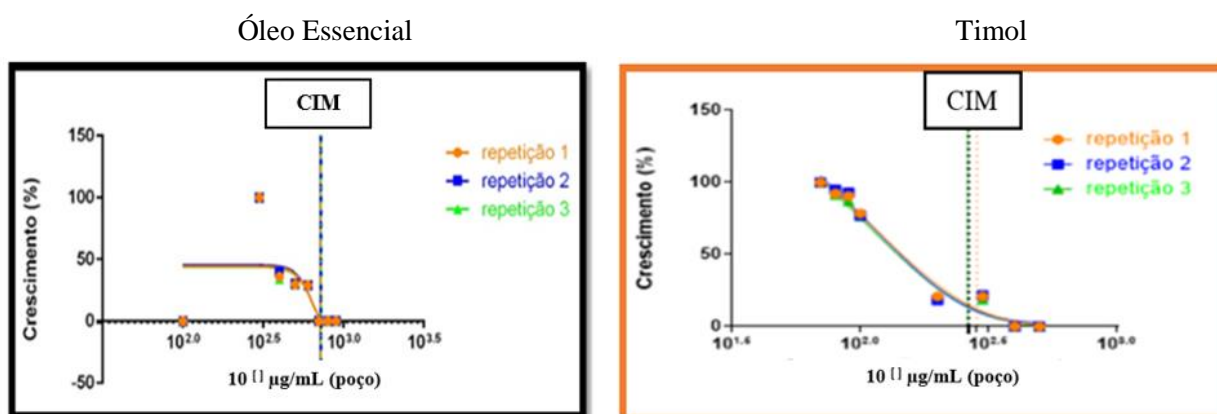
Figura 16. Curva de inibição do crescimento de *S. aureus* em relação ao óleo essencial de *Conochea scoparioides* e ao timol



Legenda: CIM: concentração inibitória mínima

Pelos resultados apresentados no cálculo da concentração inibitória mínima (Fig.16) observa-se que, para ocorrer o início da inibição do desenvolvimento de *S. aureus*, foi necessária uma concentração maior do óleo essencial (650,70µg/mL) do que do timol, quando analisado isoladamente (284,90 µg/mL). Contudo, nas duas situações apresentadas, observou-se que houve a inibição total do micro-organismo. Este efeito foi devido provavelmente à natureza hidrofóbica tanto do timol quanto do óleo essencial a qual interfere na integridade da membrana desse micro-organismo. Um outro fator pode ser devido ao grupo hidroxila presente no timol que provoca o rompimento dos gradientes iônicos da célula bacteriana (SIM *et al.*, 2019).

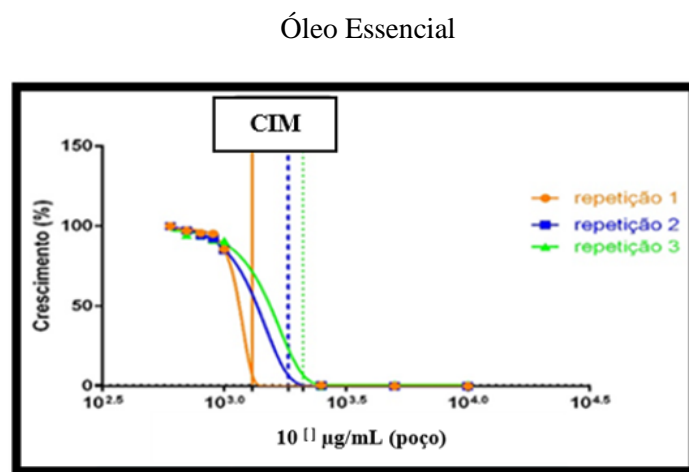
Figura 17. Curva de inibição do crescimento de *E. coli* em relação ao óleo essencial de *C. scoparioides* e ao timol



Legenda: CIM: concentração inibitória mínima

Na figura 17 observa-se que o cálculo da concentração inibitória mínima para o micro-organismo *E. coli* referente ao óleo essencial foi de 721,53 $\mu\text{g/mL}$ e do timol obteve-se à 271,20 $\mu\text{g/mL}$. Ao comparar os gráficos obtidos para o óleo essencial e do timol, observamos um comportamento diferente do micro-organismo. No óleo essencial *E. coli* manteve-se estável até a concentração de aproximadamente 600 $\mu\text{g/mL}$ e depois apresentou um decaimento acentuado. Quanto ao timol, nota-se um decaimento quase linear com a concentração. Em ambas as situações foi observada uma ação inibitória completa.

Figura 18. Curva de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* em relação ao óleo essencial de *C. scoparioides*

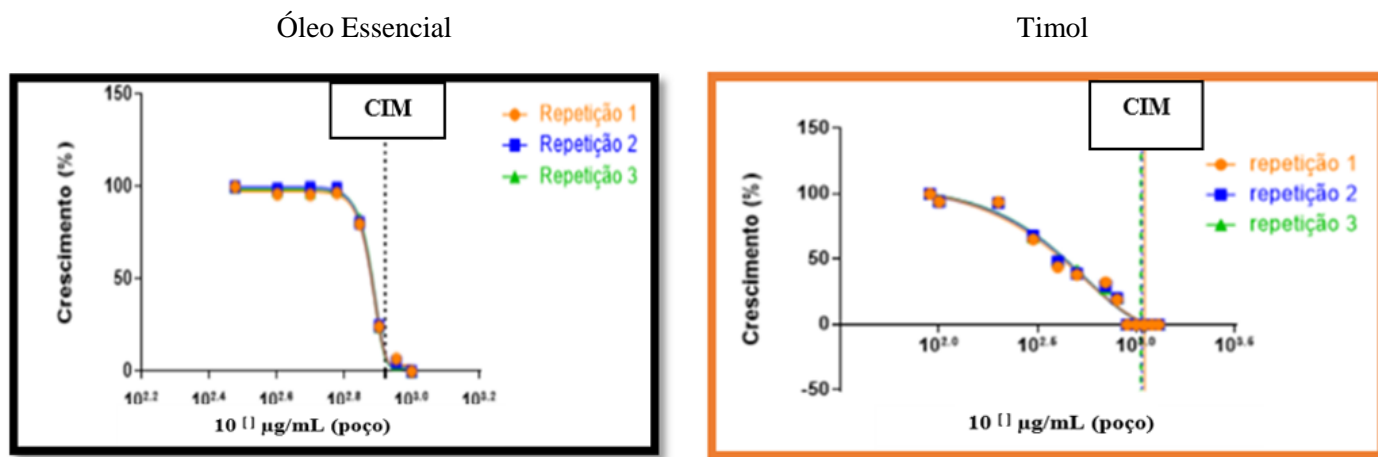


Legenda: CIM: concentração inibitória mínima

Para *P. aeruginosa* frente ao óleo essencial e timol, a avaliação estatística foi possível ser realizada somente para o óleo essencial cujo valor da CIM encontrada foi de 1748,00 $\mu\text{g/mL}$ conforme resultados apresentados na figura 18. Para o timol houve crescimento do micro-organismo acima de 2000 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, para o objetivo do estudo que é a determinação da concentração mínima inibitória do principal componente do óleo essencial de *C. scoparioides*, valores de CIM encontrados acima de 2000 $\mu\text{g/mL}$ não apresentariam interesse para o seu uso como conservante em associações, pois provavelmente o valor com os conservantes sintéticos ficariam acima do limite especificado pela legislação vigente (ANVISA, 2012). A concentração inibitória mínima muito elevada obtida para *P. aeruginosa* ocorreu, muito provavelmente devido a sua capacidade de formação de biofilme, o que as tornam mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que quando encontradas em forma planctônica

(DRENKARD, 2003). Um outro fator que leva a uma maior resistência de *P. aeruginosa* pode estar relacionado a membrana externa do gênero, por ser predominantemente impermeável aos compostos fenólicos do óleo essencial, ou devido a existência de mecanismos de bombas de efluxo e inibição junto a porina, que protegem a bactéria contra a ação de óleos essenciais (HOSSAIN *et al.*, 2017).

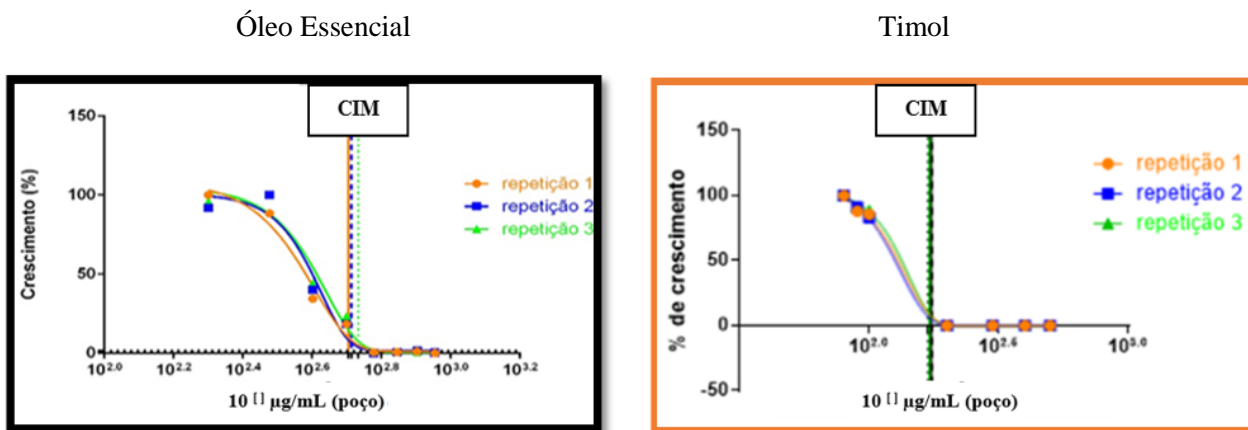
Figura 18. Curva de inibição do crescimento de *B. cepacia* em relação ao óleo essencial de *C. scoparioides*



Legenda: CIM: concentração inibitória mínima

Na análise da curva de letalidade da *B. cepacia* frente ao óleo essencial, conforme representado na figura 18, a CIM foi de 833,03 µg/mL e frente ao timol foi de 1.077,70 µg/mL, porém o micro-organismo apresentou uma inibição acentuada a partir da concentração 700 µg/mL para o óleo essencial e uma inibição gradual perante o timol, comportamento semelhante ao observado para *E. coli*

Figura 19. Curva de inibição do crescimento *C. albicans* em relação ao óleo essencial de *C. scoparioides*



Legenda: CIM: concentração inibitória mínima

Para os resultados de *C. albicans* a CIM frente ao óleo essencial foi de 521,43 μ g/mL e ao timol foi de 172,61 μ g/mL. Observou-se que o comportamento da levedura foi similar para o óleo essencial e o timol.

Em relação a *A. brasiliensis*, a análise da inibição do crescimento foi qualitativa (visual) para o óleo essencial e o timol. Esse método foi empregado devido ao micro-organismo não apresentar crescimento homogêneo, dificultando a leitura da absorbância. O resultado apresentado para o óleo essencial foi a ausência de crescimento a partir da concentração de 300 μ g/mL. Para o timol a ausência de crescimento ocorreu a partir da concentração de 400 μ g/mL.

Tanto o óleo essencial como o timol apresentaram uma atividade antifúngica para os dois fungos testados, *C. albicans* e *A. brasiliensis*. Os mecanismos para a ação antifúngica podem ser devidos a danos diretos na membrana, através da mudança de permeabilidade. Outro mecanismo possível está relacionado com o metabolismo, na redução de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), em conjunto com uma via de sinalização da proteína de ativação mitogênica (MAP). Adicionalmente, pode ainda ocorrer a inibição da atividade da síntese de ergosterol, malato desidrogenase, ATPase mitocondrial e succinato desidrogenase o que leva a morte do fungo em contato com o óleo essencial (CHOUHAN *et al.*, 2017).

Ao comparar os resultados da CIM do timol encontrados nesse estudo com os resultados encontrados na literatura observam-se diferenças entre as concentrações determinadas, bem como os resultados obtidos da CIM do óleo essencial da pataqueira quando comparado com um estudo anterior (MACHADO; MORENO, 2020). Uma das possíveis causas dessas diferenças está na escolha da técnica utilizada. Em muitos estudos verifica-se a técnica de difusão em ágar através da utilização de discos ou pela adição do óleo essencial em cavidades feitas no ágar previamente contaminado com a cepa microbiana a ser testada. Essas duas técnicas podem apresentar algumas limitações e imprecisões pois, como são procedimentos descritos em compêndios oficiais como o NCCLS, geralmente as substâncias testadas apresentam características hidrofílicas o que, para os óleos essenciais, já seria uma barreira na utilização das técnicas devido a sua hidrofobicidade (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Outros fatores também devem ser levados em conta como a composição do meio de cultura, o excesso de inóculo na placa e principalmente o erro na leitura dos halos de inibição, uma vez que esta é feita

visualmente. Na técnica feita com caldos ao invés de ágar como meios de cultura, podem-se utilizar a macrodiluição (tubos) e a microdiluição (microplacas), que foi a técnica utilizada no presente estudo. Dentre as vantagens da técnica por microdiluição podemos citar: uma maior sensibilidade frente aos outros métodos; é utilizada uma quantidade muito menor de amostras comparada com a macrodiluição. Na segunda técnica, o emprego de microplacas favorece uma maior quantidade de repetições de cada diluição testada o que contribui para a repetibilidade do ensaio, além da leitura ser feita em um espectrofotômetro o que descarta o erro de uma leitura visual. Vale a pena destacar que para a validação do teste de concentração inibitória mínima através da técnica de microdiluição é necessário o uso de controles como o meio de cultura sem e com o inóculo, o meio de cultura com o solvente usado para diluir as amostras bem como com as amostras (MORENO *et al.*, 2013).

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL COM PARABENOS (SIMPLEX-CENTROIDE)

Para avaliação das associações foram utilizados os valores da CIM do metilparabeno, propilparabeno e do óleo essencial e foram realizadas dez misturas demonstradas na tabela 5. Com esses dados, pode-se observar que houve inibição do crescimento microbiano de 95 a 100% para bactérias, tanto Gram positivas quanto Gram negativas. Para a levedura *C. albicans*, observou-se uma inibição de aproximadamente 78%.

Através da análise individual dos micro-organismos em função das três variáveis, observou-se que várias das associações foram eficazes para inibição microbiana, exceto para *E. coli*, que a composição três mostrou-se eficiente, na qual continha somente o componente X₃, ou seja, o óleo essencial.

Para *A. brasiliensis* devido à característica de seu crescimento desuniforme, não foi possível realizar o ensaio quantitativo, portanto foi feito o ensaio qualitativo (visual) com as 10 composições pré-estabelecidas e observou-se a inibição de 100% do micro-organismo para todas as associações testadas.

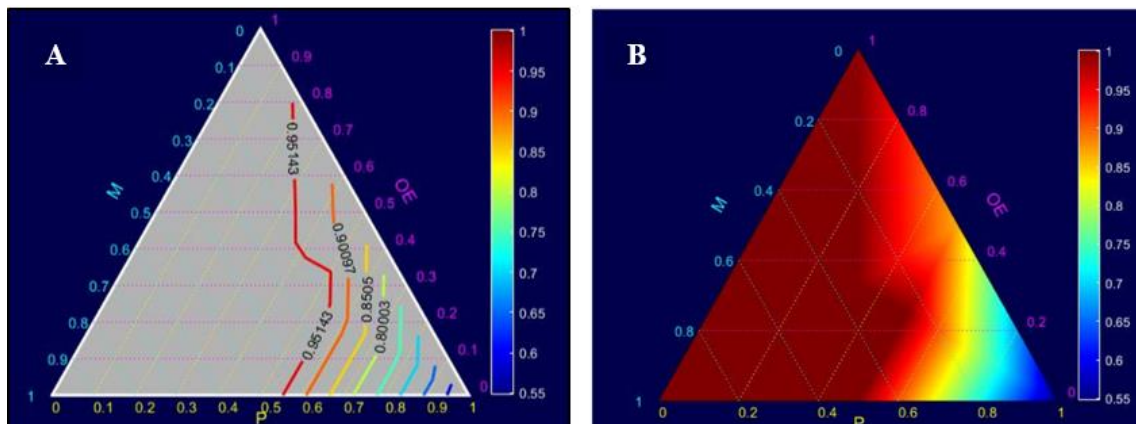
Tabela 5. Resultados das variáveis independentes para as diferentes composições, com a adição do óleo essencial, frente ao desafio com o inóculo de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.

Valores Reais (X) % Composição				Respostas (Y) % Inibição					
Ensaio	X ₁ (M)	X ₂ (P)	X ₃ (OE)	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.cepacia</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>
1	100	0	0	100,00±0	99,76±1,05	55,89±0,20	99,99±0,04	64,83±0,40	100
2	0	100	0	55,13±0,39	60,00±0,36	69,72±0,74	99,97±0,01	51,54±0,31	100
3	0	0	100	99,19±0,31	97,94±0,32	99,68±0,05	99,26±0,06	67,99±0,35	100
4	50	50	0	99,96±0,20	100,27±0,28	64,22±0,18	100,12±0,09	81,38±0,26	100
5	50	0	50	99,92±0,12	98,76±0,06	44,08±0,12	99,87±0,05	46,29±0,38	100
6	0	50	50	85,84±0,56	98,95±0,11	40,82±0,32	99,83±0,06	54,90±0,53	100
7	33,3	33,3	33,3	99,89±0,01	67,71±0,42	44,99±0,44	99,98±0,10	64,96±0,35	100
8	50	25	25	100,17±0,03	100,20±0,09	36,36±0,91	100,14±0,01	78,61±0,30	100
9	25	50	25	100,12±0,02	99,96±0,15	30,51±0,52	100,04±0,13	48,29±0,62	100
10	25	25	50	99,86±0,09	99,12±0,21	64,81±0,63	99,72±0,06	52,28±0,28	100

Legenda. M= metilparabeno, P= propilparabeno, OE= óleo essencial. Os resultados referem-se a média de três determinações seguidas e seus desvios padrão.

Através da análise estatística, o modelo matemático encontrou a melhor resposta para os resultados das associações e foram calculadas as curvas de contorno para a porcentagem de inibição $y(x)$ das diferentes associações para cada micro-organismo em função das três variáveis (X_1 , X_2 , X_3), bem como sua representação em gráficos de calor. Estes resultados podem ser vistos nas figuras 20 até 24.

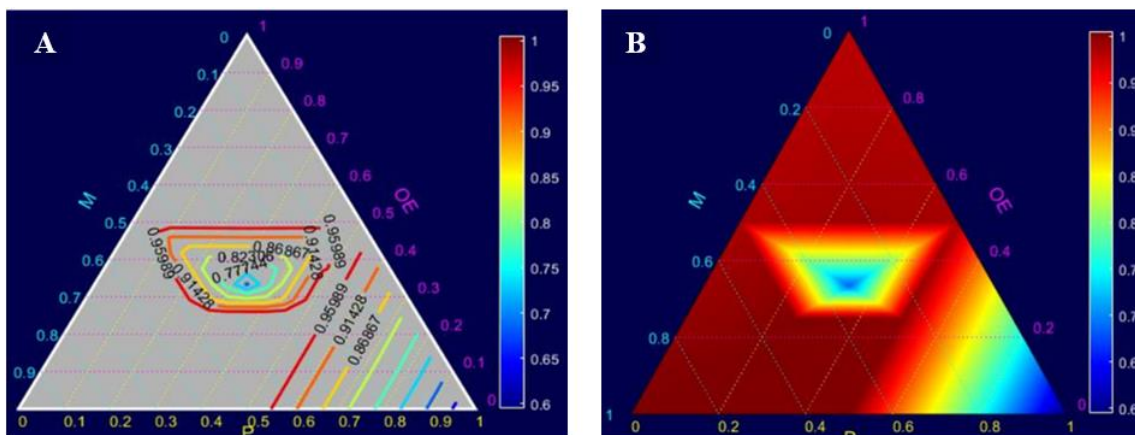
Figura 20. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de *Conochea scoparioides*, metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo *S. aureus*



Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial. Os valores de 0 a 1 em cada eixo correspondem a proporção (%) de cada componente na mistura.

Na representação das curvas de nível e no gráfico de calor para a inibição de *S.aureus* (figura 20), em função das diferentes proporções das três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) através dos valores descritos na tabela 6, observa-se que a melhor associação para os 3 componentes ocorreu utilizando 20% em diante da CIM para metilparabeno, até 50% da CIM para propilparabeno e de 80% em diante da CIM para o óleo essencial.

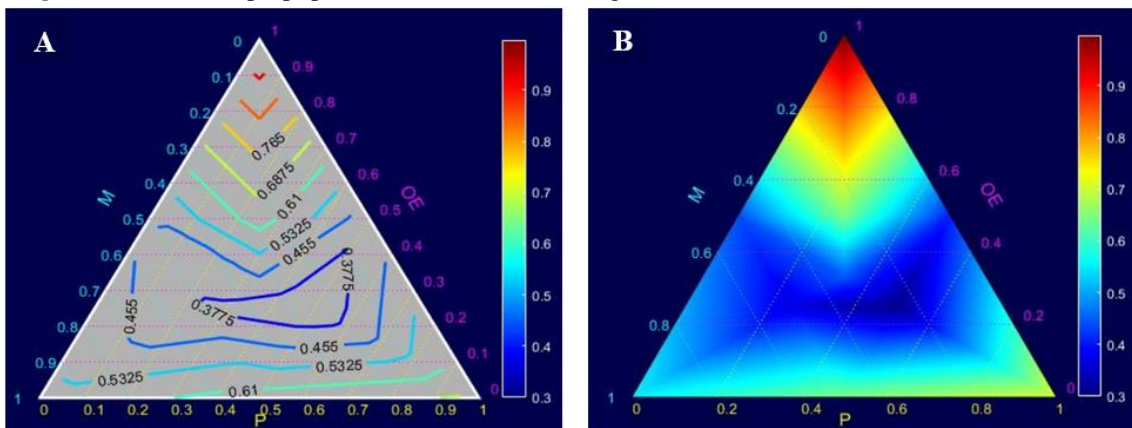
Figura 21. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de *Conochea scoparioides*, metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo frente ao micro-organismo *P. aeruginosa*



Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial. Os valores de 0 a 1 em cada eixo correspondem a proporção (%) de cada componente na mistura.

Na figura 21, observa-se que houve duas faixas para as concentrações dos componentes com inibição total do crescimento de *P. aeruginosa*, apresentando uma região de antagonismo ao redor da concentração de 50% de cada componente. Portanto, na primeira faixa temos uma concentração ideal de até 30% de propilparabeno, até 60% de metilparabeno e até 30% do óleo essencial. Já na segunda faixa as concentrações do propilparabeno são de até 50%, metilparabeno até 40% e de 50% em diante para o óleo essencial.

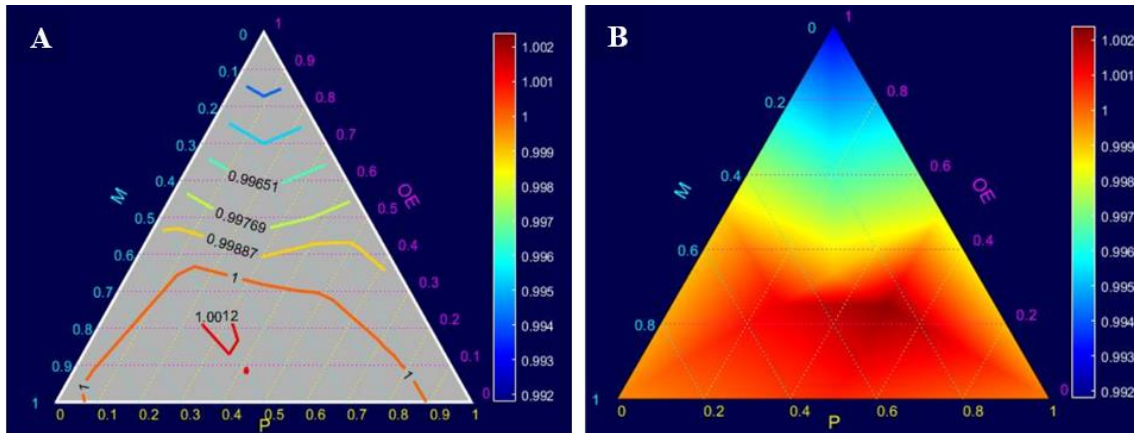
Figura 22. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de *Conoclea scoparioides*, metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo *E.coli*



Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial. Os valores de 0 a 1 em cada eixo correspondem a proporção (%) de cada componente na mistura.

Para *E. coli* a composição que apresenta a maior inibição foi de 90% da CIM em diante para o óleo essencial e observa-se que se for utilizado uma concentração acima de 10% da CIM do metilparabeno e acima de 50% da CIM do propilparabeno, pode ocorrer uma interferência negativa com relação à inibição microbiana (figura 22).

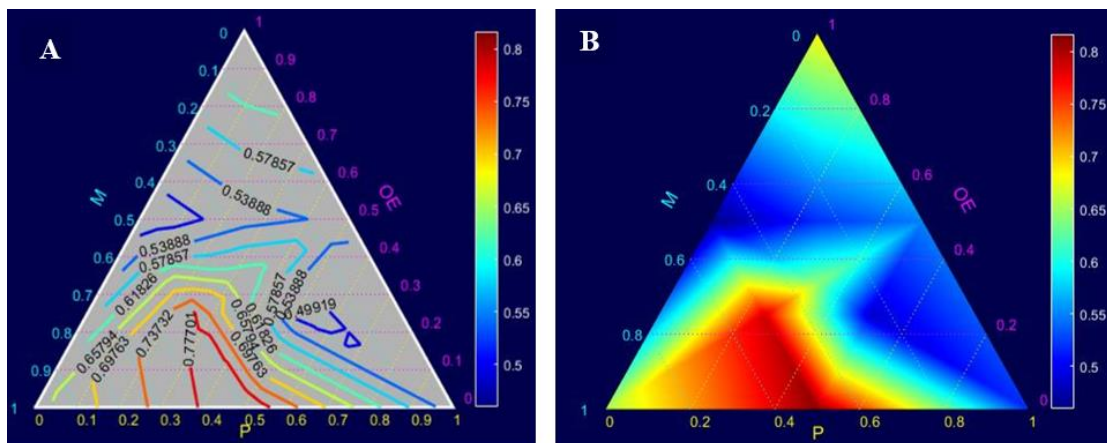
Figura 23. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de *Cono-bea scoparioides*, metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo *B. cepacia*



Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial. Os valores de 0 a 1 em cada eixo correspondem a proporção (%) de cada componente na mistura.

Para *B. cepacia*, que podemos ver na figura 23, para obter a maior inibição microbiana foi necessária uma concentração superior de metilparabeno em torno de 80% da CIM em diante. Para o propilparabeno as maiores inibições ocorreram na faixa de 30 a 70% das concentrações inibitórias mínimas e o óleo essencial pode ser utilizado até 10% da concentração inibitória mínima.

Figura 24 Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) obtidos para as associações de óleo essencial de *Cono-bea scoparioides*, metil- e propilparabeno frente ao micro-organismo *C. albicans*



Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial. Os valores de 0 a 1 em cada eixo correspondem a proporção (%) de cada componente na mistura.

No que se refere a levedura *C. albicans* observou-se que a concentração necessária de metilparabeno para sua inibição foi de 70 a 100%. Para o propilparabeno a concentração ideal ficou em torno de 40 a 50%, para o óleo essencial entre 0 e 30%

Baseando-se nas proporções ideais para inibição do crescimento de cada bactéria nesses gráficos, foram feitos os cálculos das concentrações necessárias em função das porcentagens relativas das CIM, conforme descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem da concentração dos componentes após associações para inibição dos micro- organismos

Micro-organismo	Porcentagem de concentração para inibição			Inibição de Crescimento
	M	P	OE	
<i>S. aureus</i>	Acima de 20%	Até 50%	Acima de 80%	95%
<i>P. aeruginosa</i>	Faixa 1: até 60%	Faixa 1: até 30%	Faixa 1: até 30%	100%
	Faixa 2: até 40%	Faixa 2: até 50%	Faixa 2: acima de 45%	
<i>E. coli</i>	Até 10%	Até 50%	Acima de 90%	100%
<i>B.cepacia</i>	Acima de 80%	Entre 30 e 70%	Até 10%	100%
<i>C. albicans</i>	Entre 70% e 100%	Entre 40 e 50%	Entre 0 e 30%	78%

Legenda: M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial

Através destes resultados podemos observar o efeito positivo da associação do óleo essencial com os parabenos, pois foi possível utilizar uma concentração abaixo da CIM de cada componente. Como por exemplo, o metilparabeno, cujo valor da CIM para *S. aureus* foi de 2000 µg/mL, porém na associação pode se ter sua inibição com 400 µg/mL, ou seja, é necessário 20% da sua CIM para a inibição do micro-organismo. Para o propilparabeno o valor obtido foi de 250 µg/mL (50% da CIM) e para o óleo essencial, cuja CIM é de 700µg/mL, foi observada a inibição do micro-organismo com a utilização de 80% da CIM em diante, portanto pode ser utilizada uma concentração de 560 µg/mL.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, devido ao antagonismo ocorrido na faixa de 50% da concentração dos componentes, observou-se que podem ser utilizadas duas faixas para a associação. Na faixa 1 a concentração de metilparabeno pode ser de até 60% da CIM, que corresponde a um valor de 600 µg/mL. Para o propilparabeno o valor obtido foi 150 µg/mL, o que corresponde à 30% do valor da CIM e quanto ao óleo essencial o valor se apresentou abaixo de 30%, o que corresponde a uma concentração de até 540 µg/mL. Na faixa 2, o valor da concentração para o metilparabeno foi de até 40% da CIM, 400 µg/mL ou menos. Para o propilparabeno encontrou-se uma concentração de 250 µg/mL para menos, o que corresponde 50% da CIM e quanto ao óleo essencial o valor obtido foi acima de 45% da CIM, portanto 810 µg/mL.

Para *E. coli* a concentração do metilparabeno na associação foi de até 100 µg/mL, o que corresponde à 10% da sua CIM. Para o propilparabeno o melhor valor da concentração a ser utilizado na associação é de até 50% da CIM (175 µg/mL) e para o óleo essencial a melhor escolha é 675 µg/mL, que corresponde à 90% da sua CIM.

As concentrações em µg/mL dos componentes encontradas para *B. cepacia* foram de 1.120 para o metilparabeno, o que corresponde à 80% da sua CIM; 350 (70% da CIM) para o propilparabeno, o que corresponde ao valor relacionado a faixa de 30% a 70% da CIM e para o óleo essencial o valor encontrado foi de 85 µg/mL equivalente à 10% da CIM.

Para a levedura *C. albicans* o valor ideal para ser utilizado na associação está entre 70% e 100%, ou seja, 550 µg/mL (100% da CIM). Para o propilparabeno a concentração ideal encontra-se entre 40 e 50%, cujo valor de 255 µg/mL corresponde à 50% da CIM. Para o óleo essencial a concentração da associação é de 30% da CIM (165 µg/mL). Os valores de cada componente após associação em função das porcentagens encontradas descritas na tabela 6 encontram-se na tabela 7 juntamente com os valores das CIM dos componentes.

Tabela 7. Valores das CIM e das concentrações de cada componente após as associações

Micro-organismo	M	P	OE	M	P	OE
	CIM	CIM	CIM	Concentração com a associação	Concentração com a associação	Concentração com a associação
µg/mL						
<i>S. aureus</i>	2000	500	700	400	250	560
				Faixa 1: 600	Faixa 1: 150	Faixa 1: 540
<i>P. aeruginosa</i>	1000	500	1800	Faixa 2: 400	Faixa 2: 250	Faixa 2: 810
				Média F1 e F2: 500	Média F1 e F2: 200	Média F1 e F2: 675
<i>E. coli</i>	1000	350	750	100	175	675
<i>B. cepacia</i>	1400	500	850	1120	350	83,3
<i>C. albicans</i>	550	125	550	550	62,5	165

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima, M: metilparabeno, P: propilparabeno, OE: óleo essencial.

5.5. TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE

5.5.1. Manipulação da formulação cosmética

A escolha por uma emulsão não iônica para a formulação cosmética ocorreu devido a sua ampla utilização em cosméticos, por apresentar propriedades que devam ser levadas em consideração como: não exibem carga específica entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas, ser estável a uma ampla faixa de pH e também ao pH cutâneo, e aceitar a incorporação de diferentes substâncias como por exemplo o óleo essencial (CAMPOS, J.S.; FRASSON, 2011). Um outro fator que levou a essa escolha foi por apresentar baixa interferência antimicrobiana na formulação, contrariamente ao que se observa em formulações contendo tenso ativos catiônicos como os sais de amônio quaternário, o que conferiria uma ação tanto bactericida quanto fungicida e que, conseqüentemente, acarretaria em um resultado dúbio, já que a ação antimicrobiana poderia advir tanto da formulação quanto do sistema conservante em estudo (VIEIRA.; RIBEIRO, 2016).

A emulsão não iônica semi-sólida manipulada apresentou um toque macio à pele, o que proporciona uma sensação agradável ao usuário. Em relação às características organolépticas a emulsão mostrou-se com coloração branco opaca, de baixa oleosidade, boa homogeneidade e espalhabilidade. Nas formulações que continham o dobro e o quadruplo da concentração inibitória mínima do óleo essencial observou-se um odor característico do óleo essencial de *C. scoparioides*. No decorrer da realização do teste de eficácia de sistema conservante as formulações mantiveram-se estáveis com as mesmas características do início do ensaio o que corrobora para a escolha da emulsão aniônica.

O cálculo das concentrações dos conservantes nas formulações foi baseado na maior porcentagem necessária para a inibição do micro-organismo de cada componente. Portanto, foi utilizado 80% da CIM do metilparabeno o que corresponde a 1120 µg/mL, 70% da CIM do propilparabeno equivalente a 350 µg/mL e a concentração de 675 µg/mL correspondente a 90% da CIM do óleo essencial. Esta formulação foi chamada de formulação 2. A partir dessas concentrações foram elaboradas mais 3 associações sendo que para a formulação 1 foram inoculados os menores valores utilizados na manipulação de formulações tanto para metilparabeno quanto para propilparabeno, o que equivale a 0,10% e 0,25% respectivamente e quanto ao óleo essencial foi utilizado o mesmo valor da formulação 2. Para as formulações 3 e

4, foram inoculados o dobro e o quádruplo dos valores da formulação 2, como pode ser visto na Tabela 8.

Tabela 8: Concentrações dos componentes que compõem o sistema conservante

Composição do conservante	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4
Metilparabeno	1.000 µg/mL	1.120 µg /mL	2.240 µg /mL	4.480 µg /mL
Propilparabeno	250 µg /mL	350 µg /mL	700 µg /mL	1.400 µg /mL
Óleo Essencial	675 µg /mL	675 µg /mL	1.350 µg /mL	2.700 µg /mL

Legenda: µg/mL: microgramas por mililitro.

Segundo a literatura (ROWE *et al.*, 2009), para formulações de uso tópico, a concentração limite indicada dos conservantes metilparabeno e propilparabeno quando utilizados isoladamente como agentes conservantes é de até 0,3%, ou seja, 3 mg/mL e 0,6% (6 mg/mL) respectivamente. Contudo, a legislação vigente (ANVISA 2012) permite o uso dos componentes individualmente em uma concentração limite de 0,4% (4 mg/mL) para cada parabeno ou em associação, cujo limite da concentração total é de 0,8% (8mg/mL) na formulação, independente da proporção da concentração utilizada de cada um dos dois componentes. Portanto observa-se que as concentrações dos parabenos nas formulações 1, 2 e 3 estão dentro das especificações tanto da literatura, quanto da legislação. Já a formulação 4, que apresenta o quádruplo das concentrações de cada componente, o valor do metilparabeno (0,45% ou 4,5 mg/mL), caso fosse utilizado isoladamente, estaria acima tanto do limite da literatura quanto da legislação. Porém como foi utilizado em associação com o propilparabeno (0,14% ou 1,4 mg/mL) encontra-se dentro do limite especificado pela legislação brasileira. O óleo essencial não apresenta um limite máximo de concentração estipulado por órgãos reguladores, mas caso sua concentração fosse somada aos parabenos a porcentagem dos conservantes na formulação 4 estaria em 0, 86%.

Após a manipulação das formulações foi realizada a contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante para então realizar o teste de eficácia do sistema conservante.

5.5.2. Contagem do número total de micro-organismos mesófilos e verificação da inativação do sistema conservante na formulação.

Os resultados relacionados à recuperação das cepas microbianas no ensaio da inativação do sistema conservante na formulação tanto na diluição 10^{-1} como na 10^{-2} foi em torno de 70 a 100% conforme especificação (USP 2012), o que valida o teste para ser realizado na diluição 10^{-1} . Quanto a contagem do número total de micro-organismos mesófilos o resultado foi de <10 UFC/mL para as quatro formulações, sendo assim as emulsões apresentaram qualidade sanitária adequada aos padrões pré-estabelecidos pelos compêndios oficiais (USP 2012, ANVISA 2019) e consequentemente foram aptas para a realização do teste de eficácia do sistema conservante.

No decorrer do teste de eficácia do sistema conservante é mandatório que seja feita a verificação da carga microbiana dos micro-organismos desafiados a fim de que não seja apresentado um resultado falso negativo. Esse controle demonstra que os micro-organismos testados sofreram decaimento pela ação do sistema conservante e não por sua inviabilidade por qualquer outro motivo. Os resultados das médias obtidas da viabilidade e manutenção da carga das cepas microbianas ao longo do teste encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Controle da viabilidade das cepas microbianas utilizadas no teste de eficácia do sistema conservante

Controle da viabilidade das cepas							
	Dias	<i>B.cepacia</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>
		UFC/mL					
Tempo	0	$3,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
	7	$3,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$
	14	$2,9 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
	21	$3,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$
	28	$3,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$

Legenda. UFC/mL: unidades formadoras de colônia por mililitro

Na tabela 10 encontram-se os resultados das quatro formulações desafiadas (F1, F2, F3 e F4), em relação ao tempo em que o teste de eficácia do sistema conservante foi realizado, ou seja, a cada 7 dias a partir do 7º dia que foi feita a inoculação dos micro-organismos com a finalização no 28º dia do início da inoculação.

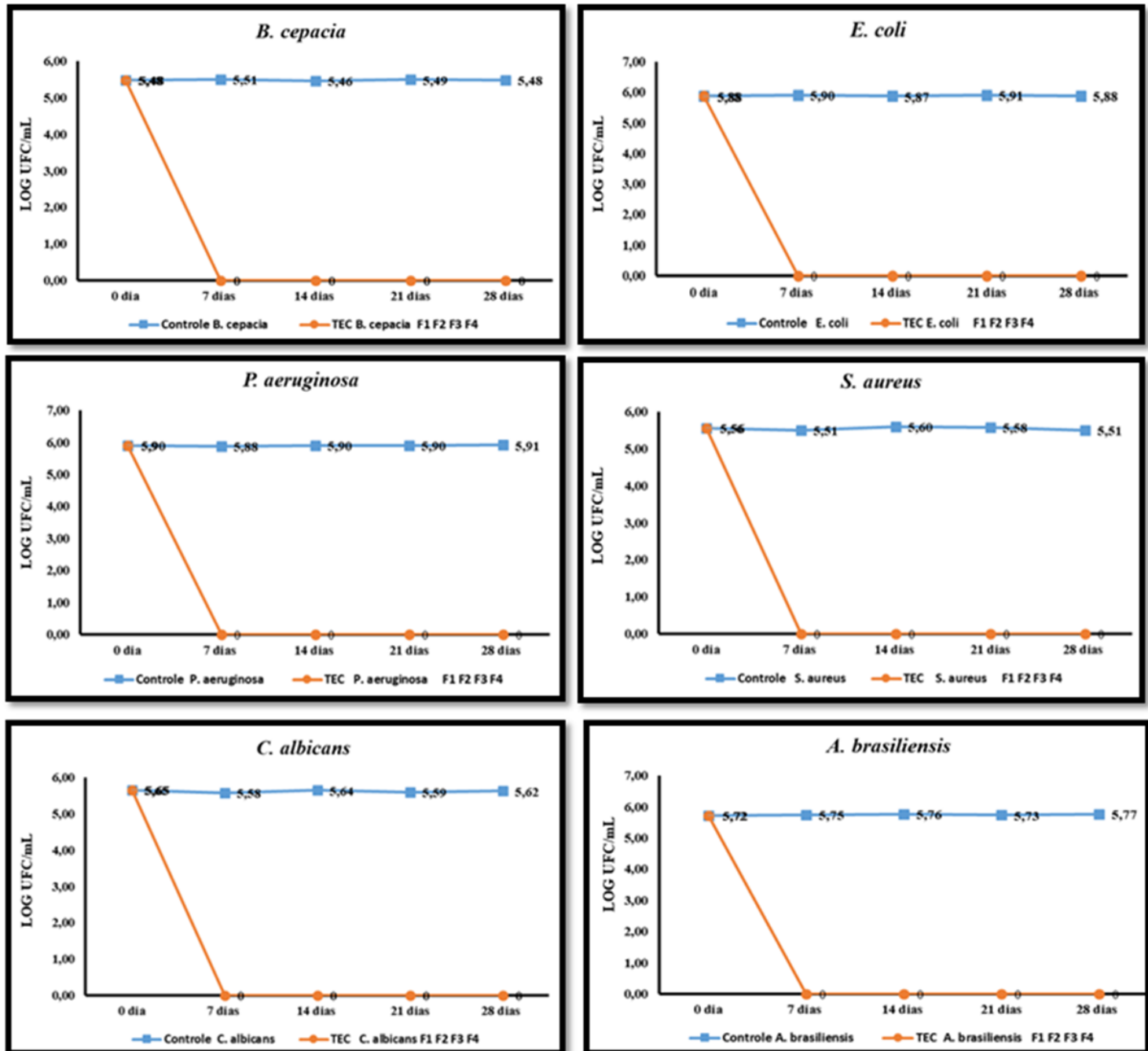
Tabela 10: Teste de eficácia do sistema conservante das quatro formulações com as respectivas concentrações das associações do metilparabeno, propilparabeno e o óleo essencial

Dia	<i>B. cepacia</i>				<i>E. coli</i>				<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. aureus</i>				<i>A. brasiliensis</i>			
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
21	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
28	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Legenda: F₁: Formulação 1, F₂: Formulação 2, F₃: Formulação 3, F₄: Formulação 4; UFC/mL: unidades formadoras de colônia por mililitro.

A representação gráfica tanto do controle da viabilidade das cepas microbianas quanto dos resultados das quatro formulações desafiadas (F1, F2, F3 e F4) utilizadas no teste de eficácia do sistema conservante estão representadas na figura 25.

Figura 25. Controle da viabilidade das cepas microbianas quanto dos resultados das quatro formulações desafiadas (F1, F2, F3 e F4) utilizadas no teste de eficácia do sistema conservante.



Legenda: LOG: logaritmo, UFC/mL: unidades formadoras de colônia por mililitro

De acordo tanto com a Farmacopeia Americana (USP 2012) e Farmacopeia Brasileira (ANVISA 2019) os critérios de aprovação para o sistema conservante utilizado em um produto de uso tópico, classificado como categoria 2, podem ser vistos no Quadro 2. Comparando esses critérios com os resultados referentes às formulações, notamos um decaimento de 5 ciclos logarítmicos no sétimo dia e nenhum aumento até o final do ensaio, o que está de acordo com as especificações estabelecidas pelos compêndios mencionados acima. Portanto verifica-se que

o resultado do ensaio está de acordo com o esperado, ou seja, a redução no 14º dia de 2 ciclos logaritmos para bactérias e nenhum aumento para fungos e sem aumento até o final do teste para todos os micro-organismos desafiados.

Quadro 2. Categorias de produtos e critérios para a eficácia antimicrobiana.

Categoria 2		7º dia	14º dia	28º dia
Produtos de uso tópico, constituídos de base, ou veículo aquoso, produtos nasais não estéreis e emulsões, incluindo aqueles aplicados em membranas mucosas	Bactérias	---	Deve haver redução de 2 logs do nº de UFC inicialmente inoculado	Não deve haver aumento da Contagem em relação ao 14º dia
	Fungos	---	Não deve haver aumento do nº de UFC inicialmente inoculado	Não deve haver aumento do nº de UFC inicialmente inoculado

Fonte: USP 2015

A duração da realização do teste de eficácia do sistema microbiano está diretamente relacionada com a contaminação que o produto poderá sofrer no decorrer do seu uso, como através da contaminação realizada pelo próprio consumidor. Como por exemplo, no caso da emulsão, a contaminação mais provável seria por micro-organismos encontrados na pele, como *S. aureus*. Portanto, se o conservante inibiu o seu crescimento durante os 28 dias, torna-se menor a probabilidade de uma contaminação futura (BRANNAN, D. K, *et al* 1987). Porém, para que a contaminação do produto cosmético seja evitada, além de apresentar um bom sistema conservante, é necessário que o consumidor tenha cuidado em seu uso. Como por exemplo, armazenar o cosmético em local adequado, livre da exposição à luz solar e de alterações de temperatura, quando for manuseá-lo sempre estar com as mãos limpas, evitar o compartilhamento desses produtos com outras pessoas e principalmente não utilizar o cosmético quando estiver fora do prazo de validade, pois o sistema conservante provavelmente não apresentará o efeito antimicrobiano esperado (GIORGIO *et al.*, 2018). Uma outra alternativa interessante para assegurar a qualidade sanitária do produto cosmético, seria não só realizar o teste de eficácia do sistema conservante após a sua produção como também –em períodos pré- determinados de seu uso até a sua data de validade (PAPAGEORGIU *et al.*, 2010).

Em um estudo anterior (MUYIMA *et al.*, 2002), foram testados como conservantes em formulação cosmética em base água os óleos essenciais de *Artemisia afra* Jacq., *Pteronia*

incana DC., *L. officinalis* e *R. officinalis*. Os óleos foram desafiados individualmente através do teste de eficácia do sistema conservante e de acordo com os resultados observados, apresentaram um decaimento da carga microbiana de 3 ciclos logaritmos ou mais no 7º dia de ensaio. Porém, as concentrações dos óleos utilizadas nas formulações estavam em torno de 50 a 1500 mg/mL, o que pode acarretar alterações organolépticas na formulação, como por exemplo um odor acentuado do óleo essencial. No presente estudo tendo também como objetivo de minimizar odor característico e intenso promovido pelo óleo essencial à formulação, a redução da carga microbiana ocorreu com uma concentração bem menor desse componente (0,675 a 2,7 mg/mL) em associação com os parabenos. Portanto, a utilização de associações de agentes conservantes se apresenta como uma alternativa interessante para as formulações tanto em relação a diminuição da presença de odores característicos, o que pode desagradar alguns consumidores, como na minimização dos efeitos adversos causados pelo uso em excesso de conservantes sintéticos (HERNANDES et al., 2017).

No teste de eficácia de conservantes, observamos que a associação do óleo de *C. scoparioides* com os parabenos foi capaz de inibir o desenvolvimento de todos os microorganismos mesmo em concentrações inferiores àquelas obtidas na análise do sinergismo. Este resultado pode estar relacionado com algum efeito antimicrobiano dos componentes da formulação. Os tensoativos não iônicos (Polawax NF[®]) e os aniônicos quando utilizados em formulações cosméticas, apesar de não apresentarem ação antimicrobiana significativa quando comparados a tensoativos catiônicos, podem colaborar com os agentes antimicrobianos da formulação, atuando como intensificadores desses conservantes. A ação antimicrobiana de alguns tensoativos não iônicos está relacionada à sua composição que contém grupos hidrofílicos, álcoois graxos, e lipofílicos, hidrocarbonetos, o que favorece a interação com as paredes microbianas levando a uma ação antibacteriana e antifúngica. Tensoativos não iônicos devido a sua composição também afetam a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (OLIVEIRA, 2008 ; HERMAN, 2019). A provável ação antimicrobiana do agente emulsificante na formulação deste estudo favorece a elaboração de um produto com menores riscos de desenvolver qualquer problema alergênico ao consumidor.

O intuito do atual estudo foi elaborar um sistema conservante através da associação do óleo essencial de *C. scoparioides* e conservantes sintéticos para diminuir a concentração de cada um dos componentes na formulação. A estratégia empregada de usar a CIM e o estudo do sinergismo entre os componentes permitiu desenvolver um sistema conservante eficaz com

quantidades reduzidas de conservantes. Por esse motivo, espera-se uma menor probabilidade de reações indesejáveis no consumidor com o emprego desse sistema conservante em formulações cosméticas.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a análise do perfil químico do óleo essencial de *C. scoparioides* que é composto em sua maioria por terpenos, sendo os principais componentes timol e o éter metílico do timol com 33,8 e 39,2%, respectivamente.

Quanto a sua atividade antimicrobiana e de seu principal componente, que foi determinada através da concentração inibitória mínima, observou-se que tanto o óleo essencial como o timol apresentaram uma atividade antibacteriana e antifúngica considerável, com CIM variando de 172 a 1748 µg/mL frente aos micro-organismos *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* cuja concentração inibitória mínima do timol ficou acima 2.000 mg/mL. Assim, outros componentes do óleo devem ser responsáveis por sua atividade frente a esse micro-organismo.

Após ter sua ação antimicrobiana comprovada, o óleo essencial foi avaliado estatisticamente para verificar o seu efeito em associação com os conservantes sintéticos, propilparabeno e metilparabeno. A análise do sistema conservante constituído pelos três componentes foi de grande importância, pois através dela foi possível definir com uma maior precisão a quantidade ideal de cada componente necessária para promover a inibição dos micro-organismos desafiados. O estudo estatístico demonstrou um efeito sinérgico ou aditivo entre o óleo essencial e os conservantes sintéticos, permitindo que cada componente fosse utilizado em concentrações menores que suas CIM quando isolados. Das concentrações ideais para a inibição encontradas através do estudo estatístico foram feitas mais 2 concentrações superiores e uma inferior dos componentes, onde foram utilizadas como sistema conservante em uma formulação não-iônica. A comprovação da ação antimicrobiana das 4 concentrações dessas associações foi avaliada através do teste desafio do sistema conservante, cujos resultados se mostraram de acordo com as especificações estabelecidas por compêndios oficiais. Os resultados encontrados em conformidade com as especificações do teste de eficácia do sistema conservante das quatro formulações, corroboram com os resultados encontrados nas associações pré-determinadas estatisticamente, o que promove uma maior robustez no estudo proposto.

As associações testadas entre o óleo essencial de *C. scoparioides* e os conservantes sintéticos constituem uma opção para seu uso em formulações cosméticas com a finalidade de minimizar a quantidade de conservantes sintéticos adicionados em formulações cosméticas. Essa diminuição da concentração do sistema conservante poderá ser uma resposta ao apelo ao “consumo verde” dos usuários e promover uma maior segurança durante o uso desses produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASZYŃSKA, M., SWARCEWICZ, M. The possibilities of using essential oils as an active ingredients or preservatives in cosmetic products. *Chemistry and Chemical Technology*.v.24, n. 26, p. 158-159, 2011.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Guia de estabilidade de produtos cosméticos.1ªedição.v.1. Brasília. Maio 2004.52 p.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasilia,2019. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução RDC Nº29, de 1º de junho de 2012 [on line]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> - Acesso em: 12 novembro 2017.

ARAÚJO, D. X., *et al.* Efeito de diferentes concentrações de sais e bap na brotação in vitro de pataqueira. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 14, p. 338–345, 2017.

BARAKAT, H. Composition, Antioxidant, Antibacterial Activities and Mode of Action of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) Buds Essential Oil. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 4, n. 13, p. 1934–1951, 2014.

BHOMICK, P. C.; RAO, K. S. Toxic Shades- Chemicals in Cosmetics that Matters. v. 3, n. 2, p. 436–439, 2014.

BRANCO *et al.* Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 285-293, 2018.

BRANNAN, D. K., *et al.* Correlation of in vitro challenge testing with consumer use testing for cosmetic products. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1827–1832, 1987.

BUDECKA, A., KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Microbiological contaminants in cosmetics – isolation and characterization. **Biotechnology and Food Sciences Microbiological**, v.78, p. 15-23, 2014.

CAMPOS, J.S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 10, n. 20, p. 363–368, 2011.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 3, p. 264–269, 1995.

CHOUHAN, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 58, p. 1-21, 2017.

COSTA, R.G. **Estudo da obtenção do óleo essencial e da secagem da pataqueira (*Conobea scoparioides* Cham. & Schltld.), de origem natural de cultivo hidropônico.** 2010.133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

COSTA, R. G. et al. Essential Oil of Pataqueira (*Conobea scoparioides* Benth.): From Natural Occurrence and Produced by Hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v.1, n. 3, p. 90–94, 2014.

COX, S. D, *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

DENYER,S.P., BAIRD, R.M. Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices. 2^a.ed. Florida: Taylor and Francis Group, 2007.p. 504.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1213–1219, 2003.

EVANS, J. D.; MARTIN, S. A. Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. **Current Microbiology**, v. 41, p. 3–4, 2000.

FARRINGTON, J. K. *et al.* Erratum: Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1169, 1995.

FEITOSA, R. M. *et al.* Influência do método de extração no teor de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 238–241, 2015.

FERRARI, M. *et al.* Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 626–630, 2007.

FERRAZ, João B. S. *et al.* Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 61, n. 3, p. 40-43, 2009.

FLOR, J.; MAZIN, M. R.; FERREIRA, L. A. Cosméticos Naturais, Orgânicos e Veganos. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 31, n. mai-jun, p. 30–36, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Allergens in Cosmetics** (2020). Disponível em: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/allergens-cosmetics-2020.pdf>.

GIORGIO, A. *et al.* Microbiological stability of cosmetics by using challenge test procedure. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 23–28, 2018.

GONZÁLEZ, M, R.; HURTADO, M, A. Primeros ensayos para el cultivo y caracterización del aceite esencial de *Conoclea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. para el Pacífico colombiano. **Entramado**, v. 7, n. 2, p. 174–185, 2011.

HALLA, N. *et al.* Cosmetics preservation: A review on present strategies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–41, 2018.

HERMAN, A. *et al.* Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 232–237, 2013.

HERMAN, A., *et al.* Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agent in cosmetic emulsion. **Indian J Microbiol**, India, v.53, n.2, p. 232-237, 2013.

HERMAN, A. Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. **Current Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 744–754, 2019.

HERNANDES, C. *et al.* Lippia organoides essential oil : an efficient and safe alternative to preserve food , cosmetic and pharmaceutical products. **Journal of Applied Microbiology** n. 122, p. 900–910, 2017.

HOSSAIN, S. *et al.* Antibacterial activity of essential oil from lavender (Lavandula angustifolia) against pet turtle-borne pathogenic bacteria . **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 3, p. 195, 2017.

ISSA, F.I.COSTA. **Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de Apoclada simplex McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)**. 2015.71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2015.

JIMENEZ, L.; SMALLS, S. Molecular detection of Burkholderia cepacia in toiletry, cosmetic, and pharmaceutical raw materials and finished products. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 963–966, 2000.

KABARA, J. J. **Preservative-free and Self-preserving Cosmetics and Drugs : Principles and Practices Cosmetic Science and Technology Series**. Phoenix, Arizona: CRC Press, p.286, 1997.

KOČEVAR GLAVAČ, N.; LUNDER, M. Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 3, p. 276–284, 2018.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística aplicada**. 4.ed. São Paulo, 2010.

MACCIONI, A. M. *et al.* Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, n. 1, p. 53–59, 2002.

MACHADO, R.; MORENO, P. R. H. Avaliação da Aplicação de Produtos Naturais como Conservantes em Produtos Cosméticos. **8º Workshop do Mestrado Profissional Instituto de Química Universidade de São Paulo**, p. 108–112, 2020.

MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 291–296, 1999.

MARCHESE, A., *et al.* Antibacterial and antifungal activities of thymol : A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.

MATWIEJCZUK, N.; GALICKA, A. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, p. 176–210, 2020.

MIGUEL, L. M. Tendências Do Uso De Produtos Naturais Nas Indústrias De Cosméticos Da França. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 1–15, 2011.

MILADI, H., *et al.* Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 95–100, 2016.

MILLEZI, A. F. *et al.* Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p. 18-24,2014.

MINA, R.T.G., MONTAÑO, A.M.H. Primeros ensayos para el cultivo y caracterización del aceite esencial de *Conochea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. para el Pacífico colombiano. *Revista Entramado*.V.7. n. 2, p. 174-185, jul-dez, 2011.

MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: Propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 1, p. 213–220, 2016.

MORAIS, A.A., *et al.* Óleos essenciais da Amazônia contendo timol. **Acta Amazonica**, v.2, n.1, p.45-46, Abril, 1972.

MORENO, P. R. H. *et al.* Native Brazilian Plants Against Nosocomial Infections: A Critical Review on their Potential and the Antimicrobial Methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3040–3078, 2013.

MORENO, P. R. H. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) Leaves. **The Journal of Essential Oil Research**, V. 21, p. 190-192, 2009.

MUSZA, L.L., *et al.* Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conococarpus scoparioides*. **Journal of natural products**. V.57.n 11, p.1498-1502, 1994.

MUYIMA, N. Y. O. *et al.* The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in a aqueous cream formulation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 4, p. 258–266, 2002.

NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108–113, 2007.

NATURA CAMPUS. Disponível em <http://www.naturacampus.com.br/cs/naturacampus/post/2016-04/oleo-essencial-pataqueira-tradicoes-amazonicas>. Acesso em: 21 março 2018.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NCCLS/CLSI- National Committee for Clinical Laboratory Standards – Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, M2-A8, Volume 23 nº1 [ISBN 1-56238-485-6], 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf Acesso em: 22.05.2018.

NETO, B. D. *et al.* **Como fazer experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**,. 3.ed. Campinas: Unicamp, 2010.

OKEKE, I.N., LAMIKANRA, A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 922-928, 2001.

Óleos essenciais. Disponível em : <https://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais>, acesso 01/07/2019

OLIVEIRA, F. F. DE. Caracterização físico-química de amostras de óleo de pinho e estudo da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de ativos fenólicos. Tese (Doutorado em Química). Universidade de São Paulo, 2008.

PACKER; LUZ, M. M. . Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 102–107, 2007.

PAPAGEORGIU, S. *et al.* New alternatives to cosmetics preservation. **Journal of Cosmetic Science**, v. 61, n. 2, p. 107–123, 2010.

PLANTSYSTEMATICS. Disponível em: www.plantsystematics.org/imgs/Plantaginaceae_Conobea_scoparioides, acesso 14/05/2019

RADULOVI, N. S., *et al.* Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932–952, 2013.

ROWE, R. C, *et al.* **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6^a ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

REFLORA, Consulta pública do herbário virtual Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 11.03.2019.

RODEN, K. Preservatives in personal care products. **Microbiology Australia**, v. 31, n. 4, p. 195–197, 2010.

SANTOS, F.S.; NOVALES, M. G. . Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012.

SATI, S. P. A. AND N. ARTIFICIAL PRESERVATIVES AND THEIR HARMFUL EFFECTS: LOOKING TOWARD NATURE FOR SAFER ALTERNATIVES. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 7, p. 2496–2501, 2013.

SCHWENSEN, J. F. et al. Failures in risk assessment and risk management for cosmetic preservatives in Europe and the impact on public health. **Contact Dermatitis**, v. 73, n. 3, p. 133–141, 2015.

SILVA, L. E. DA; VALENTINI, C. M. A.; BARROS, W. M. DE. Siparuna guianensis: obtenção do óleo essencial e avaliação do potencial farmacológico. **Multi-Science- Matinhos – PR**, v. 1, n. 2, p. 59–65, 2015.

SIM, J. X. F. et al. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 524–530, 2019.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G. MELLO, J. C. P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P. R. (2003). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. São Carlos: Ed. USFC., 2010. 1096 p.

SONI, M. G. et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1335–1373, 2002.

SOUZA, V. C.; GIULIETTI, A. M. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. **Pesquisas Botânica**, n. 60, p. 7–288, 2009.

TAN, A. S. B. T. *et al.* Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.26, n.1, jan 2013, p.153-157.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM.F. Microbiologia. 5ª.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 12

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Microbiological Examination of Nonsterile Products. 38ªed. 2012.

VANRELL, H. Formulaciones Oftálmicas Preservatives in Ophthalmic Formulations : an Overview. **Arch Soc Esp Oftalmol**, v. 82, n. 9, p. 531–532, 2007.

VARVARESOU, A. et al. Self-preserving cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 3, p. 163–175, 2009.

VASCONCELOS., *et al.* Cell Viability of *Candida albicans* Against the Antifungal Activity of Thymol. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 277–281, 2014.

VIANA, C.A.S., *et al.* **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. Acesso em 14.05.2019.

VIEIRA, D. B.; RIBEIRO, A. M. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: Mode of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 760–767, 2006.

WANG, Y., YAM, K.L. Inhibitory effect of thymol via different modes of delivery on growth of *Escherichia coli* DH5 α . **Food Packaging and Shelf Life**. V.16, p. 92-96, 2018.

YAN WANG, K. L. Y. Inhibitory effect of thymol via different modes of delivery on growth of *Escherichia coli* DH5 α . **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 92–96, 2018.

YAZAR, K. *et al.* Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. **Contact Dermatitis**, v. 64, n. 5, p. 265–272, 2011.