

**Universidade De Ribeirão Preto – UNAERP
Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia**

CAMILA HERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES EM PRODUTOS
FARMACÊUTICOS E ALIMENTÍCIO**

Ribeirão Preto

2013

Camila Hernandez

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES EM PRODUTOS
FARMACÊUTICOS E ALIMENTÍCIO**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

**Ribeirão Preto
2013**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

H557a Hernandes, Camila, 1984-
Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais
como conservantes em produtos farmacêuticos e alimentício /
Camila Hernandes. - - Ribeirão Preto, 2014.
132 f.: il. color.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2014.

1. Conservante. 2. Suco de laranja. I. Título.

CDD 660

CAMILA HERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO CONSERVANTES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS E ALIMENTÍCIO**

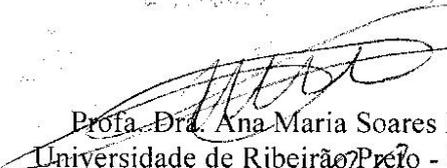
Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

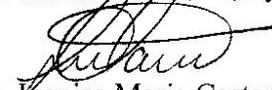
Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 06 de dezembro de 2013

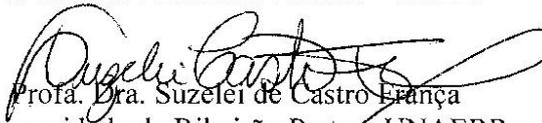
Resultado: Aprovada

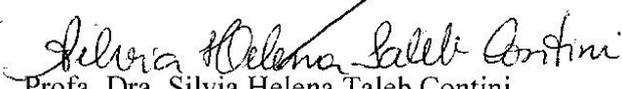
BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Profa. Dra. Ivanise Maria Cestari
Pesquisadora Folha Nativa


Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Universidade Estadual Paulista - UNESP


Profa. Dra. Suzelen de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2013**

*Dedico este trabalho aos meus pais
João Carlos Hernandez e Maria de Lourdes Q. Hernandez, e à minha
orientadora e amiga Dra. Ana Maria S. Pereira*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade bendita de estar entre pessoas maravilhosas e poder trabalhar em prol da ciência;

Aos meus pais Maria de Lourdes e João Carlos, por serem meus pilares de sustentação e por todo amor que a mim dedicam;

Aos meus irmãos, Carlos e José Ricardo, pelo carinho e compreensão, e por simplesmente fazerem parte da minha vida;

À minha Professora, orientadora, amiga, segunda mãe, Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela paciência, apoio, dedicação, amizade, por ter me dado à mão, seguindo junto, para que eu pudesse vencer todos os meus medos e dificuldades, por permitir meu crescimento profissional, por confiar a mim a realização deste trabalho;

À minha amiga Edieidia S. Pina, pelo apoio na realização dos ensaios, e pelo amor e carinho em cada gesto e olhar, me acalmando e me incentivando sempre com seu exemplo de garra e determinação;

À minha amiga Juliana S. Coppede, pela sua prontidão em me auxiliar e amparar em cada momento de dificuldade como todo o amor;

Aos meus amigos Milene, Lucas, Mayara, Bruna, Taice, Marielle, Tiago, Bruno, Laura, Cristina, Carmen, Glorinha, Fatiminha, Vó Carmen, Célia, Juliana,

Daniele, Denise, Tauane, Gabriel, Tamires, Natália, pela amizade construída, os quais levo comigo no coração por toda a eternidade;

À professora Dra. Bianca Waléria Bertoni, pelo auxílio nas análises estatísticas, e por cada palavra de carinho e de paz;

À Prof. Dra. Suzelei de Castro França, por sua dedicação e carinho ao Departamento de Biotecnologia;

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, Rosane, Tábata, Patrícia, Simone, Gleidson, Elenice, Carla, Letícia, Sarazete, China e Buscapé (in memoriam) pelo apoio técnico e amizade;

Aos professores e pesquisadores do Departamento de Biotecnologia da Unaerp, Dr. Mozart, Dr. Rene, Dr. Carlos, Dr. Paulo, Dra. Sonia, Dra. Miriam e Dra Ana Lúcia;

À Professora Dra. Sílvia Taleb- Contini pela realização das análises em CG/EM, além de seu carinho e amizade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro (bolsa Doutorado Processo 2010/07970-7) para o desenvolvimento deste trabalho;

À Ourofino Agronegócios;

À Dra. Valéria C. Amstalden Junqueira, do Ital- Instituto de Tecnologia em Alimentos;

Ao Milton Mastria Filho, Sérgio Pereira e Luciana de Lima Lioffi, da Citrosuco (Fischer S/A- Com. Ind. e Agricultura);

À professora Dra. Eliana Ap. Varanda e sua aluna Lívia Greggi Espanha, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP;

À Dra Ivanice Maria Cestari , da Folha Nativa Cosméticos;

À professora Dra. Marise Bastos Stevanato;

À Dra. Katyana F. Bonini Camilo, e à Farmácia Universitária Cidinha Bonini;

À Farmacia da Natureza Terra de Ismael.

RESUMO

As indústrias alimentícias, de cosméticos, bem como de medicamentos, têm sofrido pressão por parte dos consumidores nos últimos anos, os quais exigem produtos livres de conservantes, visto que estes têm causado danos à saúde da população, e ao meio ambiente. Entretanto, embora muitas vezes danosos, os conservantes são essenciais na composição dos produtos industrializados ou não, o que tem aumentado o interesse das indústrias por novos agentes antimicrobianos, incluindo os de origem natural. Diante destes fatos, o presente trabalho teve como objetivo, a avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais de espécies vegetais, bem como sua toxicidade, para a utilização como conservantes em produtos alimentícios, e farmacêuticos. Cerca de 117 espécies vegetais foram coletadas, identificadas e submetidas a extração de óleos essenciais através de hidrodestilação. Os constituintes químicos majoritários dos óleos essenciais foram identificados, constatando que 61,5% das espécies produziram altos teores de carvacrol. A atividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada, sendo os pertencentes à espécie de *Lippia sp.* os mais promissores. Os óleos essenciais foram então avaliados quanto sua ação em combinação entre si, e com conservante comercial Nipagin®. Com estes ensaios constatou-se que a espécie de *L. origanoides* TI 136- carvacrol em combinação com Tween 80® foi a mais promissora para dar sequência aos demais ensaios. A toxicidade deste óleo foi então avaliada através de testes de toxicidade aguda, citotoxicidade, alergenicidade e mutagenicidade. A DL₅₀ do óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol foi de 3,5 g.Kg⁻¹, enquanto que a IC₅₀ em células de fibroblasto de camundongos foi de 0,15 µL.mL⁻¹. O óleo essencial não apresentou alergenicidade e foi considerado como negativo para o teste de Ames, caracterizando-o como não mutagênico. O óleo essencial foi desafiado quanto sua ação conservante em suco de laranja e preparações farmacêuticas de creme, xarope e xampu, mostrando-se eficaz em alimentos e preparações farmacêuticas de bases aquosas. Alterações nas características de odor e paladar foram observadas com a presença do conservante em suco de laranja e xarope. Com este trabalho conclui-se que o óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol pode ser utilizado em substituição aos conservantes atualmente comercializados em suco de laranja e xarope, desde que novos ensaios sejam realizados a fim de se melhorar as características organolépticas.

Palavras-chave: Conservante. Carvacrol. Suco de laranja. Preparações farmacêuticas. *Lippia origanoides*.

ABSTRACT

The food industries, cosmetics, as well as medicines, has suffered pressure on the part of consumers in recent years, which require products free of preservatives, as these have caused damage to the health of the population, and the environment. However, although often harmful, the preservatives are essential in the composition of industrialized products or not, which has increased the interest of industries for new antimicrobial agents, including those of natural origin. Faced with these facts, the present work had as objective, the evaluation of the antimicrobial activity of essential oils of plant species, as well as their toxicity, for use as preservatives in food and pharmaceuticals products. Approximately 117 plant species were collected, identified and subjected to extraction of essential oils through hidrodestilation. The majority chemical constituents of essential oils were identified, noting that 61,5% of species produced high levels of carvacrol. The antimicrobial activity of the oils was evaluated, and those belonging to the species of *Lippia sp.* were the most promising ones. The essential oils were then assessed for their action in combination among themselves, and with commercial preservative. With these tests it was found that the species of *L. origanoides* TI 136- carvacrol in combination with Tween 80® was the most promising to give sequence to the other tests. The toxicity of this oil was then evaluated through tests for acute toxicity, cytotoxicity, allergenicity and mutagenicity. The LD₅₀ of *L. origanoides* TI 136- carvacrol essential oil was 3.5 g.kg⁻¹, while the IC₅₀ in fibroblast cells of mice was 0.15 µL. mL⁻¹. The essential oil showed no allergenicity and was regarded as negative for the Ames test, characterizing it as not mutagenic. The essential oil was challenged regarding its action preservative in orange juice and pharmaceutical preparations. The preservative was effective in food and pharmaceutical preparations of aqueous bases. Changes in odour and taste preferences were observed with the presence of the essential oil preservative in orange juice and maple syrup. With this study it is concluded that the *L. origanoides* TI 136- carvacrol essential oil can be used as a replacement for preservatives currently marketed, in orange juice, syrup and shampoo, since that new tests are carried out in order to improve the organoleptic characteristics.

Keywords: Preservative. Carvacrol. Orange juice. Pharmaceutical preparations. *Lippia origanoides*.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | A CONSERVAÇÃO EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS, COSMÉTICOS E ALIMENTÍCIOS | 16 |
| 1.2 | OS ÓLEOS ESSENCIAIS | 20 |
| 1.3 | SINERGISMO NA BUSCA POR SISTEMAS CONSERVANTES MAIS EFETIVOS | 25 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3 | HIPÓTESE | 29 |
| 4 | OBJETIVOS | 30 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL | 30 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 5.1 | COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES | 31 |
| 5.2 | EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS | 38 |
| 5.3 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS | 38 |
| 5.3.1 | Obtenção dos microrganismos | 38 |
| 5.3.2 | Estoque das linhagens microbianas | 39 |
| 5.3.2.1 | Linhagens bacterianas | 39 |
| 5.3.2.2 | Linhagem de levedura | 39 |
| 5.3.2.3 | Linhagem de fungo filamentoso | 39 |
| 5.3.3 | Manutenção e preparo das linhagens microbianas | 40 |
| 5.3.3.1 | Linhagens bacterianas | 40 |
| 5.3.3.2 | Linhagem de <i>C. albicans</i> | 40 |
| 5.3.3.3 | Linhagem de <i>A. brasiliensis</i> | 40 |
| 5.3.4 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais | 40 |
| 5.3.5 | Ensaio de sinergismo | 41 |
| 5.3.5.1 | Combinações de óleos essenciais com Nipagin® | 41 |
| 5.3.5.2 | Combinações entre óleos essenciais | 42 |
| 5.3.5.3 | Combinação de óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> (TI 136-carvacrol) com polissorbato 80 (Tween 80®) e Nipagin® | 42 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.4 | AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL ₅₀) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 42 |
| 5.5 | AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 43 |
| 5.5.1 | Linhagem celular | 43 |
| 5.5.2 | Estoque e cultura de 3T3 | 43 |
| 5.5.3 | Amostras | 44 |
| 5.5.4 | Atividade citotóxica | 44 |
| 5.5.5 | Análise dos resultados | 44 |
| 5.6 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DÉRMICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) EM PELE DE COELHOS ALBINOS | 45 |
| 5.7 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 49 |
| 5.7.1 | Linhagens utilizadas | 49 |
| 5.7.2 | Preparo de inóculos de <i>S. typhimurium</i> | 49 |
| 5.7.3 | Meios de cultura e soluções | 49 |
| 5.7.4 | Mistura S9 | 49 |
| 5.7.5 | Ensaio de mutagenicidade | 50 |
| 5.8 | AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM ALIMENTO | 50 |
| 5.8.1 | Microrganismo | 50 |
| 5.8.2 | Estoque e manutenção | 51 |
| 5.8.3 | Preparo de solução de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> | 51 |
| 5.8.4 | Suco de laranja | 51 |
| 5.8.5 | Atividade do sistema conservante em suco de laranja | 51 |
| 5.8.6 | Avaliação da atividade antimicrobiana de suco de laranja contendo sistema conservante | 52 |
| 5.8.6.1 | Determinação CIM | 52 |
| 5.8.6.2 | Determinação CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) | 52 |
| 5.8.7 | Análise das características sensoriais e pH do suco de laranja | 53 |
| 5.9 | AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS | 53 |
| 5.9.1 | Preparações farmacêuticas | 53 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.9.2 | Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações | 54 |
| 5.9.2.1 | Determinação CIM | 54 |
| 5.9.2.2 | Determinação CBM e CFM | 54 |
| 5.9.3 | Avaliação da eficácia do sistema conservante | 55 |
| 5.9.3.1 | Microrganismos | 55 |
| 5.9.3.2 | Repique dos microrganismos | 55 |
| 5.9.3.3 | Padronização da suspensão de microrganismos | 55 |
| 5.9.3.3.1 | Bactérias | 55 |
| 5.9.3.3.2 | Fungo leveduriforme | 56 |
| 5.9.3.3.3 | Fungo filamentoso | 56 |
| 5.9.3.4 | Validação da metodologia através da escolha de neutralização do sistema conservante | 56 |
| 5.9.3.5 | Teste eficácia do sistema conservante | 57 |
| 5.9.3.5.1 | Critério de aceitação de teste de eficácia do sistema conservante | 58 |
| 5.9.4 | Análise das características sensoriais e pH das preparações farmacêuticas | 58 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 60 |
| 6.1 | AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS | 60 |
| 6.1.1 | Composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI136-carvacrol) | 75 |
| 6.2 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS | 77 |
| 6.2.1 | Determinação da CIM dos óleos essenciais | 77 |
| 6.2.2 | Ensaio de sinergismo | 83 |
| 6.2.2.1 | Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI 45- carvacrol) em associação com Nipagin® na atividade antimicrobiana | 83 |
| 6.2.2.2 | Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI 128- timol) em associação com Nipagin® na atividade antimicrobiana | 85 |
| 6.2.2.3 | Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI 45- carvacrol) em associação com <i>L.</i> | |

| | | |
|----------|---|------------|
| | <i>origanoides</i> (TI 40- endo-fenchol) na atividade antimicrobiana | 88 |
| 6.2.2.4 | Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI 45 -carvacrol) em associação com <i>L. origanoides</i> (TI 128- timol) na atividade antimicrobiana | 90 |
| 6.2.2.5 | Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) em associação com polissorbato Tween 80® e Nipagin® na atividade antimicrobiana | 93 |
| 6.3 | AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL ₅₀) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 98 |
| 6.4 | AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 100 |
| 6.5 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DÉRMICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) EM PELE DE COELHOS ALBINOS | 101 |
| 6.6 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i> (TI 136- carvacrol) | 103 |
| 6.7 | AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM ALIMENTO | 105 |
| 6.7.1 | Atividade do sistema conservante em suco de laranja | 105 |
| 6.7.2 | Avaliação da atividade antimicrobiana de suco de laranja contendo sistema conservante | 107 |
| 6.7.3 | Avaliação das características sensoriais e pH do suco de laranja | 109 |
| 6.8 | AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS | 109 |
| 6.8.1 | Teste de eficácia do conservante | 109 |
| 6.8.1.1 | Validação da metodologia através da escolha de neutralização do sistema conservante | 109 |
| 6.8.1.2 | Teste eficácia do sistema conservante | 110 |
| 6.8.2 | Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações contendo sistema conservante | 116 |
| 6.8.3 | Avaliação das características sensoriais e pH das preparações farmacêuticas | 117 |
| 7 | CONCLUSÕES | 119 |

| | |
|--------------------|-----|
| REFERÊNCIAS | 121 |
| ANEXO A | 131 |
| ANEXO B | 132 |

1 INTRODUÇÃO

Os conservantes, substâncias normalmente empregadas em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (DARBRE, 2006; CHEN et al., 2007), possuem a função de manter o produto em condições de uso, sendo necessários para a conservação dos mesmos (ORTH; KABARA, 1998; SALVAGNINI, et al., 2006).

Segundo Stevanato (2005), os conservantes são adicionados às formulações também com a função de proteger o usuário de qualquer dano à saúde, em virtude da contaminação das preparações.

Inúmeros fatores estão envolvidos na escolha do conservante ideal, sendo as principais características: um largo espectro de ação antimicrobiana, em ampla faixa de pH, distribuir-se de forma apropriada no veículo; ser compatível com os componentes da formulação, sem interferir com a cor, sabor ou fragrância do produto; ser atóxico e não irritante; além de ser de custo aceitável (PINTO; KANEKO, 2003).

1.1 A CONSERVAÇÃO EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS, COSMÉTICOS E ALIMENTÍCIOS

As contaminações microbianas de medicamentos e cosméticos podem causar alterações das suas características sensoriais, tornando-os impróprios para o uso, promovendo a degradação de componentes da formulação, podem comprometer a eficácia e segurança ou ainda causar danos à saúde dependendo do tipo do microrganismo presente, da via de administração utilizada e do estado de saúde do usuário (BAIRD; BLOOMFIELD, 1996; PINTO; KANEKO, 2003).

Em relação a contaminação de alimentos, quando a conservação falha, as consequências variam de um perigo extremo, se houver por exemplo, microrganismos toxicogênicos que não são controlados, até aos relativamente triviais, como perda de cor e sabor dos alimentos (GOULD, 2000).

Ainda hoje as substâncias com atividades antimicrobianas mais utilizadas em preparações cosméticas, farmacêuticas e alimentícias são os ésteres de parabenos, derivados fenólicos, álcoois, sais e ácidos orgânicos, compostos de isotiazolinona, doadores de formaldeído, compostos bromonitrados, agentes quelantes (DECKER Jr, 1985; BRANNAN, 1997; PINTO; KANEKO, 2003)., SIQUEIRA, 2005).

Embora existam hoje inúmeros conservantes que possam ser utilizados, ainda não existem conservantes que sejam eficazes em sua totalidade, uma vez que alguns por exemplo possuem amplo espectro de ação, porém em faixa de pH limitado, outros são ativos em ampla faixa de pH, porém com deficiências frente à alguns microrganismos, outros que por suas características organolépticas indesejáveis dificultam seu uso em determinadas matrizes (Tabela 1).

Além das deficiências já demonstradas, a preocupação maior em relação ao uso desses compostos se faz devido aos possíveis danos à saúde causados por eles.

Embora sejam ainda um dos antimicrobianos mais utilizados em diversos produtos, os parabenos (principalmente metil e propilparabenos, Nipagin® e Nipazol®, respectivamente), por exemplo, possuem propriedade estrogênica (DARBRE; HARVEY, 2008; BARR et al., 2012), e sabe-se que tal propriedade está ligada ao desenvolvimento, crescimento e progressão de câncer de mama (MILLER, 1996; BARR et al., 2012).

Pesquisas sugerem que baixos níveis de absorção de parabenos a partir de produtos aplicados na região das mamas ao longo do tempo pode ter contribuição no desenvolvimento do câncer de mama (DARBRE et al., 2004; BARR et al., 2012).

Outros estudos têm comprovado que os parabenos são absorvidos sistematicamente em humanos, uma vez que estes compostos foram quantificados no sangue após 1 hora de aplicação dérmica (JANJUA et al., 2007). Várias pesquisas realizadas nos Estados Unidos da América, evidenciaram a presença de parabenos em altos níveis em urina e outros estudos apontaram a presença de parabenos em leite humano (BARR et al., 2012).

Estudos relataram ainda, a presença de parabenos em sêmem humano (FREDERIKSEN.; JORGENSEN.; ANDERSSON, 2010; MEEKER et al., 2011; BARR et al., 2012), o que levantou a hipótese de os parabenos estarem envolvidos em possíveis danos no DNA dos espermatozoides, influenciando negativamente na reprodução masculina (MEEKER et al., 2011; BARR et al., 2012). Tal influência já havia sido antes reportada por outros autores, evidenciando a toxicidade destes na reprodução de modelos animais (BARR et al., 2012).

Relatos recentes indicam que a exposição aos parabenos interfere no sistema endócrino, causando sérias consequências para a saúde humana e animal (TAVARES et al., 2009).

Trabalhos recentes demonstram que foram encontrados resíduos de outros conservantes, como os triclosanos em bile de peixe, o que indica que estes compostos estão presentes no ambiente aquático (HOUTMAN et al., 2004; CHEN et al., 2007). Além disso, estes conservantes também têm produzido desordens na reprodução masculina em modelos animais (OISHI, 2002; CHEN et al., 2007).

Portanto, o uso de compostos químicos sintéticos para controle de contaminação microbiana em alimentos, medicamentos e cosméticos têm sido restrito devido a efeitos prejudiciais à saúde como carcinogenicidade, teratogenicidade, alta toxicidade aguda residual, além de poluição ambiental (UNNIKRISHNAN; NATH 2002). Isso somado a contínua emergência de microrganismos resistentes aos conservantes convencionais tem se tornado um grande problema nos últimos anos, o que tem aumentado ainda mais a busca por sistemas alternativos (SHELDON, 2005; PATRONE et al., 2010).

Na busca por alternativas a esses produtos, uma nova opção para a eliminação ou inibição microbiana têm sido os óleos essenciais (PATTNAIK, 1997; ÇETIN et al., 2010), tornando as plantas aromáticas agentes efetivos na conservação de produtos susceptíveis à contaminação microbiana (SIVROPOULOU et al., 1996; SOUZA et al., 2007; ÇETIN et al., 2010).

Tabela 1- Principais conservantes comerciais utilizados em sistemas farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, e seus espectro de ação antimicrobiana, faixa de pH funcional e deficiências (COSMÉTICOS & PERFUMES, 2014; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

| Conservante | Faixa pH funcional | Espectro de ação | Deficiência |
|---|---|-------------------------------|--|
| Ácido sórbico e derivados (sorbato de potássio e cálcio) | meio ácido, pH < 6,5 | Fungos e leveduras | Pouca ou nenhuma atividade frente às bactérias, não pode ser utilizado em produtos fermentados, pois inibe a ação de leveduras |
| Ácido benzóico e seus sais (benzoato de sódio) | meio ácido pH < 4,2 | Bactérias e fungos | Ativo contra <i>Lactobacillus</i> , o que impede sua utilização em iogurtes, por exemplo; impacto sensorial negativo, possíveis efeitos clastogênicos e teratogênicos |
| Ácido propiônico e seus sais (propionato de sódio e cálcio) | pH baixo | Fungos | Pouca efetividade frente à bactérias, nenhuma ação frente à leveduras |
| Dióxido de enxofre e derivados (sulfito de sódio, sulfito de potássio, bissulfito de potássio, bissulfito de sódio e metabissulfito de potássio e de sódio) | pH baixo | Fungos, leveduras e bactérias | O dióxido de enxofre inativa a vitamina B1, portanto, não pode ser usado em alimentos considerados fontes de tiamina; o SO ₂ conserva a coloração natural da carne, podendo mascarar estágios de deterioração |
| Ácido p-hidroxibenzoico e seus ésteres (parabenos) | pH 3 a 8, sendo mais ativos em pH baixo | Fungos, leveduras e bactérias | Gosto desagradável; Geralmente são mais ativos contra fungos e leveduras do que bactérias e mais ativos contra Gram positivos que Gram negativos |
| Formaldeído | pH 3 a 9 | Bactérias e fungos | Altamente volátil; forte odor; ação sensibilizante e irritante da pele |
| DMDM Hidantoina | pH 3 a 9 | Bactérias | Fraco contra fungos |
| Imidazolidil uréia | pH 2 a 9 | Bactérias | Não tem ação contra fungos |
| Metilisotiazolinona | pH < 8 | Bactérias | Fraco contra fungos |
| Benzisotiazolinona (BIT) | pH < 8 | Bactérias | Mais ativo contra as bactérias Gram positivas; sensibilizante da pele quando usado em altos níveis |
| Cloreto de benzalcônio | pH > 6 | Bactérias | Atuação fraca em <i>Pseudomonas</i> e fungos |

1.2 OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, originados do metabolismo secundário das plantas (SIMÕES; SPITZER, 1999). São sintetizados por todos os órgãos das plantas, brotos, flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes, cascas, e são estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

São constituídos principalmente de monoterpenos, triterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras micromoléculas (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1992; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Podem ser extraídos por diversas técnicas, como hidrodestilação, extração por solventes, pressão, fluido supercrítico (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Tais óleos por serem produzidos como resposta de defesa das plantas, são considerados promissoras fontes de compostos biologicamente ativos. A eles são atribuídas diversas atividades biológicas como analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, entre outras (ALMEIDA et al., 2006; ARRUDA et al., 2006; NUNES et al., 2006; BENKEBLIA, 2004; REHDER et al., 2004; CLAFFEY, 2003; SEYMOUR, 2003; ARWEILER et al., 2000; FINE et al., 2000; PAN et al., 2000).

Um grande número de trabalhos realizados com diferentes famílias de plantas (Apiaceae, Asteraceae, Boraginácea, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae, Rosaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae) bem como diversas espécies (*Achillea clavennae*, *Aloysia* sp., *Anthemis nobilis*, *Cordia verbenaceae*, *Croton sonderianus*, *Curcuma longa*, *Cymbopogon* sp., *Cyperus articulatus*, *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare*, *Lippia* sp., *Mentha* sp., *Mikania glomerata*, *Nepeta cataria*, *Origanum* sp., *Pelargonium graveolens*, *Rosa damascena*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum*, entre outras) mencionam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Os principais e mais comuns compostos presentes nesses óleos essenciais são cânfora, limoneno, geranial, geraniol, neral, nerol, cariofileno, eugenol, linalol, timol e carvacrol (Tabela 2).

Grande parte da ação antimicrobiana dos óleos essenciais é devido a presença de terpenóides oxigenados (BURT, 2004; DELAQUIS et al., 2002; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

A atividade antimicrobiana dos terpenóides está ligada ao seu grupo funcional, e, sabe-se que a hidroxila do grupo fenólico e a presença de elétrons desparelhados são importantes para a atividade antimicrobiana (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

A propriedade antibacteriana dos óleos essenciais e seus componentes é explorada em diversos produtos como dentifrícios, antisépticos, além de suplementos alimentares, porém como conservantes ainda existem poucos comercializados, podendo-se citar DMC Base Natural® (produzido pela DOMCA S.A., Espanha, constituído de 50% de óleo essencial de alecrim, salvia, citrus e 50% de glicerol) (MENDOZA-YEPES et al., 1997; BURT, 2004). Existem ainda mais dois produtos, PROTECTA ONE®, e PROTECTA TWO® (Bavaria Corp., EUA), compostos de extratos vegetais, contendo um ou mais óleos essenciais, dispersados em soluções de citrato de sódio e cloridrato de sódio, respectivamente (CUTTER, 2000; BURT, 2004).

O interesse pelo uso de óleos essenciais tem aumentado também quanto ao seu uso como ingrediente ativo em embalagens. Estudos recentes viabilizaram o uso de óleo essencial de *Thymus capitatus* como agente ativo em embalagens, conferindo-as significativa ação antimicrobiana (EHIVET et al., 2011).

Óleos essenciais, assim como seus compostos como o carvacrol também tem sido incorporados à filmes, para conservação de produtos frescos como frutas (ROJAS-GRAU, et al., 2007).

Como descrito anteriormente, os óleos essenciais e seus produtos vegetais têm atraído considerável atenção para a conservação de produtos, sendo considerados apropriados como conservantes (VALERO; GINER, 2006; PAHOJI et al., 2011b).

Alguns constituintes dos óleos essenciais tem sido aceitos pela comissão europeia para serem utilizados em produtos alimentícios por exemplo, como linalol, timol, eugenol, carvona, cinamaldeído, vanilina, carvacrol, citral e limoneno, sendo todos esses considerados seguros por não apresentarem riscos para a saúde do consumidor (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os óleos essenciais já classificados pelo FDA (Food and Drug Administration) como seguros incluem orégano, timo, mostarda, entre outros (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Apesar dos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais, altas concentrações são necessárias para alcançar resultados satisfatórios em matrizes e isso pode alterar as características organolépticas de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (PAHOJI et al., 2011b).

Neste contexto, muitos trabalhos têm sido realizados para reduzir a concentração de óleos essenciais, através da utilização de outros agentes antimicrobianos ou conservantes, que possam interagir em um processo de sinergia (PAHOJI et al., 2011b).

Tabela 2- Levantamento de trabalhos publicados com espécies produtoras de óleos essenciais com atividade antimicrobiana

| Espécie | Família | Principais constituintes dos óleos essenciais | Atividade antimicrobiana | Referências |
|------------------------------|----------------|---|--|--|
| <i>Achillea clavennae</i> | Asteraceae | cânfora | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SKOCIBUSIC et al., 2004 |
| <i>Aloysia gratissima</i> | Verbenaceae | β - pineno trans-pinocanfona | <i>Staphylococcus aureus</i> | FRANCO et al., 2007 |
| <i>Aloysia triphylla</i> | Verbenaceae | DL- limoneno geranial nerol | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Aloysia triphylla</i> | Verbenaceae | geranial neral limoneno | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> | SARTORATTO et al., 2004 ; DUARTE et al., 2005 |
| <i>Anthemis nobilis</i> | Asteraceae | 1,8- cineol trans-geraniol γ - muuroleno | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Cordia verbenaceae</i> | Boraginacea | trans-cariofileno α -pineno | <i>Candida albicans</i> | CARVALHO Jr et al., 2004 |
| <i>Croton sonderianus</i> | Euphorbiaceae | β - felandreno trans- β -guaieno | <i>Staphylococcus aureus</i> | BERTINI et al., 2005 |
| <i>Croton sonderianus</i> | Euphorbiaceae | ϵ - cariofileno cis- β - guaieno | <i>Staphylococcus aureus</i> | BERTINI et al., 2005 |
| <i>Curcuma longa</i> | Zingizerabeae | turmerona γ -z-atlantona | <i>Staphylococcus aureus</i> | FRANCO et al., 2007 |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Poaceae | neral geranial | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> | BERTINI et al., 2005 |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Poaceae | neural geranial | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> | PEREIRA et al., 2008 |
| <i>Cymbopogon martinii</i> | Poaceae | trans-geraniol geranil acetato | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Cyperus articulatus</i> | Cyperaceae | trans-pinocarveol verbenona | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Eugenia caryophyllata</i> | Myrtaceae | eugenol β - cariofileno | <i>Penicillium digitatum</i> | YAHYAZADEH et al., 2008 |
| <i>Foeniculum vulgare</i> | Apiaceae | limoneno (E)- anetol | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ÇETIN et al., 2010 |

| Espécie | Família | Principais constituintes dos óleos essenciais | Atividade antimicrobiana | Referências |
|--------------------------------|----------------|--|---|-------------------------|
| <i>Lippia alba</i> | Verbenaceae | linalol | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Lippia origanoides</i> | Verbenaceae | timol carvacrol | <i>Candida sp</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Trichophyllum rubrum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus mutans</i> | OLIVEIRA et al., 2007 |
| <i>Lippia sidoides</i> | Verbenaceae | timol carvacrol | <i>Candida albicans</i> | BOTELHO et al., 2007 |
| <i>Lippia sidoides</i> | Verbenaceae | timol | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> | BERTINI et al., 2005 |
| <i>Lippia sidoides</i> | Verbenaceae | p-cimeno timol e- cariofileno | <i>Candida albicans</i> | FONTENELLE et al., 2007 |
| <i>Mentha arvensis</i> | Lamiaceae | mentol p- mentona | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Mentha piperita</i> | Lamiaceae | linalol carvona | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Mentha piperita</i> | Lamiaceae | linalol carvona | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> | SARTORATTO et al., 2004 |
| <i>Mentha piperita</i> | Lamiaceae | mentona mentol | <i>Staphylococcus aureus</i> | ARIDOGAN et al., 2002 |
| <i>Mikania glomerata</i> | Asteraceae | trans-cariofileno biciclogermacreno germacreno | <i>Candida albicans</i> | DUARTE et al., 2005 |
| <i>Nepeta cataria</i> | Lamiaceae | α-pineno β-nepetalactona α-nepetalactona | <i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Candida sp.</i> | ZOMORODIAN et al., 2013 |
| <i>Origanum basilicum L.</i> | Lamiaceae | linalol eugenol | <i>Staphylococcus aureus</i> | SARTORATTO et al., 2004 |
| <i>Origanum gratissimum L.</i> | Lamiaceae | eugenol | <i>Staphylococcus aureus</i> | SARTORATTO et al., 2004 |
| <i>Origanum onites</i> | Lamiaceae | carvacrol | <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ARIDOGAN et al., 2002 |
| <i>Pelargonium graveolens</i> | Geraniaceae | citronelol geraniol | <i>Bacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> | HSOUNA; HAMDI, 2012 |

| Espécie | Família | Principais constituintes dos óleos essenciais | Atividade antimicrobiana | Referências |
|----------------------------|----------------|--|---|--------------------------|
| <i>Rosa damascena</i> | Rosaceae | citronelol geraniol nerol | <i>Staphylococcus aureus</i> | ARIDOGAN et al., 2002 |
| <i>Salvia officinalis</i> | Lamiaceae | 1,8-cineol cânfora | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> | ABU-DARWISH et al., 2013 |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Myrtaceae | eugeniol | <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> | PEREIRA et al., 2008 |

1.3 SINERGISMO NA BUSCA POR SISTEMAS CONSERVANTES MAIS EFETIVOS

O intenso aroma dos óleos essenciais, mesmo em baixas concentrações, podem causar efeitos organolépticos indesejáveis e, além disso, de modo geral é necessário utilizar elevadas concentrações dos mesmos para compensar suas interações com os demais constituintes dos produtos para que os mesmos sejam ativos. (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Assim, algumas estratégias podem ser necessárias para tornar viável a utilização dos óleos essenciais em produtos a serem consumidos e utilizados por seres humanos, uma delas é a diminuição da concentração do óleo, desde que isso não comprometa a ação antimicrobiana. De modo geral, atualmente o que se tem realizado é a combinação dos óleos com outros compostos antimicrobianos, promovendo um efeito sinérgico (NGUEFACK et al., 2012; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Sinergismos podem ser a chave para a utilização de óleos essenciais, por exemplo, em alimentos sem afetar as características organolépticas (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Já existem muitos relatos na literatura de combinações de óleos essenciais com compostos antimicrobianos, como digluconato de clorexidina, cetoconazol e anfotericina B (FENG; ZENG, 2006).

Além disso, existem ainda relatos de efeito sinérgico entre óleos essenciais, como foi observado com a combinação de óleo essencial de *Ocimum basilicum* e *O. sanctum* frente a várias bactérias Gram positivas e negativas, além de fungos (SINHA; GULATI, 1990; LACHOWICZ et al., 1998).

Combinações de óleos essenciais com outros agentes antimicrobianos, de finalidade conservante também têm sido utilizadas. Em estudo realizado por Pajohi et al. (2011), a ação sinérgica de óleo essencial de sementes de *Cuminum cyminum* com o conservante Nisina®, além de aumentar a ação antimicrobiana, possibilitou a redução dos dois agentes, minimizando possíveis efeitos indesejáveis .

A combinação de óleo essencial de *Mentha longifolia* também com o conservante Nisina®, possibilitou a redução do óleo para a prevenção de crescimento bacteriano, reduzindo também os efeitos indesejáveis nas características organolépticas (PAHOJI et al., 2011b).

Em trabalho realizado por Patrone et al. (2010) interações sinérgicas foram observadas quando 0,15 % de metilparabeno (Nipagin®) foi combinado com óleo essencial de eucalipto e menta contra *P. aeruginosa* , com redução de 50% da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do conservante quando ensaiado sozinho.

Compostos fenólicos, como metilparabenos, apresentam fraca inibição frente a alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mas possuem propriedades antimicrobianas sinérgicas quando em combinação com óleo essencial de erva-doce frente a estes (HODGSON; STEWART; FYFE, 1998; FYFE; ARMSTRONG; STEWART, 1998).

As combinações entre óleos essenciais e conservantes comerciais são promissoras por aumentarem o espectro de ação dos mesmos, considerando que nenhum conservante usado de forma isolada é completamente efetivo frente a todos os microrganismos (FYFE; ARMSTRONG; STEWART, 1998). Além disso, essas combinações possibilitam a diminuição da concentração necessária dos conservantes (PATRONE et al., 2010).

Além disso, o próprio sinergismo entre os constituintes dos óleos essenciais, podem levar á efeitos sinérgicos. Alguns estudos têm demonstrado que o óleo essencial como um todo tem uma maior atividade antibacteriana que a mistura dos seus constituintes majoritários, sugerindo que os componentes minoritários são críticos para a atividade sinérgica (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

A interação entre os componentes dos óleos essenciais podem produzir quatro possíveis tipos de efeitos: indiferente, aditivo, antagônico ou sinérgico (BURT, 2004; DELGADO et al., 2004; PEI et al., 2009; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinatório é igual a soma dos efeitos individuais. O antagonismo é quando o efeito de um ou ambos os compostos é menor quando estes são aplicados juntos que quando aplicados individualmente. Sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior que a soma dos efeitos individuais (BURT, 2004), enquanto que a ausência de interações é definida como indiferente (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

É crescente a preocupação da população mundial em fazer uso de produtos naturais, menos agressivos a saúde e com menor efeito colateral. Na atualidade alimentos, medicamentos e cosméticos são conservados utilizando-se substâncias sintéticas principalmente as pertencentes à classe dos parabenos, (BRANNA, 2008). Todavia, além de já existirem hoje microrganismos resistentes a esses compostos, alguns estudos indicam ainda que tais substâncias têm causado numerosos problemas de saúde relacionados a alergias, intoxicações além de desenvolvimento de tumores. Uma das alternativas viáveis para a substituição destes produtos é a utilização de homólogos de origem natural, como os óleos essenciais, (MACCIONI et al., 2002; SEO et al., 2002; NOSTRO et al., 2004), que poderiam apresentar menor toxicidade, com menor probabilidade de resistência microbiana, por ser composto por diversos compostos químicos, o que dificultaria os mecanismos de resistência.

Diante disso, a bioprospecção de espécies aromáticas produtoras de óleos essenciais, ainda não investigadas, poderá contribuir para a viabilização de um produto eficaz na inativação de microrganismos sem, no entanto, causar danos à saúde, contribuindo para que medicamentos, alimentos e cosméticos possam ser conservados sem comprometer a segurança destes produtos. Todas estas considerações justificam a realização deste trabalho.

3 HIPÓTESE

Os óleos essenciais extraídos de espécies de plantas endêmicas do Cerrado são uma alternativa viável para substituir ou diminuir a concentração de conservantes químicos sintéticos utilizados em produtos farmacêuticos e alimentício.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade conservante de óleos essenciais e sua viabilidade como conservante em alimento e preparações farmacêuticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar espécies vegetais das famílias Anacardeaceae, Lamiaceae e Verbenaceae;
- Extrair os óleos essenciais e determinar o rendimento;
- Avaliar a os constituintes majoritários dos óleos essenciais extraídos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais;
- Avaliar a ação antimicrobiana do efeito sinérgico entre os óleos essenciais mais ativos e outros compostos;
- Analisar a composição química do óleo essencial escolhido;
- Avaliar a toxicidade do antimicrobiano por meio das atividades de toxicidade aguda (DL_{50}), citotóxica, alergênica e mutagênica;
- Verificar a atividade antimicrobiana e a eficácia do sistema conservante desenvolvido em suco de laranja e preparações farmacêuticas;
- Analisar as características sensoriais e pH de suco de laranja e preparações farmacêuticas contendo o sistema conservante desenvolvido.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As plantas listadas na tabela 3 foram coletadas em várias regiões do Cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Figura 1). A partir dos indivíduos férteis foram confeccionadas exsiccatas, as quais foram identificadas por Cordeiro, R. (*Salvia* sp.), Pirani, J.R. (*Schinus* sp.), Kameyama, C. (*Hyptis* sp.) (Botânicos do Instituto de Botânica de São Paulo) e Salimena, F.R.G. (*Lippia* sp.) (Universidade Federal de Juiz de Fora) e posteriormente depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HPM - UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

O indivíduo identificado por TI 136 trata-se da associação de indivíduos de *Lippia origanoides*, produtores de carvacrol (TI 11, 14, 15, 21, 30, 42, 49, 54, 55, 60, 65 e 66).

Figura 1- Coleta das plantas medicinais em regiões do Cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul



Fonte: Autora.

Tabela 3- Relação de espécies coletadas para extração de óleos essenciais.

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|
| Chorão bonito (verão) | 1696 | <i>Schinus weinmannifolius</i> Engl. | Anacardeaceae | Bonito/MS |
| Chorão bonito (inverno) | 1696 | <i>Schinus weinmannifolius</i> Engl. | Anacardeaceae | Bonito/MS |
| Lupulina Pratinha | 1705 | <i>Lippia lupulina</i> Cham. | Verbenaceae | Pratinha/MG |
| Alfazema de árvore | 1588 | <i>Hyptis cana</i> Pohl. ex Benth. | Lamiaceae | Catalão/GO |
| Lupulina Argenita | 1981 | <i>Lippia lupulina</i> | Verbenaceae | Argenita/MG |
| Microphylla Argenita | 1993 | <i>Lippia microphylla</i> | Verbenaceae | Argenita/MG |
| Hyptis cariri | 1976 | <i>Hyptis carponifolia</i> Benth. | Lamiaceae | Ribeirão Preto/SP |
| Varas 4 | 2111 | <i>Lippia velutina</i> Schauer | Verbenaceae | Ribeirão Preto/SP |
| Alba 204 | 2104 | <i>Lippia alba</i> (Mill.) | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Alba 205 | 2105 | <i>Lippia alba</i> (Mill.) | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 5 | 2000 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 6 | 2001 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 7 | 2002 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 8 | 2116 | <i>Lippia grata</i> Schauer | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 10 | 2132 | <i>Lippia velutina</i> Schauer | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 11 | 2003 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 14 | 2004 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 15 | 2005 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 16 | 2006 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 17 | 2097 | <i>Lippia grata</i> Schauer | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 19 | 2077 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|
| Lippia TI 20 | 2008 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 21 | 2009 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 22 | 2010 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 23 | 2011 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 25 | 2012 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 28 | 2098 | <i>Lippia grata</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 29 | 2115 | <i>Lippia grata</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 30 | 2013 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 31 | 2014 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 32 | 2015 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 33 | 2016 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 36 | 2078 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 38 | 2079 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 40 | 2017 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 41 | 2018 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 42 | 2124 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 44 | 2019 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 45 | 2020 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 47 | 2021 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 48 | 2022 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 49 | 2023 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 51 | 2024 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 52 | 2025 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|---|----------------|---------------------|
| Lippia TI 54 | 2026 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 55 | - | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 56 | 2080 | <i>Lippia origanoides X Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 59 | 2096 | <i>Lippia velutina</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 60 | 2027 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 61 | 2099 | <i>Lippia grata</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 62 | 2028 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 63 | 2095 | <i>Lippia velutina</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 64 | 2100 | <i>Lippia grata</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 65 | 2029 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 66 | 2030 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 68a | 2031 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 69a | 2081 | <i>Lippia origanoides X Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 70 | 2032 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 71 | 2033 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 72 | 2082 | <i>Lippia origanoides X Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 73 | 2034 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 75 | 2035 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 77 | 2036 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 78 | 2037 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 79 | 2038 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 81 | 2083 | <i>Lippia origanoides X Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 82 | 2039 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|
| Lippia TI 83 | 2040 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 84 | 2041 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 85 | 2042 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 86 | 2084 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 87 | 2085 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 88 | 2043 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 89 | 2044 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 90 | 2045 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 91 | 2046 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 93 | 2047 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 94 | 2048 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 95 | 2086 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 96 | 2094 | <i>Lippia velutina</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 97 | 2087 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 98 | 2049 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 99 | 2050 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 100 | 2051 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 101 | 2052 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 103 | 2125 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 104 | 2088 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 105 | 2053 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 106 | 2089 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 107 | 2093 | <i>Lippia velutina</i> Schauer. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|
| Lippia TI 108 | 2054 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 109 | 2090 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 110 | 2055 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 111 | 2056 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 112 | 2057 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 113 | 2121 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 114 | 2058 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 115 | 2059 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 116 | 2060 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 117 | 2061 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 118 | 2062 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 119 | 2063 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 120 | 2064 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 121 | 2065 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 122 | 2066 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 123 | 2067 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 124 | 2120 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 125 | 2068 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 126 | 2069 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 127 | 2070 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 128 | 2071 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 129 | 2072 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 130 | 2073 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

| Código Material Vegetal | Número Voucher | Identificação Espécie | Família | Local Coleta |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|
| Lippia TI 131 | 2075 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 132 | 2074 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 133 | 2076 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 134 | 2091 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 135 | 2092 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>Lippia velutina</i> | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |
| Lippia TI 136 | s/n | <i>Lippia origanoides</i> Kunth. | Verbenaceae | Jardinópolis/SP |

(s/n) sem número (*) associação dos indivíduos de *Lippia origanoides* produtores de carvacrol (TI 11, 14, 15, 21, 30, 42, 49, 54, 55, 60, 65 e 66)

5.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

A extração dos óleos essenciais das espécies alvo deste estudo foi realizada a partir de materiais desidratados em estufa de ar circulante a 40°C por 48 horas. A hidrodestilação das folhas foi realizada em aparelho Clevenger, numa proporção 1:5 (massa do material vegetal: volume de água). O tempo de extração foi de 120 minutos e foram realizadas em triplicata. Após obtenção do hidrolato (mistura de água + óleo) o material foi dessecado com Na₂SO₄ (sulfato de sódio anidro) para a completa retirada de água e armazenado em frascos vedados com parafilme e mantidas em freezer até a realização dos ensaios.

O teor percentual de óleo nas folhas foi calculado pela equação (1):

$$\frac{\text{massa do óleo (g)}}{\text{massa seca folhas (g)}} \times 100 \quad (1)$$

A análise qualitativa dos óleos foi realizada por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); Injetor: 240 °C; Detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL.min⁻¹; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60 °C – 240 °C, 3°C/minuto. Volume de Injeção: 1 µL de solução (1 µL óleo essencial/1 mL Hexano).

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (ADAMS, 1995).

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

5.3.1 Obtenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados nos ensaios (Tabela 4) foram obtidos da coleção de culturas da Fundação André Tosello.

Tabela 4- Microrganismos utilizados nos ensaios obtidos da Fundação André Tosello.

| Microrganismos | ATCC |
|---------------------------------|-------------|
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 6633 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 8739 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 4352 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 7664 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | ATCC 13076 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |

5.3.2 Estoque das linhagens microbianas

5.3.2.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas liofilizadas foram cultivadas em meio BHI (Brain Infusion Heart- Himedia®) líquido por 24 horas, a 35°C. Em seguida alíquota de 100 µL foi transferida para placa de Petri contendo Ágar BHI (Himedia®). Após incubação de 24 horas, uma colônia isolada foi transferida para meio BHI líquido, e incubada por mais 24 horas. Em seguida 800 µL dessa cultura foram transferidas para tubos contendo 200 µL de glicerol 70%. Os estoques foram então armazenados a - 80°C.

5.3.2.2 Linhagem de levedura

A linhagem de *C. albicans* liofilizada foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose líquido (Himedia®) por 24 horas, a 35°C. Uma alíquota de 100 µL foi transferida para placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia®). Após incubação de 24 horas, uma colônia isolada foi transferida para meio Sabouraud Dextrose líquido, e incubada por mais 24 horas. O volume de 800 µL dessa cultura foi transferido para tubos contendo 200 µL de glicerol 70%. Os estoques foram então armazenados a - 80°C.

5.3.2.3 Linhagem de fungo filamentoso

A linhagem de *A. brasiliensis* liofilizada foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose líquido (Himedia®) por 48 horas, a 35°C. Em seguida uma alíquota de 100 µL foi transferida para placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA, Himedia®). Após incubação de 48 horas, o meio de cultura com o crescimento fúngico foi cortado em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm e transferidos para tubos contendo 1 mL de água estéril. Os estoques foram então armazenados a 4°C.

5.3.3 Manutenção e preparo das linhagens microbianas

5.3.3.1 Linhagens bacterianas

Anteriormente à utilização nos ensaios, as linhagens de bactérias foram cultivadas em meio ágar BHI, por 24 horas, a 35°C.

5.3.3.2 Linhagem de *C. albicans*

A linhagem de *C. albicans* foi previamente cultivada em meio ágar Sabouraud Dextrose, por 24 horas a 35°C

5.3.3.3 Linhagem de *A. brasiliensis*

Para os ensaios com *A. brasiliensis*, a linhagem foi previamente cultivada em meio BDA, por 5 dias, a 35°C.

5.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram ensaiados em concentrações iniciais de 50 µL.mL⁻¹ (*Schinus weinmannifolius*) e 10 µL.mL⁻¹ para os demais. Os ensaios foram conduzidos sem adição de solventes. Como controles foram utilizados metilparabeno (Nipagin®) (0,6%, dissolvido em etanol), sulfato de Gentamicina (Ourofino®) (50 µg.mL⁻¹) e Anfotericina B (Sigma- Aldrich®) (32 µg.mL⁻¹).

A atividade antimicrobiana foi determinada através do teste da microdiluição em placas contendo 96 poços, segundo as normas do CLSI M7-A9 (2012) (bactérias), M27-A3 (2008) (levedura) e M38-A2 (2008) (fungo filamentoso).

A leitura foi realizada visualmente, após período de incubação de 20 horas (bactérias), 24 horas (*C. albicans*) e 48 horas (*A. brasiliensis*) a 35°C. A CIM foi determinada como sendo a menor concentração do óleo essencial capaz de impedir o crescimento dos microrganismos.

5.3.5 Ensaio de sinergismo

A atividade antimicrobiana sinérgica foi determinada através de modificações do teste de tabuleiro de xadrez (SHIN; LIM, 2004). A placa de 96 poços foi preenchida da coluna 1 a 9 (A-G) com 50 µL de soluções diluídas seriadas do ativo 1, e 50 µL de diluições seriadas do ativo 2. A fileira G (1-10) foi inoculada com 100 µL de diluições do ativo 2. A coluna 12 (A-H) foi inoculada com 100 µL de diluições do ativo 1. As colunas 10 e 11 foram utilizadas como controles de meio e veículo, e inóculo, respectivamente. Cada poço foi então inoculado com 100 µL de microrganismo. As placas foram então incubadas por 24 (*C. albicans*) e 46 horas (*A. brasiliensis*), ambas a 35°C. Para avaliar os efeitos combinatórios dos óleos essenciais, adotou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) (KARPANEN et al., 2008), o qual é obtido com a seguinte equação (2):

$$\text{ICIF} = \text{CIF amostra a} + \text{CIF amostra b} \quad (2)$$

Sendo CIF = CIM amostra em combinação/CIM da amostra sozinha.

A interação foi definida como sinérgica ($\text{ICIF} \leq 0,5$), aditiva ($\text{ICIF} >0,5$ e $\leq 1,0$), indiferente ($\text{ICIF} >1,0$ e $\leq 4,0$) e antagônica ($\text{ICIF} >4,0$).

5.3.5.1 Combinações de óleos essenciais com Nipagin®

Os óleos essenciais de *L. origanoides* TI 45 (carvacrol) e TI 128 (timol) foram avaliados quanto ao efeito combinatório com o conservante comercial Nipagin®. Os óleos foram testados em concentrações iniciais de 20 e 40 µL.mL⁻¹, respectivamente, sem adição de solventes. Nipagin® foi dissolvido previamente em etanol, obtendo-se concentração inicial de 1,2%.

5.3.5.2 Combinações entre óleos essenciais

O óleo essencial de *L. origanoides* TI 45 (carvacrol) foi ensaiado em combinações com os óleos essenciais de *L. origanoides* TI 40 (endo-fenhol) e *L. origanoides* TI 128 (timol). Nos ensaios o óleo essencial de *L. origanoides* TI 45 foi ensaiado em concentração inicial de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, enquanto que os de TI 40 e TI 128 de $40 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

5.3.5.3 Combinação de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) com polissorbato 80 (Tween 80®) e Nipagin®

O óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) foi ensaiado em concentração inicial de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, dissolvido previamente em Tween 80® (1:1, v:v), e em seguida em meio de cultura. Nipagin® foi dissolvido previamente em etanol, obtendo-se concentração inicial de 1,2% (v:v).

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL_{50}) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

Para a determinação da DL_{50} foram utilizados 54 camundongos albinos com pesos entre 20 e 30 g, machos, divididos em grupos de 6 animais.

Cada grupo recebeu via oral (cânula orogástrica) doses do óleo essencial de 1000, 2000, 3000, 3300, 3600 e 4000 mg.Kg^{-1} preparadas em 1% de Tween 80® e solução salina. O Grupo controle recebeu solução salina com 1% de Tween 80® (0,4 mL). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados durante 24 horas para determinação dos parâmetros comportamentais e avaliação do número de mortes.

A DL_{50} foi determinada computando-se primeiramente a porcentagem de morte, seguido do percentual de correlação para 0% e 100% utilizando-se a seguinte fórmula (3):

$$\text{Para } 0\% \text{ de morte} = 100x (0,25/n)$$

$$\text{Para } 100\% \text{ de morte} = 100x [(n-0,25)/n], \text{ onde } n = \text{número de animais de cada grupo}$$

(3)

A porcentagem correlacionada foi então, transformada em valores de probit, através da tabela de transformação de porcentagem para probit. Em seguida, um gráfico de valores de porcentagem de morte (em probits) pelo log da dose foi plotado. A dose correspondente ao probit 5 foi relacionada como sendo a DL_{50} (TRIPATHI et al., 2006).

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

5.5.1 Linhagem celular

A linhagem celular de fibroblasto de camundongo 3T3 foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Enilza Espreafico (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto-SP).

5.5.2 Estoque e cultura de 3T3

A linhagem 3T3 foi cultivada em garrafas de cultivo de 25 cm² na concentração inicial de 3×10^4 células.mL⁻¹ em meio de cultura Dulbecco Mem (DMEM, Sigma-Aldrich®), suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab®) a 10% e solução de antibiótico estreptomicina e penicilina (10000 U) (Sigma-Aldrich®) em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ por 3 a 5 dias. Para o subcultivo (repique), o meio de cultura foi retirado, a garrafa foi lavada com solução de Hanks por 5 minutos, em seguida retirou-se a solução de Hanks e acrescentou-se 3 mL de solução de Tripsina por 1 a 2 minutos, até que as células estivessem soltas. O volume de células mais tripsina foi dividido igualmente e transferidos para duas novas garrafas de 25 cm² contendo meio de cultura fresco.

Para a obtenção do estoque da linhagem a mesma foi cultivada por 72 horas, então as células foram tripsinizadas, transferidas para um tubo cônico de 15 mL estéril e centrifugadas a 2400 rpm (rotações por minuto) por 1 minuto. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 900 µL de SFB. O soro contendo as células foi transferido para tubos criogênicos, e adicionados 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma- Aldrich®), os quais estão sendo mantidos em nitrogênio líquido.

5.5.3 Amostras

Para a realização dos ensaios o óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136) foi previamente dissolvido em Tween 80® (1:1 v:v), e em seguida em meio DMEM obtendo-se concentrações de 0,625; 0,0625; 0,00625; 0,000625 e 0,0000625 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. O ensaio foi conduzido utilizando-se Doxorubicina (10 μM ; Sigma-Aldrich®) como controle positivo, e Tween 80® como controle negativo.

5.5.4 Atividade citotóxica

Para o estabelecimento dos ensaios citotóxicos, a linhagem foi cultivada em meio DMEM em estufa a 37° C, contendo 5% de CO₂, até atingir confluência de mais de 80%. Em seguida, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 1 minuto, e ressuspensas em meio de cultivo. Realizou-se a contagem de células em hematímetro, obtendo-se concentrações de 5×10^4 células. mL^{-1} . O volume de 100 μL foi transferido para placa de 96 poços, a qual foi então incubada por 24 horas em estufa a 37° C, contendo 5% de CO₂ para aderência das células. Decorridas as 24 horas, adicionou-se as amostras nas diferentes concentrações. A placa foi incubada por mais 48 horas.

Após este período, o meio contendo as substâncias a serem avaliadas foi retirado, e em seguida adicionados 200 μL de meio novo, com subsequente adição de 20 μL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico, Sigma-Aldrich®), (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), inclusive nos poços controle. As placas foram incubadas por mais 4 horas, centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, e em seguida retirados o meio de cultivo. Para a leitura adicionou-se aos poços 200 μL de DMSO. Após 1 hora de incubação, a placa foi lida em comprimento de onda de 550 nm, em uma leitora de microplaca (TP-Reader, Thermo Plate®).

5.5.5 Análise dos resultados

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada da seguinte maneira (4):

$$\% = \left[\frac{(\text{DO controle células} - \text{DO células tratadas com as substâncias teste})}{\text{DO controle células}} \right] \times 100$$

(4)

sendo DO = Densidade Óptica.

Após cálculo da porcentagem de citotoxicidade, estimou-se o percentual de 50% de morte ($IC_{50\%}$) através de curva de interpolação, como a concentração do óleo essencial resultante da inibição de 50 % da incorporação do corante MTT, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração das substâncias ensaiadas a partir do gráfico plotado.

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DÉRMICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) EM PELE DE COELHOS ALBINOS

Para a realização dos ensaios de alergenicidade o óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136-carvacrol) foi utilizado puro e na concentração de $2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (0,1%v:v) (previamente dissolvido em água e 0,25% v:v de Tween 80®).

Foram utilizados 6 coelhos albinos com pesos entre 2 a 3 kg. Os animais foram sedados com cloridrato de cetamina 10% e xilazina (1:1) e submetidos à tricomotização na área dorsal 24 horas antes da realização dos ensaios (Figura 2a, b).

Os animais tiveram sua região dorsal dividida em quatro diferentes áreas (Figura 2c). Os quadrantes 2 e 4 sofreram ranhuras com ao auxílio de uma agulha estéril, sem, no entanto causar sangramento (Figura 2d). Anteriormente à aplicação do óleo essencial, a área foi umedecida com solução salina 0,9% (Figura 2e). O óleo essencial puro, bem como na concentração de $2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ foi aplicado nos quadrantes 1 e 2, fazendo-se movimentos circulares para dispersão do óleo (Figura 2f, g). Os quadrantes 2 e 4 serviram como controles das áreas com e sem ranhura. Posteriormente, as áreas de aplicação foram cobertas com gaze fixada durante 24 horas (Figura 2h) (BRASIL, 2002; CHORILLI et al., 2009). Foram realizadas leituras após 24 e 72 horas, verificando a formação de eritema e/ou edema sobre as áreas sadias e abrasadas, seguindo a escala de Draize et al. (1944). Seguem tabelas as quais são referências para determinação do índice de irritação cutânea (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5- Graduação do Eritema segundo o tipo de pele e características.

| Grau | Tipo | Característica |
|-------------|------------------|--|
| 0 | Pele normal | Geralmente de cor branca, podendo apresentar-se rósea |
| 1 | Eritema leve | A pele apresenta-se levemente avermelhada, em toda área teste |
| 2 | Eritema moderado | A pele apresenta-se avermelhada, em toda área teste |
| 3 | Eritema definido | A pele apresenta-se com vermelhidão intensa e difusa em toda área teste |
| 4 | Eritema severo | A pele apresenta-se vermelho escura, com leve formação de escaras (injúrias em profundidade) |

Fonte: BRASIL, 2002.

Tabela 6- Graduação do Edema segundo o tipo e características.

| Grau | Tipo | Característica |
|-------------|----------------|--|
| 0 | Nenhum edema | O valor do edema é igual a 0 |
| 1 | Edema leve | O valor do edema deve estar compreendido entre 0,25 mm e 0,49mm |
| 2 | Edema moderado | O valor do edema deve estar compreendido entre 0,5 mm e 0,74mm |
| 3 | Edema definido | O valor do edema deve estar compreendido entre 0,75 mm e 1mm |
| 4 | Edema severo | A pele apresenta-se vermelho escura, com leve formação de escaras (injúrias em profundidade) |

Fonte: BRASIL, 2002.

O cálculo do índice de irritação cutânea primária foi obtido através da média aritmética das seguintes observações : edema na pele íntegra 24 horas, edema na pele com ranhura 24 horas, eritema na pele íntegra 24 horas, eritema na pele com ranhura 24 horas, edema na pele íntegra 72 horas, edema na pele com ranhura 72 horas, eritema na pele íntegra 72 horas, eritema na pele com ranhura 72 horas. Após o somatório dessas oito médias aritméticas com subsequente divisão por 4, obtém-se o índice de irritação cutânea primário.

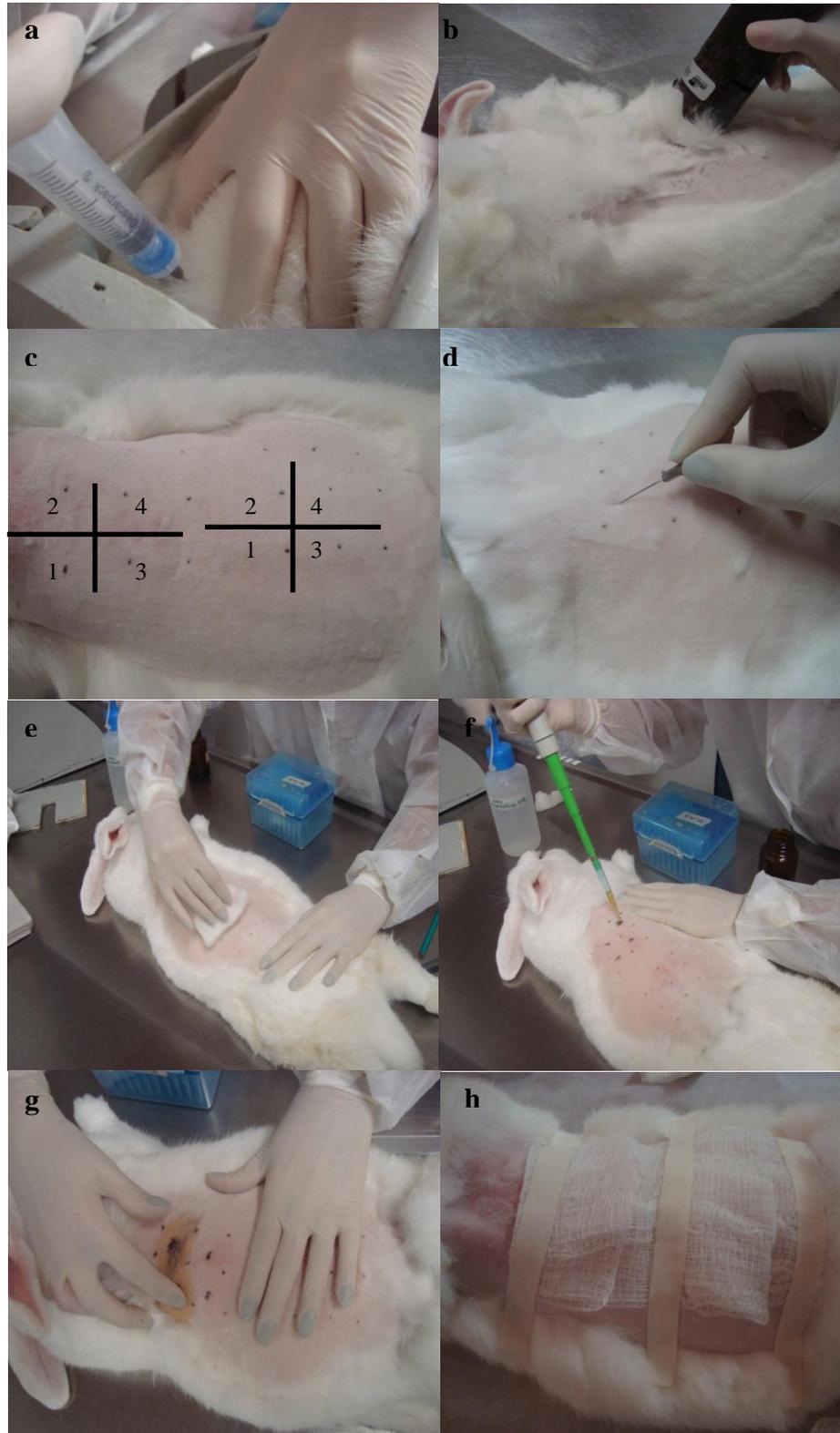
Utilizaram-se os parâmetros mostrados na tabela 7 para avaliação do índice de irritação cutânea para produtos que não alteram a cor da pele. Assim, o óleo essencial foi classificado de acordo com o índice de irritação cutânea primária (BRASIL, 2002).

Tabela 7- Classificação da irritação cutânea, segundo o valor do índice.

| Valor do Índice | Classificação |
|------------------------|-------------------------|
| 0- 0,9 | Não irritante |
| 1,0- 1,9 | Ligeiramente irritante |
| 2,0- 4,9 | Moderadamente irritante |
| 5,0 -8 | Severamente irritante |

Fonte: BRASIL, 2002.

Figura 2- Sequência do ensaio irritação dérmica do óleo essencial de *Lippia origanoides* T1136-carvacrol a) sedação, b) tricomotização, c) divisão dos quadrantes, d) ranhuras na pele, e) umedecimento da pele, f) aplicação do óleo essencial, g) dispersão do óleo, h) área coberta com gaze



Fonte: Autora.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

A atividade mutagênica do óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) foi avaliada através do teste de Ames (MARON; AMES,1983).

5.7.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 97a e TA 100, cedidas pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara).

A linhagem TA 98 apresenta mutação no gene his D3052, o qual codifica a histidinol desidrogenase, capaz de detectar compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A TA 97a apresenta mutação no gene his D6610, sendo capaz de detectar mutagênicos do tipo *frameshift* , e ainda é alvo para mutação em resíduos GC. A TA 100 apresenta mutação no gene his G46, capaz de detectar mutagênicos que causam substituições nos pares de base, principalmente G-C (MARON; AMES, 1983).

5.7.2 Preparo de inóculos de *S. typhimurium*

Pequena quantidade de cultura estoque foram inoculadas em meio caldo Nutriente (Oxoid nº 2), e incubadas por 16 horas, a 37°C, a 160 rpm, de modo a obter densidade de 1 a 2.10^9 UFC.

5.7.3 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura, bem como as soluções utilizadas nos testes foram preparados conforme especificações de Maron e Ames (1983).

5.7.4 Mistura S9

Utilizou-se a fração microsomal homogeneizada de fígado de rato S9 (MOLTOX®, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes

indutores de enzimas, aroclor 1254). Tal fração é utilizada nos ensaios para determinar se a substância testada é mutagênica em sua forma original ou se precisa sofrer metabolização para tornar-se mutagênica.

5.7.5 Ensaio de mutagenicidade

Diferentes quantidades do óleo essencial dissolvido em DMSO (Sigma-Aldrich®), (0,025; 0,018; 0,0125; 0,00625; 0,003125 e 0,00156 µL/placa) foram adicionadas a 0,5 mL de tampão fosfato (pH 4) ou mistura S9 (quando em ensaio com ativação metabólica) e 0,1 mL de cultura bacteriana e incubados a 37 °C por 20 minutos. Decorrido este período, adicionou-se 2 mL de ágar superfície (suplementado com trações de histidina e biotina), seguido de homogeneização, sendo o material posteriormente vertido sob placas de meio mínimo glicosado (AMG). Como controle negativo utilizou-se DMSO, e positivos: 4-nitrofenilenodiamina (NPD, Sigma-Aldrich®, ensaio sem ativação metabólica) e 2-antramina (2-ANTR, Sigma-Aldrich®, ensaio com ativação metabólica).

Após solidificação do ágar, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C, quando foram então realizadas a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram conduzidos com e sem a mistura S9.

Além do número de colônias revertentes por placa calculou-se a razão de mutagenicidade (RM), dada pela fórmula $RM = \frac{\text{média número colônias revertentes placa teste}}{\text{média número colônias revertentes controle negativo}}$. Considerou-se positivo para mutagenicidade, quando $RM \geq 2$ em pelo menos uma das doses testadas, e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. A amostra foi considerada com resultado negativo, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram < 2 (SANTOS, 2006). Os dados da mutagenicidade dos extratos vegetais foram analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (Integrated Laboratory Systems®).

5.8 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM ALIMENTO

5.8.1 Microrganismo

Para a avaliação do potencial conservante do óleo essencial em suco de laranja utilizou-se o microrganismo *Alicyclobacillus acidoterrestris* CCT 4384 (DSM 2498) obtido da coleção de culturas da Fundação André Tosello.

5.8.2 Estoque e manutenção

A linhagem de *A. acidoterrestris* foi cultivada em meio Agar BAT por 5 dias a 45°C. Após o crescimento, colônias foram coletadas e transferidas para solução salina 0,9% acidificada (pH 4,0). Após homogeneização, o caldo foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos, lavado por três vezes e ressuspenso em caldo BAT e glicerol (15%), e distribuídos em criotubos e mantidos em estoque a -20°C.

5.8.3 Preparo de solução de esporos de *A. acidoterrestris*

Após cultivo da linhagem de *A. acidoterrestris* em meio Agar BAT por 5 dias a 45°C, colônias foram coletadas e transferidas para solução salina 0,9% acidificada (pH 4,0). Após homogeneização, o material foi centrifugado a 3000 g por 20 minutos, lavado por três vezes e ressuspenso em solução salina acidificada. A solução então foi submetida a um choque térmico a 80° C por 10 minutos, seguido de resfriamento a 20°C. A presença de esporos foi confirmada através de coloração por verde de malaquita. A solução foi diluída serialmente, e plaquada em meio Agar BAT para quantificação do número de esporos. A diluição contendo 1.10^6 esporos.mL⁻¹ foi escolhida para a realização dos ensaios.

5.8.4 Suco de laranja

Os ensaios foram realizados utilizando-se suco de laranja concentrado (FCOJ- Frozen Concentrated Orange Juice, 66° Brix) como matriz, gentilmente cedido pela empresa Fischer S/A- Com. Ind. e Agricultura (Citrosuco), Matão, SP, Brasil.

5.8.5 Atividade do sistema conservante em suco de laranja

O suco de laranja foi reconstituído com água, até alcançar 11,5°Brix, com o auxílio de refratômetro (Atago-N-1E®). Em seguida, distribuído em garrafas de volume útil de 250 mL contendo 100 mL do suco. O material foi então autoclavado para remoção de possíveis contaminantes.

Após processo de esterilização o suco foi adicionado de 0,125% (v:v) do sistema conservante (combinação de óleo essencial de *L. origanoides* TI 136-carvacrol mais Tween 80®), o que corresponde a concentração de 0,625 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial. Adicionou-se então 100 μL da solução de esporos contendo $1\cdot 10^6$ esporos. mL^{-1} , obtendo-se portanto, $1\cdot 10^3$ esporos. mL^{-1} de suco de laranja. Uma garrafa de suco sem adição de conservante foi utilizada como controle. As garrafas foram incubadas a 45 °C. A contagem do número de esporos viáveis foi realizada em períodos de 0, 7, 14 e 28 dias. Para a realização da contagem, alíquotas de 10 mL foram retiradas e submetidas á tratamento de choque térmico, com seguinte plaqueamento em meio BAT, com incubação a 45 °C por 72 horas. Após este período determinou-se o Log de UFC. mL^{-1} .

5.8.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de suco de laranja contendo sistema conservante

5.8.6.1 Determinação CIM

A atividade antimicrobiana de suco de laranja contendo conservante (combinação de óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol mais Tween 80®, 1:1; v:v), foi determinada conforme descrito no item 5.3.4. Cerca de 200 μL do suco de laranja reconstituído contendo ou não o sistema conservante foram adicionados no primeiro poço, com diluições seriadas. Como controles utilizou-se sulfato de Gentamicina ($64\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Anfotericina B ($32\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.8.6.2 Determinação CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima)

A determinação das CBMs e CFMs foram realizadas conforme metodologia desenvolvida por Hernandez et al. (2013).

5.8.7 Análise das características sensoriais e pH do suco de laranja

Após processo de reconstituição e esterilização, conforme descrito no item 5.8.5, sucos de laranja contendo ou não conservante, foram avaliados em tempos T0, T7, T14 e T28 dias, quanto ao aspecto, cor, odor, sabor e valor de pH. Observou-se a integridade do suco com conservante em relação à amostra sem adição de conservante no T0 (controle) e nos tempos T7, T14 e T28 dias em relação a amostra no T0. As amostras foram avaliadas em cada item como: sem alteração, levemente modificada, modificada, e intensamente modificada.

A alteração de pH foi avaliada pHmetro (Digital PG 2000®). Considerou-se como alterado, variações acima de 10%.

Os sucos foram armazenados durante o período de 28 dias a temperatura de 8 °C.

5.9 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

5.9.1 Preparações farmacêuticas

As preparações foram elaboradas e gentilmente cedidas pela Farmácia Universitária Cidinha Bonini, do curso de Ciências farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto, sob responsabilidade e colaboração da Profa. Dra. Katyana F. B. Camilo.

Para a avaliação do potencial conservante de óleo essencial de *L. origanoides* em preparações farmacêuticas, desenvolveu-se três preparações, sendo creme (Tabela 8), xarope (Tabela 9) e xampu (Tabela 10), contendo 0,125% do sistema conservante (combinação de óleo essencial de *L. origanoides* mais Tween 80®, na proporção 1:1, v:v), o que corresponde a 0,625 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ ou 0,0625% do óleo essencial. O conservante foi adicionado ao final de cada formulação. Preparações sem adição do conservante também foram elaboradas como controles.

Tabela 8- Fórmula centesimal do creme.

| Constituinte | Quantidade |
|---|-------------------|
| Propilenoglicol | 3 % |
| Crodabase CR2 | 20 % |
| BHT(Butil hidroxitolueno) | 0,05 % |
| Triglicérides de ácido. cáprico/caprílico | 1 % |
| Água deionizada | 100 qsq (g) |

Tabela 9- Fórmula centesimal do xarope.

| Constituinte | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| Sacarose | 85 % |
| Água deionizada | 100 qsq (mL) |

Tabela 10- Fórmula centesimal do xampu.

| Constituinte | Quantidade |
|---|-------------------|
| Lauril Eter Sulfato de sódio | 25 % |
| Dietanolamida de ácido graxo de coco 90 | 3 % |
| cocoamidopropilbetaina | 5 % |
| Diestearato de PEG 6000 | 0,5 % |
| Propilenoglicol | 2% |
| Água deionizada | 100 qsq (g) |

5.9.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações

5.9.2.1 Determinação CIM

A atividade antimicrobiana das preparações contendo ou não o sistema conservante foi determinada conforme descrito no item 5.3.4. Para os testes as preparações foram pesadas e diluídas em água destilada estéril, em concentrações iniciais de 10 mg.mL⁻¹.

5.9.2.2 Determinação CBM e CFM

A determinação das CBMs e CFMs foram realizadas conforme metodologia descrita por Hernandez et al. (2013).

5.9.3 Avaliação da eficácia do sistema conservante

5.9.3.1 Microrganismos

Os microrganismos desafiantes utilizados nos ensaios de validação e no teste de eficácia de conservantes foram: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

5.9.3.2 Repique dos microrganismos

Cada linhagem foi retirada do estoque e repicada por semeadura em estrias em meio ágar. Em seguida repicadas em tubos inclinados contendo meios TSA (Trypticase Soy Agar, Himedia®) (bactérias) e Sabouraud (Fungos) e incubadas á 35° C por 24 horas para bactérias, 25°C por 48 horas para fungo leveduriforme e 7 dias para fungo filamentoso.

5.9.3.3 Padronização da suspensão de microrganismos

5.9.3.3.1 Bactérias

Às culturas bacterianas crescidas em tubo inclinado contendo meio de cultura TSA foram adicionados 9 mL de solução salina (0,9%) esterilizada. Essa suspensão teve sua absorbância ajustada em espectrofotômetro (Único S2150®) em 0,100 - 0,125 (550 nm). Em seguida essa suspensão ajustada foi submetida á diluição decimal seriada em solução salina até a obtenção da diluição 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL da suspensão ajustada e das diluições foram semeadas em triplicata à superfície do meio TSA com o auxílio de rodinhos descartáveis. As placas foram então incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Após esse período, as placas que apresentavam entre 30 a 300 colônias foram selecionadas para contagem do número de microrganismos viáveis.

5.9.3.3.2 Fungo leveduriforme

À cultura de *C. albicans* crescida em tubo inclinado foram adicionados 9 mL de solução salina (0,9%) esterilizada. Essa suspensão teve sua absorbância ajustada em 2,000 (530 nm). Em seguida essa suspensão ajustada foi submetida à diluição decimal seriada em solução salina até a obtenção da diluição 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL da suspensão ajustada e das diluições foram semeadas em triplicata à superfície do meio Sabouraud com o auxílio de rodinhos descartáveis. As placas foram então incubadas em estufa a 25°C por 48 horas. Após esse período, as placas que apresentavam entre 30 a 300 colônias foram selecionadas para contagem do número de microrganismos viáveis.

5.9.3.3.3 Fungo filamentoso

À cultura de *A. brasiliensis* crescida em tubo inclinado foram adicionados 9 mL de solução salina (0,9%) esterilizada. Essa suspensão foi submetida à diluição decimal seriada em solução salina até a obtenção da diluição 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em triplicata à superfície do meio Sabouraud com o auxílio de alças em "T". As placas foram então incubadas em estufa a 25°C por 72 horas. Após esse período, realizou-se a contagem do número de microrganismos viáveis.

5.9.3.4 Validação da metodologia através da escolha de neutralização do sistema conservante

Pesou-se 1g das preparações-teste contendo o conservante e preparações-teste sem conservante. Em seguida adicionou-se 9 mL do neutralizante Dey-Engley® (Difco®), seguido da adição de 1 mL do inóculo, obtendo-se uma carga de 10^3 UFC.g⁻¹ (Unidade Formadora de Colônia) de amostra. O mesmo foi realizado com solução salina ao invés do neutralizante. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em superfície de meio ágar em triplicatas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas (bactérias), 25°C por 48 horas (levedura) e 72 horas (fungo filamentoso). A média da recuperação dos microrganismos foi obtida pelas porcentagens de cada

microrganismo. Os valores foram calculados e considerados como <70% ou >70%. (USP, 2006; FREITAS, 2008).

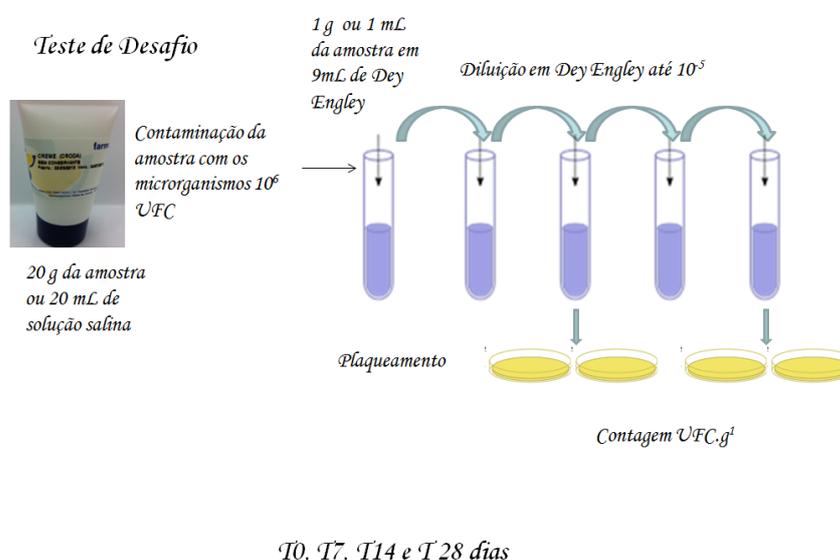
5.9.3.5 Teste eficácia do sistema conservante

Cerca de 20 g de cada formulação teste foram colocadas em 5 embalagens. A cada uma delas inoculou-se 0,2 mL de suspensão padronizada de inóculo, para a obtenção final de carga de 10^6 UFC.g⁻¹ formulação. Em seguida pesou-se 1 g da formulação, e adicionou-se 9 mL de agente neutralizante Dey-Engley®, obtendo-se a diluição 10^{-1} , a qual foi subsequentemente diluída até 10^{-5}

Controles foram realizados, utilizando-se 20 mL de solução salina, a qual foi inoculada com a mesma carga microbiana das preparações. Em seguida 1 mL desta suspensão foi diluído em 9 mL de Dey Engley®, com sequência de diluições até 10^{-5} .

Após as diluições alíquotas de 0,1 mL foram semeadas à superfície de placas contendo meio ágar adequados para cada microrganismo. As placas então foram incubadas a 35°C por 24 horas (bactérias), 25°C por 48 horas (levedura) e 72 horas (fungo filamentoso). Após o crescimento, determinou-se o número de UFC (Figura 3).

Figura 3- Esquema de execução do teste de eficácia do sistema conservante



Fonte: Autora.

Os testes ocorreram nos períodos de T0, T7 dias, T14 dias e T28 dias, sendo que a análise dos microrganismos viáveis dos controles de solução salina foi realizada somente no T0.

Durante a realização dos ensaios, as preparações foram mantidas em temperatura ambiente, livre de umidade e excesso de luz.

5.9.3.5.1 Critério de aceitação de teste de eficácia do sistema conservante

Os critérios de aceitação adotados foram os mesmos definidos pela Farmacopéia Americana (USP 34- NF29, 2010) (Tabela 11).

Tabela 11- Tipo de produtos e critérios de aceitação de eficácia de conservantes.

| Tipo de Produto | Microrganismo | 7° dia | 14° dia | 28° dia |
|--|----------------------|---------------|---|---|
| Produtos de uso tópico constituído de base ou veículo aquoso (creme e xampu) | Bactérias | - | Deve haver redução de 2 logs do n° de UFC inicialmente inoculados | Não deve haver aumento da contagem em relação ao 14° dia |
| | Bolores e Leveduras | - | Não deve haver aumento do n° de UFC inicialmente inoculados | Não deve haver aumento do n° de UFC inicialmente inoculados |
| Produtos orais constituídos de base ou veículo aquoso (xarope) | Bactérias | - | Deve haver redução de 1 log do n° de UFC inicialmente inoculados | Não deve haver aumento da contagem em relação ao 14° dia |
| | Bolores e Leveduras | - | Não deve haver aumento do n° de UFC inicialmente inoculados | Não deve haver aumento do n° de UFC inicialmente inoculados |

Fonte: USP 34- NF29, 2010.

5.9.4 Análise das características sensoriais e pH das preparações farmacêuticas

As preparações foram avaliadas após 24 horas de preparo (T0), T7 dias, T14 dias e T28 dias, quanto ao aspecto, cor, odor, e valor de pH. Observou-se a integridade das preparações com conservante em relação a amostra sem adição de conservante no T0 (controle) e nos tempos T7, T14 e T28 dias em relação a amostra no T0. As amostras foram avaliadas em cada item como: sem alteração, levemente modificada, modificada, e intensamente modificada.

A alteração de pH foi avaliada pesando-se 1g de cada formulação diluída em 9mL de água destilada. O pH foi medido em pHmetro. Considerou-se como alterado, variações acima de 10%.

As preparações foram mantidas durante o período do teste a temperatura ambiente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O presente trabalho avaliou a composição química de óleos essenciais obtidos de 117 espécies, coletadas em diferentes regiões do Brasil, as quais foram compreendidas em 3 gêneros, *Schinus* (2 indivíduos), *Lippia* (113 indivíduos) e *Hyptis* (2 indivíduos), pertencentes às famílias Anacardeaceae, Verbenaceae e Lamiaceae, respectivamente.

A tabela 12, lista os componentes majoritários identificados durante a análise cromatográfica dos óleos essenciais, tempo de retenção desses compostos, índice de retenção de Kovats, além do rendimento das espécies produtoras de óleos essenciais.

Além de mais abundantes neste estudo, as espécies de *Lippia* também foram as mais produtoras de óleos essenciais, com destaque para *L. organoides* X *L. velutina* TI 105, *L. velutina* TI 59, *L. grata* TI 61 e *L. organoides* TI 90, com rendimentos de 5,0, 5,1, 5,3 e 8,5%, respectivamente.

Com base na análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos, e identificações dos compostos majoritários, constatou-se a existência de quimiotipos dentro das espécies de *Lippia* estudadas.

As duas espécies de *L. lupulina*, foram quimicamente distintas, uma vez que uma apresentou como constituintes majoritários espatulenol e mirceno (Pratinha) e outra biciclogermacreno e β -cariofileno (Argenita).

Dentro da espécie de *Lippia alba*, observou-se a presença de três quimiotipos: fenchona, limoneno e outro com um composto majoritário não identificado.

A espécie *L. organoides* apresentou 8 quimiotipos: carvacrol (50 indivíduos), endo-fenhol (19 indivíduos), fenchona (1), β -cariofileno (3), timol (1), biciclogermacreno(1), isoborneol (3) e cânfora (1).

Dentro da espécie de *L. grata*, identificaram-se 6 indivíduos, sendo encontrados 2 quimiotipos, carvacrol (5 indivíduos, 83,3%) e endo-fenhol (1 indivíduo).

Identificaram-se 6 indivíduos de *L. velutina*, sendo 1 constituído por timol, 1 endo-fenhol e 4 carvacrol (66,7%).

Já os 16 híbridos de *L. origanoides* X *L. velutina* dividiram-se em 3 quimiotipos: carvacrol (13 indivíduos, 81,2%), β -cariofileno (2 indivíduos), e isoborneol (1 indivíduo).

Do ponto de vista botânico segundo O'leary et al. (2012) as espécies *L. velutina*, *L. microphylla* e *L. origanoides* pertencem ao mesmo grupo, portanto estes autores propõem que sejam consideradas uma só espécie, denominada *L. origanoides*. Entretanto, se por um lado existe grande semelhança morfológica entre esses indivíduos, por outro há enorme diversidade química entre eles. Isso foi constatado durante todo o presente estudo, a exemplo da *L. microphylla* que apresentou baixo teor (1%) de óleo e uma composição química muito diversa de todos os indivíduos do grupo *origanoides*.

Segundo esta nova classificação, *L. origanoides* compreenderia 10 quimiotipos: carvacrol, endo-fenchol, fenchona, β -cariofileno, timol, biciclogermacreno, isoborneol, cânfora e longicanfelinona.

Os indivíduos do gênero *Hyptis*, *H. cana* e *H. carponifolia* foram pouco produtivos em óleo (0,8 e 1,0 %, respectivamente) e a composição química foi diversa, sendo o primeiro rico em sabineno e o segundo em 1,8-cineol.

O teor de óleo essencial de plantas de *Schinus weinmannifolius* foi diferenciado quanto às estações de verão e inverno, sendo 1,0 e 2,5% respectivamente. A composição dos compostos majoritários também diferiu nas duas estações, com maior acúmulo de limoneno (15,4%), espatulenol (13,8%) e β -pineno (12,8%) no verão, e biciclogermacreno (21,1%), cariofileno-(E)- (10,4%), β -pineno (10,1%) e germecreno D (9,9 %) no inverno.

A identificação dos principais constituintes é importante para compreender a atividade antimicrobiana apresentada (BURT 2004; PAJOHI et al., 2011).

Tabela 12- Composição química e rendimento dos óleos essenciais extraídos.

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------|--------------|------|--|
| Chorão bonito (verão) | <i>Schinus weinmannifolius</i> | 1,0 | 7,706 | 977 | β - pineno 12,8 % |
| | | | 9,299 | 1031 | limoneno 15,4 % |
| | | | 27,281 | 1585 | espatulenol 13,8 % |
| Chorão bonito (inverno) | <i>Schinus weinmannifolius</i> | 2,5 | 6,886 | 978 | β - pineno 10,1% |
| | | | 17,291 | 1421 | <(E)-> - cariofileno 10,4% |
| | | | 18,586 | 1483 | germacreno D 9,9% |
| | | | 18,89 | 1498 | biciclogermacreno 21,17% |
| Lupulina Pratinha | <i>Lippia lupulina</i> | 0,5 | 7,962 | 987 | mirceno 12,9% |
| | | | 22,421 | 1425 | trans-cariofileno 9,6% |
| | | | 27,286 | 1585 | espatulenol 13,0 % |
| | | | 27,423 | 1590 | oxido cariofileno 8,2% |
| Alfazema de árvore | <i>Hyptis cana</i> Pohl ex Benth. | 0,8 | 6,755 | 972 | sabineno 6,3 % |
| | | | 8,184 | 1032 | n.i 21,5 % |
| | | | 17,306 | 1422 | n.i 6,0 % |
| | | | 20,217 | 1564 | n.i 6,0 % |
| Lupulina Argenita | <i>Lippia lupulina</i> | 0,3 | 17,316 | 1422 | β -cariofileno 6,2 % |
| | | | 18,614 | 1485 | γ -muuroleno 5,9 % |
| | | | 18,912 | 1499 | biciclogermacreno 6,0 % |
| Cariri 3 | <i>Hyptis carponifolia</i> | 1,0 | 7,603 | 1009 | Δ -careno 11,2 % |
| | | | 8,187 | 1033 | 1,8-cineol 16,1 % |
| | | | 20,765 | 1592 | n.i 6,4 % |
| Varas 4 | <i>Lippia velutina</i> | 3,8 | 8,184 | 1032 | 1,8- cineol 2,9 % |
| | | | 14,4 | 1290 | carvacrol 51,8 % |
| | | | 17,307 | 1422 | n.i 2,6 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------|--|
| Alba 204 | <i>Lippia alba</i> | 0,9 | 8,187 9,782 17,316 18,615 | 1033 1097 1422 1485 | n.i 10,7 % fenchona 54,9 % β -cariofileno 3,2 % biciclogermacreno 3,3 % |
| Alba 205 | <i>Lippia alba</i> | 1,1 | 8,101 13,185 13,881 18,598 | 1029 1238 1268 1484 | limoneno 15,3 % n.i 13,7 % n.i 10,9 % γ -muuroleno 8,3 % |
| Alba 207 | <i>Lippia alba</i> | 0,7 | 17,299 18,61 20,7 | 1422 1485 1589 | n.i 11,7 % γ -muuroleno 2,9 % n.i 4,0 % |
| Lippia TI 5 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 9,795 11,669 18,898 | 1098 1175 1498 | endo- fenchol 57,9 % n.i 4,7% biciclogermacreno 9,5 % |
| Lippia TI 7 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 9,786 17,307 18,902 | 1097 1422 1499 | endo- fenchol 52,46 % β - cariofileno 4,7 % biciclogermacreno 8,4 % |
| Lippia TI 8 | <i>Lippia grata</i> | 4,2 | 8,101 8,909 14,803 | 1029 1062 1307 | p- cimeno 9,1% γ - terpineno 11,2% carvacrol 47,8% |
| Lippia TI 10 | <i>Lippia velutina</i> | 4,4 | 8,004 8,813 14,43 | 1025 1058 1291 | p-cimeno 7,4 % γ - terpineno 3,3 % timol 61,3 % |
| Lippia TI 11 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,3 | 8,001 8,806 14,609 | 1025 1057 1299 | p-cimeno 9,1 % γ - terpineno 7,6 % carvacrol 43,1% |
| Lippia TI 14 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 8,085 8,892 14,782 | 1028 1061 1306 | p- cimeno 9,3 % γ - terpineno 10,9 % carvacrol 46,1 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|---|-----------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Lippia TI 15 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 8,06 8,864 14,728 | 1027 1060 1304 | p- cimeno 7,0 % γ- terpineno 10,2 % carvacrol 39,9 % |
| Lippia TI 16 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 9,907 17,403 19,001 | 1102 1427 1504 | endo-fenchol 52,4 % β- cariofileno 3,5 % biciclogermacreno 3,0 % |
| Lippia TI 17 | <i>Lippia grata</i> | 3,3 | 8,086 8,892 14,783 | 1028 1061 1306 | p- cimeno 9,1 % γ -terpineno 10,1 % carvacrol 44,6 % |
| Lippia TI 19 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 3,6 | 7,999 8,803 14,597 | 1025 1058 1298 | p- cimeno 9,2 % γ -terpineno 6,6 % carvacrol 47,5 % |
| Lippia TI 20 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 9,912 11,758 18,991 | 1102 1178 1503 | endo-fenchol 41,0 % n.i 6,8 % biciclogermacreno 5,8 % |
| Lippia TI 21 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 8,064 8,869 14,747 | 1028 1060 1305 | p- cimeno 6,7 % γ -terpineno 8,2 % carvacrol 38,6 % |
| Lippia TI 22 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,9 | 9,905 17,403 19 | 1102 1427 1504 | endo-fenchol 48,9 % β- cariofileno 4,1 % biciclogermacreno 4,1 % |
| Lippia TI 23 | <i>Lippia origanoides</i> | 5,0 | 9,903 17,384 18,981 | 1102 1426 1503 | endo-fenchol 49,4 % β- cariofileno 4,0 % biciclogermacreno 3,2 % |
| Lippia TI 25 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,4 | 8,016 8,817 14,621 | 1026 1058 1299 | p- cimeno 10,2 % γ- terpineno 10,0 % carvacrol 43,2 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|---|-----------------------|--------------------------|----------------------|---|
| Lippia TI 28 | <i>Lippia grata</i> | 3,2 | 8,087 8,893 14,783 | 1029 1061 1306 | p- cimeno 8,5 % γ- terpineno 8,6 % carvacrol 46,51 % |
| Lippia TI 29 | <i>Lippia grata</i> | 3,5 | 8,092 8,898 14,795 | 1029 1061 1307 | p- cimeno 8,3 % γ- terpineno 8,4 % carvacrol 44,5 % |
| Lippia TI 30 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,9 | 8,084 8,888 14,782 | 1028 1061 1306 | p- cimeno 7,0 % γ- terpineno 7,1 % carvacrol 50,4 % |
| Lippia TI 31 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 7,992 8,795 14,614 | 1025 1057 1299 | p- cimeno 9,2 % γ- terpineno 7,6 % carvacrol 51,1 % |
| Lippia TI 32 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 9,896 18,975 | 1102 1503 | endo-fenchol 57,8 % biclogermacreno 2,7 % |
| Lippia TI 33 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,9 | 8,092 8,901 14,801 | 1029 1061 1307 | p- cimeno 9,6 % γ- terpineno 10,0 % carvacrol 46,7 % |
| Lippia TI 36 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 4,5 | 8,09 8,897 14,8 | 1029 1061 1307 | p- cimeno 9,4 % γ- terpineno 10,1 % carvacrol 47,1 % |
| Lippia TI 38 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 3,6 | 7,99 8,795 14,603 | 1025 1057 1298 | p- cimeno 9,9 % γ- terpineno 12,0 % carvacrol 49,3 % |
| Lippia TI 40 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 9,79 17,299 18,895 | 1097 1422 1498 | endo-fenchol 61,0 % β-cariofileno 2,7 % biclogermacreno 2,0 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|---|
| Lippia TI 42 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,5 | 7,994 8,8 14,601 | 1025 1057 1298 | p- cimeno 7,5 % γ- terpineno 9,7 % carvacrol 40,6 % |
| Lippia TI 44 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,9 | 9,884 11,746 18,986 | 1101 1178 1503 | endo-fenchol 42,2 % n.i 6,7 % biciclogermacreno 6,4 % |
| Lippia TI 45 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,8 | 7,998 8,8 14,595 | 1025 1057 1298 | p- cimeno 8,3 % γ- terpineno 8,0 % carvacrol 48,0 % |
| Lippia TI 47 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,4 | 9,93 17,42 19,017 | 1050 1089 1194 | fenchona 65,7 % n.i 4,0 % n.i 3,4 % |
| Lippia TI 48 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,3 | 9,951 17,429 19,026 | 1104 1428 1505 | endo-fenchol 64,5 % β-cariofileno 4,1 % biciclogermacreno 4,3 % |
| Lippia TI 49 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 7,981 8,781 14,544 | 1024 1057 1296 | p- cimeno 7,1 % γ-terpineno 7,2 % carvacrol 52,5 % |
| Lippia TI 51 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,9 | 9,805 17,307 18,901 | 1098 1422 1499 | endo-fenchol 54,8 % β-cariofileno 3,9 % biciclogermacreno 7,2 % |
| Lippia TI 52 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 9,822 17,311 18,907 | 1099 1422 1499 | endo-fenchol 69,6 % β-cariofileno 3,4 % biciclogermacreno 4,0 % |
| Lippia TI 54 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 8 8,8 14,599 | 1025 1057 1298 | p- cimeno 7,5 % γ-terpineno 8,7 % carvacrol 44,0 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|--|-----------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Lippia TI 56 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 0,7 | 5,874 8,183 17,309 | 933 1032 1422 | α -pineno 6,2 % n.i 22,2 % β -cariofileno 31,7 % |
| Lippia TI 59 | <i>Lippia velutina</i> | 5,1 | 9,907 17,421 19,02 | 1102 1427 1505 | endo-fenchol 68,3 % β -cariofileno 3,1 % biciclogermacreno 5,7 % |
| Lippia TI 60 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,1 | 8,0 8,806 14,614 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 10,0 % γ -terpineno 11,8 % carvacrol 44,6 % |
| Lippia TI 61 | <i>Lippia grata</i> | 5,3 | 9,933 17,433 19,032 | 1103 1428 1505 | endo-fenchol 62,45 % β -cariofileno 3,6 % biciclogmacreno 3,6 % |
| Lippia TI 62 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 9,808 17,315 19,032 | 1098 1422 1499 | endo-fenchol 62,6 % β -cariofileno 4,2 % biciclogmacreno 8,0 % |
| Lippia TI 63 | <i>Lippia velutina</i> | 3,6 | 8,092 8,898 14,795 | 1029 1061 1307 | p-cimeno 7,5 % γ -terpineno 8,0 % carvacrol 45,9 % |
| Lippia TI 64 | <i>Lippia grata</i> | 3,4 | 8,083 9,899 14,793 | 991 1018 1195 | p- cimeno 6,8 % γ -terpineno 14,7 % carvacrol 40,7 % |
| Lippia TI 65 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,3 | 8,088 8,892 14,777 | 1029 1061 1306 | p- cimeno 8,9 % γ -terpineno 9,7 % carvacrol 46,0 % |
| Lippia TI 66 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 8,028 8,832 14,638 | 1026 1059 1300 | p- cimeno 8,3 % γ -terpineno 9,6 % carvacrol 42,6 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|--|-----------------------|---------------------|-----------|---|
| Lippia TI 69a | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 0,7 | 16,304 | 1375 | n.i 3,9 % |
| | | | 17,294 | 1421 | β-cariofileno 37,7 % |
| | | | 19,311 | 1519 | γ-cadineno 2,5 % |
| Lippia TI 70 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 8,012 | 1025 | p-cimeno 9,8 % |
| | | | 8,812 | 1058 | γ-terpineno 11,2 % |
| | | | 14,803 | 1307 | carvacrol 46,0 % |
| Lippia TI 71 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,7 | 11,055 | 1150 | isoborneol 6,1 % |
| | | | 17,281 | 1421 | n.i 6,5 % |
| | | | 18,877 | 1497 | biciclogermacreno 9,0 % |
| Lippia TI 72 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 3,3 | 7,999 | 1025 | p- cimeno 8,5 % |
| | | | 8,808 | 1058 | γ-terpineno 5,3 % |
| | | | 14,604 | 1298 | carvacrol 55,5 % |
| Lippia TI 73 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,8 | 8,007 | 1025 | p- cimeno 9,6 % |
| | | | 8,805 | 1058 | γ-terpineno 10,4 % |
| | | | 14,611 | 1299 | carvacrol 54,5 % |
| Lippia TI 75 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,2 | 8,014 | 1026 | p- cimeno 15,5 % |
| | | | 8,808 | 1058 | γ-terpineno 11,3 % |
| | | | 14,616 | 1299 | carvacrol 30,1 % |
| Lippia TI 77 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,3 | 7,99 | 1025 | p- cimeno 8,9 % |
| | | | 8,794 | 1058 | c-terpineno 7,9 % |
| | | | 14,609 | 1299 | carvacrol 43,8 % |
| Lippia TI 78 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 8,019 | 1026 | p- cimeno 8,3 % |
| | | | 8,808 | 1058 | γ-terpineno 10,5 % |
| | | | 14,605 | 1298 | carvacrol 38,6 % |
| Lippia TI 79 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 8,009 | 1025 | p- cimeno 8,5 % |
| | | | 8,804 | 1058 | γ-terpineno 11,3 % |
| | | | 14,613 | 1299 | carvacrol 41,4 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|---|-----------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Lippia TI 82 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,4 | 7,997 8,802 14,622 | 1025 1057 1299 | p- cimeno 7,6 % γ-terpineno 5,4 % carvacrol 50,8 % |
| Lippia TI 83 | <i>Lippia origanoides</i> | 0,9 | 9,812 17,306 18,904 | 1098 1422 1499 | endo-fenchol 4,8 % β-cariofileno 6,3 % biciclogmacreno 5,0 % |
| Lippia TI 84 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,8 | 8,009 8,808 14,614 | 1025 1058 1299 | p- cimeno 9,0 % γ-terpineno 12,8 % carvacrol 43,1 % |
| Lippia TI 85 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 8,027 8,853 14,614 | 1026 1060 1299 | p-cimeno 5,8 % γ-terpineno 2,6 % carvacrol 44,8 % |
| Lippia TI 86 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 2,3 | 7,999 8,797 14,601 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 8,4 % γ-terpineno 12,5 % carvacrol 39,3 % |
| Lippia TI 87 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 3,9 | 8,011 8,809 14,618 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 8,8 % γ-terpineno 13,2 % carvacrol 40,8 % |
| Lippia TI 88 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,3 | 7,988 8,79 14,589 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 10,4 % γ-terpineno 9,7 % carvacrol 37,5 % |
| Lippia TI 90 | <i>Lippia origanoides</i> | 8,5 | 7,993 8,802 14,602 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 7,3 % γ-terpineno 5,3 % carvacrol 52,7 % |
| Lippia TI 91 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,7 | 8,006 8,805 14,6182 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 7,4 % γ-terpineno 16,8 % carvacrol 30,0 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|---|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|--|
| Lippia TI 94 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,7 | 8,027 8,815 14,631 | 1026 1058 1300 | p-cimeno 5,6 % γ-terpineno 11,3 % carvacrol 30,7 % |
| Lippia TI 95 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 2,2 | 8,009 8,798 14,596 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 7,0 % γ-terpineno 11,0 % carvacrol 44,7 % |
| Lippia TI 96 | <i>Lippia velutina</i> | 2,6 | 8,019 8,798 14,595 | 1026 1057 1298 | p-cimeno 6,4 % γ-terpineno 13,8 % carvacrol 37,14 % |
| Lippia TI 97 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 4,0 | 8,002 8,802 14,614 | 1025 1057 1299 | p-cimeno 10,6 % γ-terpineno 11,0 % carvacrol 41,5 % |
| Lippia TI 98 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,7 | 8,034 8,826 14,665 17,302 | 1026 1058 1301 1422 | p-cimeno 8,4 % γ-terpineno 7,2 % carvacrol 9,2 % β-cariofileno 10,5 % |
| Lippia TI 99 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,8 | 8,003 8,801 14,605 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 9,6 % γ-terpineno 12,6 % carvacrol 39,5 % |
| Lippia TI 100 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,9 | 8,012 8,814 14,62 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 8,3 % γ-terpineno 9,5 % carvacrol 43,5 % |
| Lippia TI 101 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,0 | 8, 8,8 14,61 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 7,0 % γ-terpineno 6,7 % carvacrol 47,0 % |
| Lippia TI 103 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,7 | 7,989 8,791 14,594 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,1 % γ-terpineno 8,8 % carvacrol 39,0 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|--|-----------------------|---|--------------------------------------|--|
| Lippia TI 104 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 5,0 | 6,256 8,173 11,067 | 950 1032 1150 | canfeno 9,4 % 1,8-cineol 12,5 % isoborneol 21,3 % |
| Lippia TI 105 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,9 | 9,975 10,924 17,331 | 1098 1144 1423 | endo-fenchol 56,8 % n.i 2,0 % β -cariofileno 1,9 % |
| Lippia TI 106 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 2,9 | 7,988 8,794 14,59 | 1025 1058 1298 | p-cimeno 9,0 % γ -terpineno 6,7 % carvacrol 50,3 % |
| Lippia TI 107 | <i>Lippia velutina</i> | 4,0 | 8,013 8,809 14,604 | 1026 1058 1298 | p-cimeno 5,8 % γ -terpineno 6,3 % carvacrol 53,3 % |
| Lippia TI 108 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,5 | 8,191 11,086 17,318 | 1033 1151 1422 | n.i 15,4 % isoborneol 25,7 % β -cariofileno 6,6 % |
| Lippia TI 109 | <i>Lippia origanoides</i> X <i>L. velutina</i> | 3,3 | 7,995 8,8 14,59 17,298 18,892 | 1025 1058 1298 1422 1498 | p-cimeno 6,1 % γ -terpineno 4,5 % carvacrol 41,1 % β -cariofileno 5,7 % biciclogmacreno 7,4 % |
| Lippia TI 110 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 6,243 8,159 11,051 | 950 1031 1149 | canfeno 5,8 % 1,8-cineol 15,2 % isoborneol 22,7 % |
| Lippia TI 111 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,3 | 8,006 8,807 14,613 | 1025 1058 1299 | p-cimeno 6,5 % γ - terpineno 11,0 % carvacrol 31,3 % |
| Lippia TI 112 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,1 | 8,016 8,811 14,623 | 1026 1058 1299 | p-cimeno 5,3 % γ - terpineno 6,8 % carvacrol 16,5 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|--|
| Lippia TI 113 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,6 | 9,801 14,248 18,903 | 1098 1283 1499 | endo-fenchol 69,0 % bornil-acetato 1,5 % biciclogmacreno 4,7 % |
| Lippia TI 114 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,1 | 9,77 11,066 18,896 | 1097 1150 1498 | endo-fenchol 60,6 % isoborneol 1,7 % biciclogmacreno 2,0 % |
| Lippia TI 115 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,4 | 9,775 17,312 18,906 | 1097 1422 1499 | endo-fenchol 66,6 % β -cariofileno 2,9 % biciclogmacreno 5,2 % |
| Lippia TI 116 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,7 | 9,793 17,311 18,904 | 1098 1422 1499 | endo-fenchol 63,0 % β -cariofileno 2,9 % biciclogmacreno 5,2 % |
| Lippia TI 117 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 8,191 11,082 17,314 | 1033 1151 1422 | 1,8-cineol 6,9 % isoborneol 13,0 % n.i 9,8 % |
| Lippia TI 118 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,8 | 7,993 8,796 14,595 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,3 % γ - terpineno 6,9 % carvacrol 32,4 % |
| Lippia TI 119 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,8 | 7,996 8,8 14,6 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 9,2 % γ - terpineno 8,7 % carvacrol 52,1 % |
| Lippia TI 120 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 6,272 8,191 11,083 | 951 1033 1151 | canfeno 12,5 % n.i 15,2 % cânfora 26,9 % |
| Lippia TI 121 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,9 | 8,014 8,807 14,604 | 1026 1055 1298 | p-cimeno 8,8 % γ - terpineno 9,4 % carvacrol 27,4 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|--|
| Lippia TI 122 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,2 | 8,025 8,856 14,604 | 1026 1055 1298 | p-cimeno 6,1 % γ- terpineno 3,6 % carvacrol 31,1 % |
| Lippia TI 123 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,6 | 7,988 8,786 14,59 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,7 % γ- terpineno 11,9 % carvacrol 39,8 % |
| Lippia TI 124 | <i>Lippia origanoides</i> | 4,3 | 7,99 8,792 14,599 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,1 % γ- terpineno 7,0 % carvacrol 42,9 % |
| Lippia TI 125 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,0 | 7,991 8,792 14,593 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 8,9 % γ- terpineno 10,1 % carvacrol 41,2 % |
| Lippia TI 126 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,6 | 7,997 8,796 14,601 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 10,5 % γ- terpineno 12,4 % carvacrol 45,4 % |
| Lippia TI 127 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,9 | 7,998 8,793 14,593 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 8,3 % γ- terpineno 9,8 % carvacrol 39,8 % |
| Lippia TI 128 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,6 | 8,013 8,838 14,397 | 1026 1059 1290 | p-cimeno 5,8 % γ- terpineno 2,7 % timol 49,9 % |
| Lippia TI 129 | <i>Lippia origanoides</i> | 1,9 | 8,009 8,8 14,596 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,7 % γ- terpineno 16,4 % carvacrol 38,7 % |
| Lippia TI 130 | <i>Lippia origanoides</i> | 3,6 | 7,993 8,783 14,581 | 1025 1057 1297 | p-cimeno 5,1 % γ- terpineno 15,8 % carvacrol 36,8 % |

| Código Material Vegetal | Identificação Espécie | Rendimento (%) | TR (minutos) | IK | Composição do óleo (% da área do cromatograma) |
|-------------------------|--|----------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| Lippia TI 131 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,0 | 8 8,793 14,591 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 7,6 % γ- terpineno 15,0 % carvacrol 42,1 % |
| Lippia TI 132 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,7 | 8,019 8,807 14,607 | 1026 1058 1299 | p-cimeno 6,0 % γ- terpineno 13,7 % carvacrol 36,3 % |
| Lippia TI 133 | <i>Lippia origanoides</i> | 2,1 | 8,008 8,796 14,593 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,2 % γ- terpineno 11,0 % carvacrol 52,7 % |
| Lippia TI 134 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 2,2 | 7,998 8,785 14,585 | 1025 1057 1298 | p-cimeno 6,0 % γ- terpineno 11,7 % carvacrol 45,5 % |
| Lippia TI 135 | <i>Lippia origanoides X L. velutina</i> | 3,4 | 8,01 8,809 14,601 14,694 | 1025 1058 1298 1302 | p-cimeno 4,6 % γ- terpineno 5,5 % timol 13,5 % carvacrol 19,37 % |
| Lippia TI 136 | <i>Lippia origanoides</i> Kunth junção * | 2,1 | 7,788 8,589 14,393 | 1024 1056 1293 | p-cimeno 10,65 % γ- terpineno 12,2 % carvacrol 26,28 % |

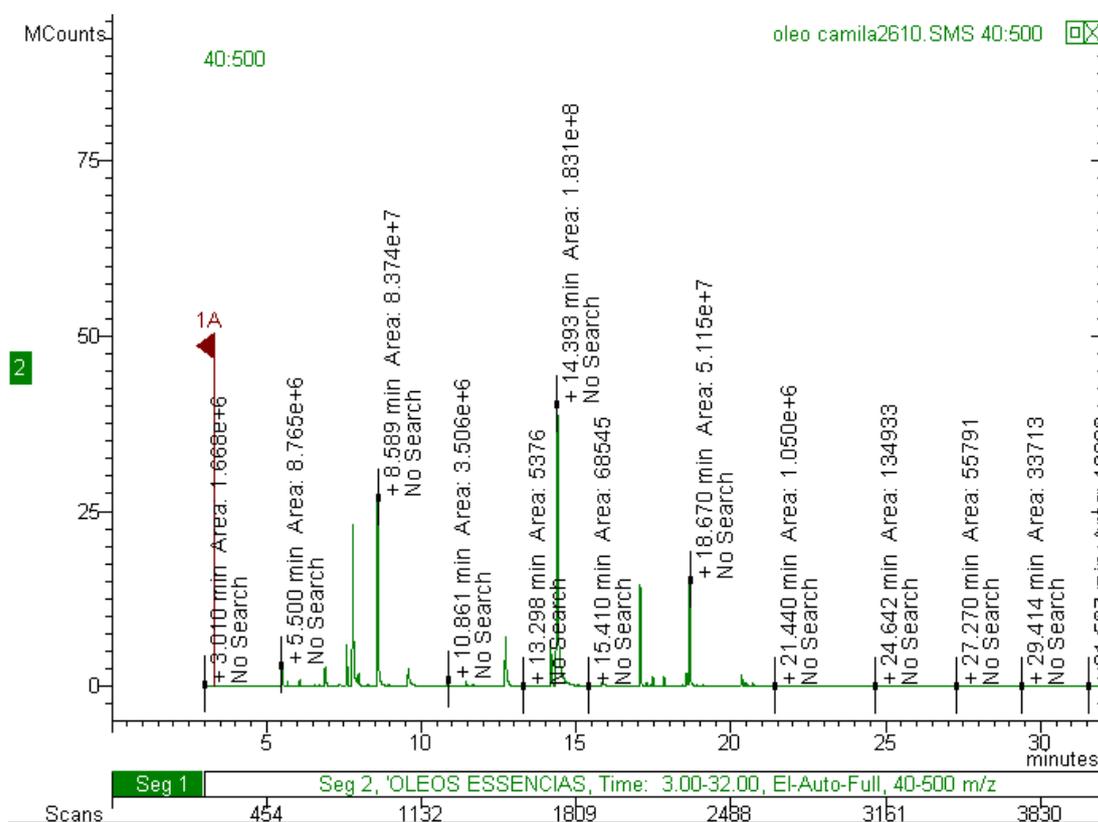
(n.i) Composto não identificado (IK) Índice de Kovats (TR) Tempo de Retenção

* associação dos indivíduos de *Lippia origanoides* produtores de carvacrol (TI 11, 14, 15, 21, 30, 42, 49, 54, 55, 60, 65 e 66)

6.1.1 Composição química do óleo essencial de *L. origanoides* (TI136-carvacrol)

O perfil químico do óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol pode ser observado na figura 4.

Figura 4- Cromatograma da análise de óleo essencial de *Lippia origanoides* TI 136-carvacrol



Fonte: Autora.

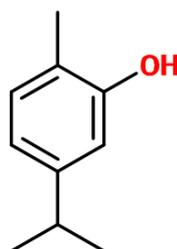
Foram identificados 81,62% dos compostos presentes no óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol), com predominância de monoterpenos. O composto carvacrol foi o mais abundante (26,28%) (Tabela 13).

Tabela 13- Identificação da composição química de óleo essencial de *Lippia origanoides* TI136-carvacrol.

| Tempo de retenção | Índice de Kovats | % área | Identificação | Classe |
|-------------------|------------------|--------------|--------------------------------------|---------------|
| 5,5 | 939 | 1,26 | α -pineno | monoterpeno |
| 5,68 | 946 | 0,4 | canfeno | monoterpeno |
| 6,07 | 960 | 0,46 | tuja-2,4 (10-dieno) | monoterpeno |
| 6,88 | 989 | 2,0 | mirceno | monoterpeno |
| 7,59 | 1016 | 2,33 | α -terpineno | monoterpeno |
| 7,78 | 1024 | 10,65 | p-cymeno | monoterpeno |
| 7,97 | 1031 | 0,44 | 1,8 cineol | monoterpeno |
| 8,58 | 1056 | 12,0 | γ-terpineno | monoterpeno |
| 9,57 | 1095 | 1,45 | linalol | monoterpeno |
| 10,86 | 1148 | 0,5 | cânfora | monoterpeno |
| 12,71 | 1225 | 5,3 | metil éter carvacrol | monoterpeno |
| 14,187 | 1285 | 2,54 | timol | monoterpeno |
| 14,393 | 1293 | 26,28 | carvacrol | monoterpeno |
| 17,073 | 1422 | 5,48 | β -cariofileno | sesquiterpeno |
| 17,47 | 1442 | 0,74 | aromadendreno | sesquiterpeno |
| 17,84 | 1459 | 0,58 | β -santaleno | sesquiterpeno |
| 18,56 | 1495 | 0,88 | viridifloreno | sesquiterpeno |
| 18,67 | 1500 | 7,34 | biciclogermacreno | sesquiterpeno |
| 20,35 | 1585 | 0,79 | espatulenol | sesquiterpeno |
| 20,537 | 1594 | 0,2 | globulol | sesquiterpeno |

O carvacrol (Figura 5) é considerado um dos principais componentes de certos óleos essenciais que exercem atividade antimicrobiana, devido não somente ao fato de sua alta abundância em alguns óleos, mas também pela alta atividade específica quando comparado aos outros constituintes dos óleos essenciais (VELDHUIZEN, et al., 2006).

Figura 5- Estrutura química do composto carvacrol

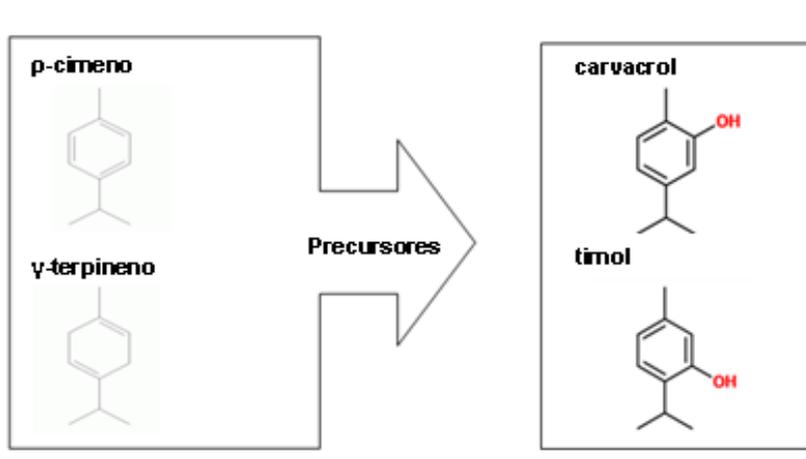


Fonte: Autora.

Os outros dois compostos majoritários presentes no óleo essencial de *L. organoides*, os hidrocarbonetos monoterpênicos *p*-cimeno e γ -terpineno, são precursores dos terpenos fenólicos, timol e carvacrol (Figura 6) (TAINTER; GRENIS, 1993; OLIVEIRA et al., 2007).

Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2007), os autores também identificaram um quimiotipo de *L. organoides*, cuja proporção de compostos majoritários foi semelhante aos encontrados neste estudo, com 10,3% de *p*-cimeno, 4,1% de γ -terpineno e 38,6% de carvacrol

Figura 6- Hidrocarbonetos monoterpênicos precursores de timol e carvacrol



Fonte: Autora.

6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

6.2.1 Determinação da CIM dos óleos essenciais

Os óleos essenciais avaliados mostraram significativa atividade individual contra os microrganismos Gram positivos e negativos.

Os óleos essenciais das plantas denominados de TI apresentaram menores CIMs, maior espectro de ação e, de modo geral, foram ativos para todas as linhagens ensaiadas (Tabela 14).

As atividades antibacterianas mais expressivas foram obtidas com o óleo essencial das plantas contendo em sua composição o carvacrol como composto

majoritário, sendo elas *L. origanoides* (TI 45, 77, 88, 101 e 119) e *L. origanoides* X *L. velutina* (TI 109 e 119).

Quanto a atividade antifúngica, as espécies com menores CIMs foram *L. velutina* (TI 10 - timol), *L. origanoides* (TI 31, 118 e 119 - carvacrol) e *L. origanoides* X *L. velutina* (TI 38 e 109- carvacrol).

As espécies de *S. weinmannifolius*, *H. cana*, e *L. microphylla* (Argenita 63) não demonstraram atividade antibacteriana e apresentaram especificidade frente á linhagens fúngicas.

A atividade pronunciada de *L. origanoides* TI 136- carvacrol pode estar relacionada à presença de monoterpenos e sesquiterpenos, aos quais vem sendo atribuídas a ação antimicrobiana dos óleos essenciais (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

De acordo com Valeriano et al. (2012), o caráter lipofílico dos monoterpenos causa danos da estrutura da membrana celular. Por outro lado, o caráter hidrofílico do grupo funcional álcool está diretamente relacionado á atividade antimicrobiana dos terpenóides (SFEIR et al., 2013; GRIFFIN et al., 1999).

As demais espécies estudadas não apresentaram ação antimicrobiana, ou tiveram CIMs mais elevadas, a exemplo de *L. alba*.

Tabela 14- Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais ($\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$).

| Espécie | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7664 | <i>k. pneumoniae</i> ATCC 4352 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9729 | <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|---|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ | | | | | | | | | |
| <i>S. weinmannifolius</i> (verão) | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | 12,5 | 25,0 |
| <i>S. weinmannifolius</i> (inverno) | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 |
| <i>H. cana</i> | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 | 1,25 | 2,5 |
| <i>Lippia microphylla</i> (63 Argenita) | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>H. carponifolia</i> | >5 | >5 | >5 | 5 | >5 | >5 | >5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. velutina</i> (varas 4) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. alba</i> 204 | 5 | 5 | 5 | >5 | >5 | 5 | 1,25 | >5 | 2,5 |
| <i>L. alba</i> 205 | 5 | >5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 5 | 5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | >5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. organoides</i> TI 7 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. grata</i> TI 8 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. velutina</i> TI 10 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. organoides</i> TI 11 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 14 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 15 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 16 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. grata</i> TI 17 | 5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 19 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 20 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. organoides</i> TI 21 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 22 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | >5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. organoides</i> TI 23 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | >5 | >5 | 5 | 5,0 |
| <i>L. organoides</i> TI 25 | 5 | 1,25 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. grata</i> TI 28 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. grata</i> TI 29 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 30 | 5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 31 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. organoides</i> TI 32 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. organoides</i> TI 33 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |

| Espécie | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7664 | <i>k. pneumoniae</i> ATCC 4352 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9729 | <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|---|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>L. origanoides</i> TI 35 | 5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 5 | 5,0 | 5,0 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 38 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> TI 40 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | >5 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 41 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 42 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 44 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 45 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 47 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 48 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 49 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 51 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 52 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 54 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 55 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> x <i>L. velutina</i> TI 56 | >5 | 5 | >5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. velutina</i> TI 59 | 5 | 5 | >5 | 5 | 5 | >5 | >5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 60 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. grata</i> TI 61 | >5 | >5 | >5 | 5 | >5 | >5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 62 | 5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| <i>L. velutina</i> TI 63 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. grata</i> TI 64 | 2,5 | 1,25 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 65 | 2,5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 66 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 68a | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 69a | >5 | >5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 70 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 71 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 72 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 73 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 75 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 77 | 1,25 | 0,62 | 0,31 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 78 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> TI 79 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 81 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 82 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |

| Espécie | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7664 | <i>k. pneumoniae</i> ATCC 4352 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9729 | <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|--|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>L. origanoides</i> TI 83 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,31 |
| <i>L. origanoides</i> TI 84 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 85 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 86 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 87 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 88 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 90 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 5 | ne | ne |
| <i>L. origanoides</i> TI 91 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 93 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 94 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 95 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. velutina</i> TI 96 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 97 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 98 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 99 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 100 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 101 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 103 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 104 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | >5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 105 | 2,5 | 5 | 1,25 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 106 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. velutina</i> TI 107 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 108 | 5 | 5 | 5 | >5 | >5 | >5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 109 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> TI 110 | >5 | 5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 111 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 112 | 5 | 2,5 | 5 | >5 | 5 | >5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 113 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | >5 | >5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 114 | 2,5 | 5 | 5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 115 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 116 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 117 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |

| Espécie | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7664 | <i>k. pneumoniae</i> ATCC 4352 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9729 | <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|---|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>L. origanoides</i> TI 118 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> TI 119 | 2,5 | 1,25 | 0,31 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 0,62 | 0,62 |
| <i>L. origanoides</i> TI 120 | 2,5 | 5 | 2,5 | >5 | 2,5 | >5 | 5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 121 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 122 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 123 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 124 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 125 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 126 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 127 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 128 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 129 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 130 | 5 | 2,5 | 5 | 5 | 2,5 | 5 | 1,25 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 131 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 0,62 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> TI 133 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 134 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 |
| <i>L. origanoides</i> X <i>L. velutina</i> TI 135 | 2,5 | 5 | 2,5 | 5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <i>L. origanoides</i> TI 136 | n.e | 1,25 | n.e | n.e | 1,25 | n.e | 2,5 | 0,625 | 2,5 |
| sulfato de Gentamicina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 2,5 | 5 | 2,5 | 1,25 | 5 | 0,62 | 5 | n.e | n.e |
| Anfotericina B ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | n.e | n.e | n.e | n.e | n.e | n.e | n.e | 2,0 | 1,0 |
| Nipagin® | 0,15% | 0,15% | 0,15% | 0,3% | 0,3% | 0,3% | 0,3% | 0,075% | 0,1% |

(n.e) não ensaiado

Bactérias Gram negativas geralmente são menos susceptíveis aos óleos essenciais que as Gram positivas (TROMBETTA et al., 2005; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012), isso porque a parede das Gram negativas contém lipopolissacarídeos hidrofílicos, os quais criam uma barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, o que faz com que essas sejam mais tolerantes aos compostos antimicrobianos encontrados nos óleos essenciais (NIKAIDO, 1994, 2003; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Todavia os resultados obtidos neste estudo com os óleos essenciais ensaiados foram promissores tanto frente a microrganismos Gram positivos quanto Gram negativos.

6.2.2 Ensaio de sinergismo

6.2.2.1 Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 45-carvacrol) em associação com Nipagin® na atividade antimicrobiana

A interação sinérgica ocorreu entre óleo essencial de *L. origanoides* (TI 45-carvacrol) e Nipagin® frente à linhagem de *S. aureus* na concentração de 0,625 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo e 0,0023% de Nipagin® (Tabela 17), e esta mesma concentração promoveu interação aditiva frente as demais linhagens bacterianas, reduzindo em até 130 vezes a concentração do conservante comercial e até 4 vezes a do óleo. (Tabelas 15, 16 e 18). Para as linhagens fúngicas, a combinação de 0,625 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo e 0,018% de Nipagin® apresentou efeito sinérgico, com redução da concentração dos ativos em 4 vezes (Tabelas 19 e 20).

Tabela 15- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

| CIM <i>L. Origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 4,03 | A |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,037 | 0,74 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,12 | I |
| 0,078 | 0,075 | 1,06 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 16- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

| CIM <i>L. Origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|-------------------------|-------------|------------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 4,03 | A |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,075 | 0,49 | S |
| 0,156 | 0,15 | 0,62 | A ⁺ |
| 0,078 | 0,3 | 1,06 | I |

(A) antagonista (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 17- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|-------------------------|-------------|------------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,25 | S |
| 0,312 | 0,0093 | 0,15 | S |
| 0,156 | 0,15 | 0,56 | A ⁺ |
| 0,078 | 0,3 | 1,03 | I |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 18- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7664.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|-------------------------|-------------|------------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 4,03 | A |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,075 | 1,24 | I |
| 0,156 | 0,075 | 1,12 | I |
| 0,078 | 0,15 | 2,06 | I |

(A) antagonista (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 19- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin (%) | ICIF | Interação |
|---|-----------------|------|----------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,625 | 0,018 | 0,49 | S |
| 0,312 | 0,075 | 1,12 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,15 | 2,06 | I |
| 0,078 | 0,15 | 2,03 | I |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 20- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|------------------|------|----------------|
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,625 | 0,018 | 0,49 | S |
| 0,312 | 0,075 | 1,12 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,06 | I |
| 0,078 | 0,075 | 1,03 | I |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

6.2.2.2 Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 128-timol) em associação com Nipagin® na atividade antimicrobiana

Reduções de até 130 vezes de Nipagin® foram observadas quando o mesmo foi ensaiado com óleo essencial de *L. origanoides* (TI 128 - timol) em concentrações de 0,0023% e 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ respectivamente. Nessas concentrações o sinergismo foi constatado frente às linhagens *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e para *L. monocytogenes* e *C. albicans* a combinação foi aditiva (Tabela 21 a 25).

Embora a combinação de óleo essencial de *L. origanoides* 128- timol tenha possibilitado a redução da concentração de Nipagin®, o princípio ativo timol, constituinte majoritário do óleo, possui características sensoriais acentuadas, o que

poderia levar a alterações organolépticas das preparações ou alimentos contendo tal óleo essencial como conservante.

Tabela 21- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

| CIM <i>L. Origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,0023$ | 4,03 | A |
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,28 | S |
| 0,312 | 0,037 | 0,61 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,06 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 22- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,0023$ | 4,0 | I |
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,0 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,0 | A ⁺ |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,5 | S |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,25 | S |
| 0,312 | 0,15 | 0,62 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,3 | 1,06 | I |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 23- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,0023$ | 4,0 | I |
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 2,0 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 1,0 | A ⁺ |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 0,5 | S |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,25 | S |
| 0,312 | 0,018 | 0,18 | S |
| 0,156 | 0,15 | 0,56 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 24- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7664.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,0023$ | 8,01 | A |
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 4,01 | I |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 2,01 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 1,51 | I |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,51 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,0093 | 0,30 | S |
| 0,156 | 0,15 | 1,12 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,15 %

Tabela 25- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Nipagin® (%) frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,0023$ | 8,03 | A |
| 5,0 | $\leq 0,0023$ | 4,03 | A |
| 2,5 | $\leq 0,0023$ | 2,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,0023$ | 1,03 | I |
| 0,625 | $\leq 0,0023$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,037 | 0,73 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,12 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

6.2.2.3 Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 45- carvacrol) em associação com *L. origanoides* (TI 40- endo-fenchol) na atividade antimicrobiana

A combinação sinérgica que apresentou maior espectro de ação antimicrobiana foi 0,312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 45- carvacrol) com 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo de *L. origanoides* (TI 40- endo-fenchol), atingindo todos os microrganismos, com exceção de *C. albicans*, para qual a combinação de 0,312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos dois óleos promoveu um efeito sinérgico (Tabelas 26 a 31).

Tabela 26- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|---|---|------|----------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 1,03 | I |
| 5,0 | 0,156 | 0,62 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,312 | 0,49 | S |
| 1,25 | 0,312 | 0,36 | S |
| 0,625 | 0,312 | 0,30 | S |
| 0,312 | 0,625 | 0,53 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,625 | 0,51 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = $>10,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = $1,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 27- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|---|---|------|----------------|
| 10,0 | 0,312 | 1,24 | I |
| 5,0 | 0,312 | 0,74 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,312 | 0,49 | S |
| 1,25 | 0,312 | 0,36 | S |
| 0,625 | 0,312 | 0,30 | S |
| 0,312 | 0,625 | 0,53 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,625 | 0,51 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = $>10,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = $1,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 28- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|---|---|-------------|------------------|
| 10,0 | 0,312 | 1,24 | I |
| 5,0 | 0,312 | 0,74 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,312 | 0,49 | S |
| 1,25 | 0,312 | 0,36 | S |
| 0,625 | 0,312 | 0,30 | S |
| 0,312 | 0,625 | 0,53 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,625 | 0,51 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = >10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 29- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7664.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|---|---|-------------|------------------|
| 10,0 | 0,312 | 1,12 | I |
| 5,0 | 0,312 | 0,62 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,312 | 0,37 | S |
| 1,25 | 0,312 | 0,24 | S |
| 0,625 | 0,312 | 0,18 | S |
| 0,312 | 0,312 | 0,15 | S |
| 0,156 | 0,625 | 0,26 | S |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = >10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 30- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|---|---|-------------|------------------|
| 10,0 | 0,625 | 1,25 | I |
| 5,0 | 0,625 | 0,75 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,625 | 0,50 | S |
| 1,25 | 0,625 | 0,37 | S |
| 0,625 | 0,625 | 0,31 | S |
| 0,312 | 0,625 | 0,28 | S |
| 0,156 | 1,25 | 0,51 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = >10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 31- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 40- endo-fenchol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 40) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|--|------|----------------|
| 10,0 | 0,312 | 1,24 | I |
| 5,0 | 0,312 | 0,74 | A ⁺ |
| 2,5 | 0,312 | 0,49 | S |
| 1,25 | 0,312 | 0,36 | S |
| 0,625 | 0,312 | 0,30 | S |
| 0,312 | 0,625 | 0,53 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,625 | 0,51 | A ⁺ |

(A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 CIM *L. origanoides* (TI 40) = >10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

6.2.2.4 Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 45 - carvacrol) em associação com *L. origanoides* (TI 128- timol) na atividade antimicrobiana

A combinação de 0,039 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. origanoides* (TI 45- carvacrol) com 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. origanoides* (TI 128- timol) apresentou interação sinérgica quando ensaiada frente aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, mostrando-se aditiva para *A. brasiliensis*, com reduções na concentração dos ativos em 64 e 4 vezes (Tabelas 32, 34, 36 e 37). Para o microrganismo *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* a interação teve efeito sinérgico quando se utilizou 0,078 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. origanoides* (TI 45) e 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de *L. origanoides* (TI 128), com reduções de 32 e 4 vezes respectivamente (Tabelas 33 e 35).

Como outrora citado, o uso de óleo essencial contendo timol (TI 128), ainda que possibilite reduções nas concentrações dos outros ativos, é caracterizado por forte odor, o que afetaria as características organolépticas dos produtos a serem futuramente conservados.

Tabela 32- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 4,03 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 2,03 | I |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 1,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,039$ | 0,15 | S |
| 0,312 | 0,156 | 0,24 | S |
| 0,156 | 0,312 | 0,31 | S |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 33- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 4,01 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 2,01 | I |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 1,01 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 0,51 | A ⁺ |
| 0,625 | 0,078 | 0,28 | S |
| 0,312 | 0,156 | 0,18 | S |
| 0,156 | 0,312 | 0,18 | S |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 34- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 4,01 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 2,01 | I |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 1,01 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 0,51 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,039$ | 0,26 | S |
| 0,312 | 0,078 | 0,15 | S |
| 0,156 | 0,312 | 0,18 | S |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 35- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7664.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 4,01 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 2,01 | I |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 1,01 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 0,51 | A ⁺ |
| 0,625 | 0,078 | 0,27 | S |
| 0,312 | 0,312 | 0,24 | S |
| 0,156 | 1,25 | 0,56 | A ⁺ |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 36- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 4,01 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 2,01 | I |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 1,01 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 0,51 | A ⁺ |
| 0,625 | $\leq 0,039$ | 0,26 | S |
| 0,312 | 0,312 | 0,24 | S |
| 0,156 | 0,625 | 0,31 | S |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

Tabela 37- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 45- carvacrol) com *Lippia origanoides* (TI 128- timol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 128) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM <i>L. origanoides</i> (TI 45) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | ICIF | Interação |
|--|---|-------------|------------------|
| 10 | $\leq 0,039$ | 8,03 | A |
| 5,0 | $\leq 0,039$ | 4,03 | A |
| 2,5 | $\leq 0,039$ | 2,03 | I |
| 1,25 | $\leq 0,039$ | 1,03 | I |
| 0,625 | $\leq 0,039$ | 0,53 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,156 | 0,36 | S |
| 0,156 | 0,312 | 0,36 | S |

(A)antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente (S) sinérgica ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 128) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM *L. origanoides* (TI 45) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$

6.2.2.5 Avaliação do efeito sinérgico de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) em associação com polissorbato Tween 80® e Nipagin® na atividade antimicrobiana

A combinação de 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) dissolvido em Tween 80®, com 0,0011% de Nipagin® proporcionou a redução deste último em 68 vezes, em comparação quando é utilizado isoladamente. Neste ensaio ficou evidente que a ação antimicrobiana estava

relacionada ao óleo essencial, uma vez que a CIM deste quando testado isoladamente também foi na maioria das vezes de $0,625 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabelas 38 a 43).

Tabela 38- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|---------------------|------|-----------|
| 5,0 | 0,0011 | 8,01 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 4,01 | A |
| 1,25 | 0,0011 | 2,01 | I |
| 0,625 | 0,0011 | 1,01 | I |
| 0,312 | 0,075 | 1,49 | I |
| 0,156 | 0,15 | 2,24 | I |
| 0,078 | 0,15 | 2,12 | I |
| 0,039 | 0,15 | 2,06 | I |

(A) antagonica (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 136) = $0,625 \mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 39- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|---------------------|------|----------------|
| 5,0 | 0,0011 | 4,01 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 2,01 | I |
| 1,25 | 0,0011 | 1,01 | A ⁺ |
| 0,625 | 0,15 | 1,01 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,15 | 0,75 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,3 | 1,12 | I |
| 0,078 | 0,3 | 1,06 | I |
| 0,039 | 0,15 | 0,53 | A ⁺ |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 136) = $1,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 40- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|---------------------|------|----------------|
| 5,0 | 0,0011 | 8,01 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 4,01 | A |
| 1,25 | 0,0011 | 2,01 | I |
| 0,625 | 0,0011 | 1,01 | I |
| 0,312 | 0,15 | 0,99 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,3 | 1,24 | I |
| 0,078 | 0,3 | 1,12 | I |
| 0,039 | 0,3 | 1,06 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI136) = 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,3 %

Tabela 41- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7664.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|---|---------------------|------|----------------|
| 5,0 | 0,0011 | 8,01 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 4,01 | A |
| 1,25 | 0,0011 | 2,01 | I |
| 0,625 | 0,0011 | 1,01 | I |
| 0,312 | 0,037 | 0,99 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,24 | I |
| 0,078 | 0,075 | 1,12 | I |
| 0,039 | 0,075 | 1,06 | I |

(A) antagonica (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada CIM *L. origanoides* (TI 136) = 0,625 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 42- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Candida albicans* ATCC 10231

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|-------|-----------|
| 5,0 | 0,0011 | 16,03 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 8,03 | A |
| 1,25 | 0,0011 | 4,03 | A |
| 0,625 | 0,0011 | 2,03 | I |
| 0,312 | 0,0011 | 1,03 | I |
| 0,156 | 0,075 | 1,5 | I |
| 0,078 | 0,075 | 1,25 | I |
| 0,039 | 0,075 | 1,12 | I |

(A) antagonista (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 136) = 0,312 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Tabela 43- Avaliação do efeito combinatório de óleo essencial de *Lippia origanoides* (TI 136- carvacrol) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) com Tween 80® e Nipagin® (%) frente à *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

| CIM <i>L. origanoides</i> (TI 136) ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) | CIM Nipagin® (%) | ICIF | Interação |
|--|------------------|------|----------------|
| 5,0 | 0,0011 | 4,01 | A |
| 2,5 | 0,0011 | 2,01 | I |
| 1,25 | 0,0011 | 1,01 | I |
| 0,625 | 0,0011 | 0,51 | A ⁺ |
| 0,312 | 0,037 | 0,74 | A ⁺ |
| 0,156 | 0,075 | 1,12 | I |
| 0,078 | 0,075 | 1,06 | I |
| 0,039 | 0,075 | 1,03 | I |

(A) antagonista (A⁺) aditiva (I) indiferente ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM *L. origanoides* (TI 136) = 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ CIM Nipagin® = 0,075 %

Os efeitos sinérgicos e aditivos obtidos com as combinações de Nipagin® com óleo essencial de *L. origanoides* TI45- carvacrol e *L. origanoides* TI128- timol, e entre esses dois óleos, são interessantes, pois uma combinação sinérgica ou aditiva oferece um maior espectro de ação, e ainda reduzem as pressões seletivas e a emergência da resistência (SUEKE et al., 2010).

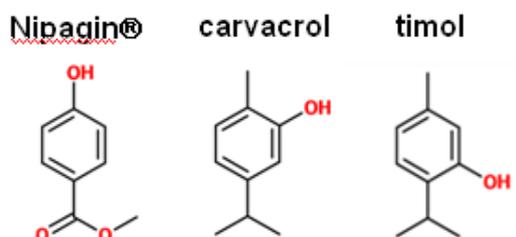
Patrone et al. (2010) sugere que o aumento na permeabilidade da membrana celular causada pelos constituintes do óleo essencial facilita a entrada de conservantes na bactéria, o que explica a efetividade do mecanismo de sinergismo entre Nipagin® com óleo essencial de *L. origanoides* TI45- carvacrol e *L.*

origanoides TI128- timol. Timol e carvacrol poderiam aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática, promovendo o acesso facilitado do Nipagin® para dentro da célula.

Outra possibilidade que tem sido sugerida é que os diferentes antimicrobianos têm diversos mecanismos de ação, atacando sítios distintos. (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O efeito aditivo pronunciado dessas combinações pode ser ainda devido às estruturas similares do carvacrol, timol e Nipagin® (Figura 7). Geralmente, compostos com estruturas similares exibem mais efeito aditivo que sinérgico BASSOLÉ; JULIANI (2012).

Figura 7- Semelhança estrutural entre os compostos carvacrol, timol e Nipagin®



Fonte: Autora.

Assim como os resultados obtidos a partir da combinação de *L. origanoides* TI 45-carvacrol com *L. origanoides* TI 40- endo-fencol , o sinergismo entre carvacrol e outros monoterpenos, a exemplo de α -pineno, canfeno, mirceno, α -terpineno e *p*-cimeno, que tipicamente mostraram baixa atividade antimicrobiana, tem sido demonstrado (ULTEE et al., 2000; de AZEREDO et al., 2011) (BASSOLÉ; JULIANI, 2012). A capacidade de esses hidrocarbonos interagirem com a membrana celular facilitaria a penetração do carvacrol dentro da célula (ULTEE et al., 2000; de AZEREDO et al., 2011; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

É importante citar que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode não estar ocorrendo exclusivamente pelas associações entre os compostos majoritários, uma vez que evidências indicam que a ação pode também ocorrer entre os

componentes majoritários e minoritários presentes nos óleos essenciais (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Com base nos resultados dos ensaios antimicrobianos, optou-se por dar sequência aos ensaios de avaliação da eficácia de conservante utilizando-se o óleo essencial de *Lippia origanoides* TI 136- carvacrol associado à Tween 80®, uma vez que tal associação permitiu a redução na CIM do óleo essencial. Outro fator relevante para a utilização deste óleo foi a disponibilidade de grande volume do mesmo, o que foi imprescindível para a realização de todos os ensaios propostos. Além disso, tanto o carvacrol, constituinte majoritário do óleo essencial, como o Tween 80 já constam na lista de substâncias autorizadas para uso em produtos alimentícios pelo FDA (FDA, 1999).

6.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL_{50}) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

Com base nos resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda (Tabela 44) e através do gráfico de valores de porcentagem de morte dos camundongos (em probits) pelo log da dose (Figura 8) foi possível determinar a DL_{50} de $3,548 \text{ g.Kg}^{-1}$ animal.

Uma vez que o óleo essencial de *L. origanoides* TI 136 é composto por 26,3% de carvacrol, a dose responsável por levar 50% dos animais à morte deste princípio ativo foi de $922,48 \text{ mg.Kg}^{-1}$, valores próximos aos já descritos na literatura de 810 mg.Kg^{-1} (ratos, via oral) (CHEMICALLAND21, 2013).

Biapa et al. (2010) avaliou a toxicidade aguda de óleo essencial de *Zingiber officinalis* em camundongos e encontrou que a DL_{50} foi maior que $7,0 \text{ g.Kg}^{-1}$ do animal.

Em estudo realizado por Fandohan et al. (2008), a dose de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (variedade neral e geranial) capaz de levar 50% dos ratos à morte foi de $3,25 \text{ g.Kg}^{-1}$, enquanto que a dose para *Ocimum gratissimum* (timol) foi de $1,75 \text{ g.Kg}^{-1}$ e *Ocimum basilicum* (estragol) foi de $3,25 \text{ g.Kg}^{-1}$.

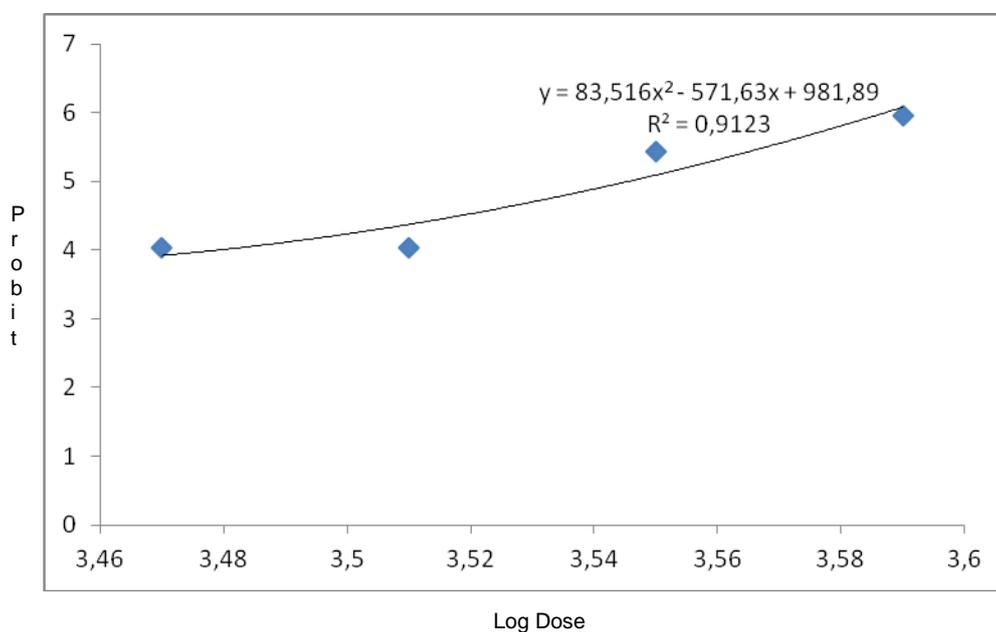
Outro estudo, realizado por Sousa et al. (2008), o valor da DL_{50} encontrado para o óleo essencial de *Piper aduncum* foi de $2,40 \text{ g.Kg}^{-1}$ de massa corpórea.

Considerando que maioria dos trabalhos com DL_{50} de óleos essenciais de plantas muito seguras estão na faixa de 7,0 a 1,75 $g.Kg^{-1}$, e que segundo a União Européia, um composto é determinado muito tóxico quando a DL_{50} é $\leq 25 mg.Kg^{-1}$, tóxico de 25 a $\leq 200 mg.Kg^{-1}$ e nocivo de 200 a $\leq 2000 mg.Kg^{-1}$ (EEC, 2013), é possível afirmar que o óleo essencial de *L. origanoides* não apresenta toxicidade.

Tabela 44- Relação de morte para cálculo de DL_{50} .

| Dose mg/Kg | Log Dose | Total Morte | Percentual de morte % | Correlação % | Probit |
|------------|----------|-------------|-----------------------|--------------|--------|
| 3000 | 3,47 | 1 | 16,7 | 16,7 | 4,0339 |
| 3300 | 3,51 | 1 | 16,7 | 16,6 | 4,0339 |
| 3600 | 3,55 | 4 | 66,7 | 66,7 | 5,4316 |
| 3900 | 3,59 | 5 | 83,3 | 83,3 | 5,9661 |

Figura 8- Gráfico da relação Log Dose pelo probit de óleo essencial de *Lippia origanoides*

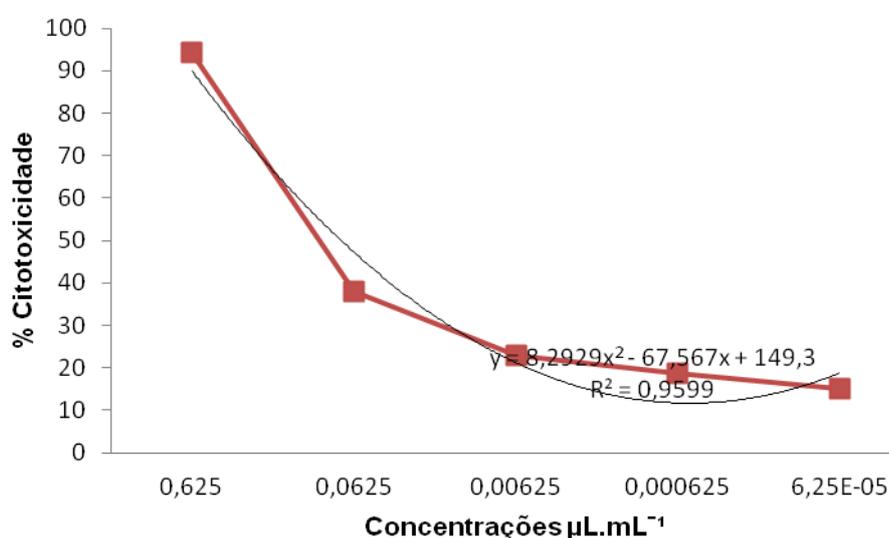


Fonte: Autora.

6.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

De acordo com os dados obtidos pode-se atribuir à concentração de 0,150 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol a capacidade de inibir o crescimento de 50% das células de fibroblasto 3T3 (Figura 9).

Figura 9- IC_{50} de óleo essencial de *Lippia origanoides* (136- carvacrol) frente à células de fibroblasto 3T3



Fonte: Autora

Stammati et al. (1999) avaliou o efeito citotóxico de carvacrol em células animais constatou que a IC_{50} deste ativo é de 0,32 mM (0,048 mg.mL^{-1}). Considerando que a IC_{50} do óleo essencial de *Lippia origanoides* foi de 0,15 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (0,17 mg.mL^{-1}), e que a concentração de carvacrol nesta amostra é de 26,3%, a concentração de carvacrol contida na amostra, capaz de inibir 50% das células é de 0,044 mg.mL^{-1} , valores próximos ao encontrado por Stammati et al. (1999) (ANDERSEN, 2006).

Os dados encontrados nos ensaios de citotoxicidade classificariam o óleo essencial de *L. origanoides* (TI 136-carvacrol) como sendo tóxico. Todavia, sabe-se através dos ensaios com animais realizados que o mesmo não é tóxico. Diante de tais fatos, considera-se ensaios de citotoxicidade com óleos essenciais em células

animais um método não adequado. Tal irreprodutibilidade pode estar relacionada ao acúmulo de metabólitos no sistema de cultura celular e a falta de excreção que ocorreria normalmente *in vivo* (HAYES; MARKOVIC, 2002).

6.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DÉRMICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol) EM PELE DE COELHOS ALBINOS

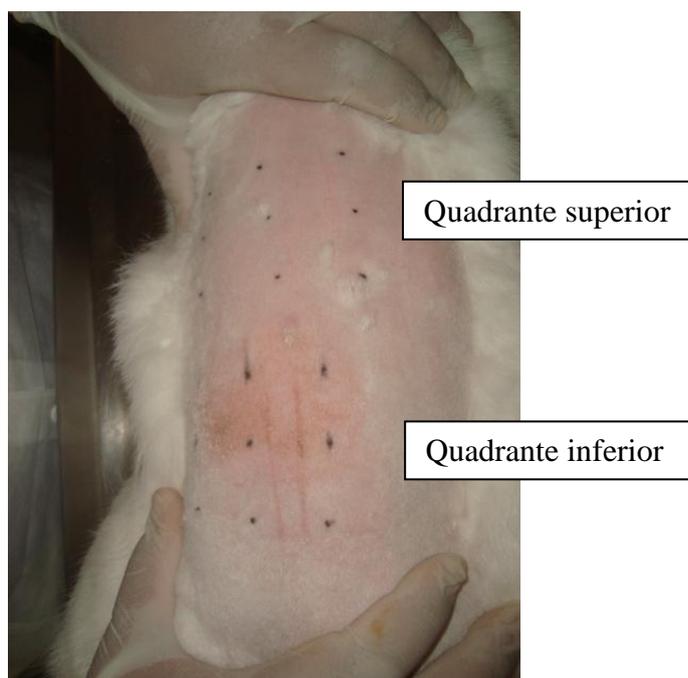
O óleo essencial em solução na concentração de $2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (quadrante superior) quando aplicado no dorso do coelho não mostrou sinais de irritação dérmica, em nenhum dos quadrantes (Figura 10) (quadrante superior do dorso), apresentando índice de irritação cutânea 0. Quando aplicado o óleo puro, observou-se a pele com vermelhidão (quadrante inferior), tanto no lado com ou sem ranhuras, quando comparado com os controles, apresentando eritema leve em 50% dos animais, eritema moderado em 16,7%, e nenhum eritema em 33,3% dos animais. Sinais de edema não foram observados (Tabela 45). As análises levaram a um índice de irritação cutânea de 0,83, o que classifica o óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol como não irritante.

Segundo Pedersen et al. (2007) a permeabilidade de conservantes na pele diminui, conforme diminui a solubilidade em sistemas aquosos e aumenta a lipofilicidade, sendo assim levanta-se a hipótese de que os óleos essenciais por apresentarem características opostas, ou seja, menor solubilidade em água e maior lipofilicidade apresentariam uma menor permeabilidade, gerando menor risco de resíduos em tecidos.

Tabela 45- Valores de Eritema e Edema obtidos pela aplicação de óleo essencial de *Lippia origanoides* TI 136- carvacrol puro após avaliação de 24 e 72 horas em pele normal e com ranhura.

| Animal | Valor Eritema pele normal | Valor Eritema pele com ranhuras | Valor Edema pele normal | Valor Edema pele com ranhuras |
|----------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Coelho 1 | 1 / 1 | 1 / 1 | 0 / 0 | 0 / 0 |
| Coelho 2 | 1 / 1 | 1 / 1 | 0 / 0 | 0 / 0 |
| Coelho 3 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0 |
| Coelho 4 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0 |
| Coelho 5 | 2 / 2 | 2 / 2 | 0 / 0 | 0 / 0 |
| Coelho 6 | 1 / 1 | 1 / 1 | 0 / 0 | 0 / 0 |

Figura 10- Pele do animal após a exposição de óleo essencial de *Lippia origanoides* a $2,5 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ (quadrante superior) e puro (quadrante inferior)



Fonte: Autora.

6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides* (TI 136- carvacrol)

O potencial mutagênico de óleo essencial de *L. origanoides* foi avaliado através da indução de colônias revertentes de *S. typhimurium* com ou sem a mistura S9 (ativação metabólica). Os resultados são apresentados na tabela 46.

O óleo essencial de *L. origanoides* não apresentou qualquer efeito mutagênico, independentemente da ativação metabólica. Entretanto, a concentração de 0,025 µL/placa foi citotóxica para as linhagens TA 97a com e sem ativação, e TA 100 sem ativação. A concentração de 0,018 µL/placa foi tóxica para 97a e TA 100 sem ativação metabólica. Não houve aumento significativo na frequência de revertentes, com razão de mutagenicidade menor que 2, o que caracteriza o óleo essencial de *L. origanoides* como não mutagênico.

Outros autores também relataram o potencial mutagênico de óleo essencial contendo carvacrol como constituinte majoritário. O óleo essencial de *Origanum onites*, contendo carvacrol (74 %) foi testado em concentrações de 0,01 a 1,0 µL/placa, não mostrando-se mutagênico para TA 97a e TA 100, exceto na concentração 0,05 µL/placa na presença de ativação metabólica (IPEK et al., 2005). As diferenças encontradas neste estudo podem estar relacionadas ao sinergismo entre o carvacrol e os demais constituintes do óleo essencial, além da própria concentração do carvacrol.

Estes resultados indicam que o óleo essencial de *L. origanoides*, nas concentrações avaliadas, apresentou-se seguro para uso como conservante. Segundo Ipek, et al., (2005) o carvacrol apresenta característica de proteção à agentes genotóxicos, assim o óleo essencial de *L. origanoides* por ter como constituinte majoritário o carvacrol pode ser um composto antimutagênico.

Tabela 46- Atividade mutagênica expressa pela média do número de colônia revertentes, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens de TA 98, TA 97a e TA 100 de *Salmonella typhimurium* expostas à varias doses de óleo essencial de *Lippia organoides* TI 136- carvacrol, com e sem ativação metabólica (S9).

| Tratamento (μ L/placa) | TA 98 | | TA 97a | | TA 100 | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 |
| | Número de colônias revertentes | | | | | |
| 0,025 | 9,7 \pm 3,5 (0,82) | 16 \pm 2,6 (0,88) | 121 \pm 4,3 (0,72) | 142,7 \pm 18,56 (0,74) | 81 \pm 9,5 (0,68) | 129 \pm 10,4 (0,99) |
| 0,018 | 13,7 \pm 1,5 (1,17) | 16,3 \pm 2,3 (0,9) | 133,7 \pm 20,5 (0,79) | 175,3 \pm 41,7 (0,92) | 64,7 \pm 15,0 (0,54) | 131 \pm 16,0 (1,01) |
| 0,0125 | 13,7 \pm 4,6 (1,17) | 16,3 \pm 7,5 (0,9) | 140,3 \pm 21,5 (0,83) | 163,3 \pm 20,6 (0,85) | 123 \pm 10,5 (1,03) | 138,3 \pm 7,0 (1,06) |
| 0,00625 | 13 \pm 3,6 (1,1) | 15,7 \pm 3,8 (0,87) | 182,7 \pm 20,5 (1,09) | 180,3 \pm 4,6 (0,94) | 114 \pm 3,0 (0,96) | 145 \pm 6,0 (1,12) |
| 0,003125 | 16 \pm 2,0 (1,37) | 17,3 \pm 4,6 (0,96) | 173,7 \pm 20,5 (1,03) | 197,7 \pm 30,3 (1,03) | 120 \pm 9,2 (1,01) | 151 \pm 27,8 (1,06) |
| 0,00156 | 14 \pm 1,7 (1,2) | 20,3 \pm 1,5 (1,12) | 197,3 \pm 16,2 (1,18) | 195,3 \pm 10,5 (1,02) | 115,7 \pm 5,8 (0,97) | 141,7 \pm 18,1 (1,09) |
| DMSO, 100 | 11,7 \pm 0,6 | 18 \pm 3,0 | 167,3 \pm 6,7 | 190,7 \pm 21,5 | 118,7 \pm 0,6 | 129,3 \pm 14,6 |
| NPD 100 | 262 \pm 10,8 | - | 558,7 \pm 17,2 | - | 458 \pm 35,6 | - |
| 2-ANTR | - | 1105,7 \pm 58,0 | - | 1486,7 \pm 240,7 | - | 1374,7 \pm 188,7 |
| Não tratada | 14 \pm 1,7 | 16,3 \pm 16,3 | 190,7 \pm 23,4 | 182 \pm 10,0 | 134,3 \pm 12,7 | 148 \pm 8,2 |

M \pm SD = média \pm desvio padrão.

6.7 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM ALIMENTO

6.7.1 Atividade do sistema conservante em suco de laranja

A escolha do microrganismo *A. acidoterrestris* como desafiante do conservante desenvolvido em suco de laranja, é devido à grande preocupação por parte das indústrias brasileiras de suco, uma vez que tal bactéria é tolerante ao meio ácido, e apresentam esporos resistentes ao processo de pasteurização, o que dificulta sua eliminação, tornando o suco mais susceptível ao processo de deterioração.

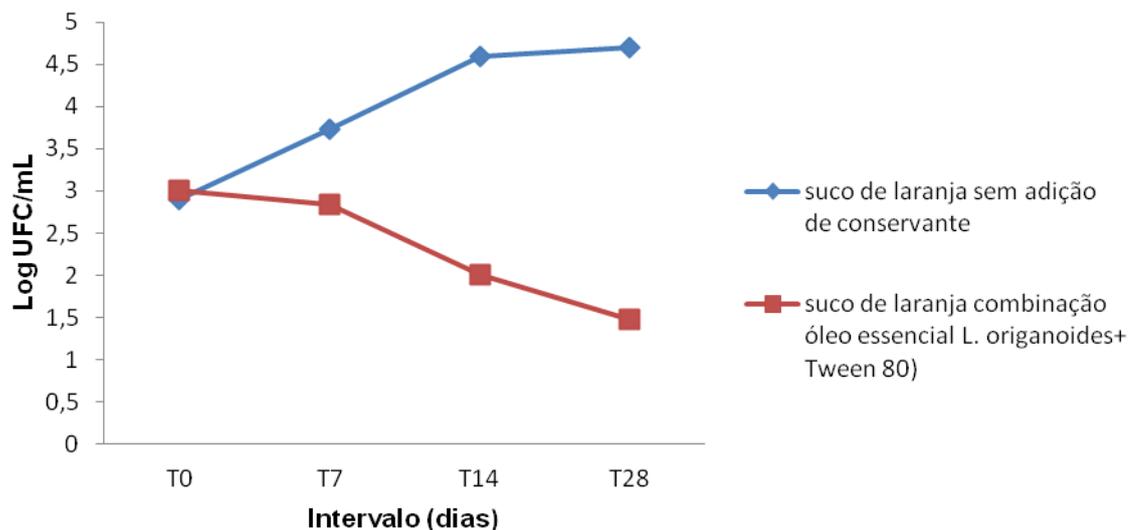
As contagens nas amostras inoculadas com este microrganismo evidenciaram uma queda no número de esporos viáveis ao longo dos 28 dias, caracterizando o sistema conservante como bactericida (Tabela 47).

Tabela 47- Número de esporos sobreviventes (Log de UFC.mL⁻¹) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja reconstituído com e sem adição do sistema conservante no período de 0 a 28 dias.

| Amostra | T0 | T7 dias | T14 dias | T28 dias |
|---|-----|-----------------------------|----------|----------|
| | | Log UFC.mL ⁻¹ | | |
| Suco de laranja sem conservante | 2,9 | 3,73 | 4,6 | 4,7 |
| Suco de laranja com combinação óleo essencial + Tween 80® | 3,0 | 2,84 | 2,0 | 1,47 |

Aos 28 dias observou-se redução de 1,53 Log de UFC.mL⁻¹ em suco de laranja com adição de conservante, enquanto que o controle aumentou 1,8 Log de UFC.mL⁻¹ (Figura 11).

Figura 11- Perfil de redução de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja contendo ou não sistema conservante de óleo essencial de *Lippia origanoides* TI 136- carvacrol com Tween 80®



Fonte: Autora.

Assim como no trabalho de Kawase et al. (2009), os dados apresentados no presente estudo mostraram que ocorreu uma maior redução na contagem de esporos nas duas primeiras semanas, ou seja, o sistema conservante utilizado foi mais ativo na fase exponencial do que na fase estacionária. Isso pode ser explicado pela curva de crescimento bacteriano, pois neste período as células estão metabolicamente mais ativas, portanto mais sensíveis (EMIN, 1992).

Ainda em relação ao trabalho de Kawase et al. (2009), os autores observaram um aumento nos ciclos de log ao longo de 28 dias nas amostras sem conservantes, comparado com a contagem inicial, enquanto que em amostras de sucos contendo o conservante benzoato, ou ácido benzóico, não houve aumento do número de células da contagem inicial. Ao ensaiar ácido benzóico micronizado os autores alcançaram uma redução de 1 ciclo log ao longo de 28 dias. Este valor foi semelhante ao encontrado neste trabalho com óleo essencial de *L. origanoides* o que o caracteriza como promissor conservante para utilização em suco de laranja, devido à semelhança à ação com o ácido benzóico, um dos conservantes comerciais mais utilizados.

Os sucos de frutas, em geral ácidos, contém água, açúcar, ácidos orgânicos, vitaminas, entre outros, que proporcionam um ambiente favorável para contaminação microbiana adaptada a meio ácido, como o *Alicyclobacillus* (BEVILACQUA et al., 2011). A vantagem da utilização de óleo essencial de *L. origanoides* é a sua efetividade em meio ácido e portanto, a sua eficácia contra o *A. acidoterrestris*.

6.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de suco de laranja contendo sistema conservante

O suco de laranja contendo o sistema conservante desenvolvido quando avaliado frente às linhagens *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *C. albicans* ATCC 10231 mostrou-se ativo, uma vez que possibilitou a inibição do crescimento em concentrações de até 4 vezes menores que a inicialmente testada, porém mostrou-se bacteriostático/fungistático (Tabela 48).

A efetividade do óleo como conservante em suco de laranja no ensaio de “Desafio de Conservante” mostrou atividade bactericida e no teste de determinação da CIM o suco com o conservante foi microbiostático. Esta contradição mostra que ensaios de atividade antimicrobiana de alimentos não devam ser executados por metodologias de microdiluição, sendo necessárias modificações na metodologia, bem como na interpretação dos resultados para que tais métodos sejam viáveis.

Tabela 48- Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) de suco de laranja com e sem adição do sistema conservante.

| Amostra | <i>A. acidoterrestris</i> | <i>A. brasiliensis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | $\mu\text{L.mL}^{-1}$ | | |
| Suco de laranja sem conservante | 500/>500 | - | - | 250/>500 | 500/>500 | - |
| Suco de laranja com 0,125% combinação óleo essencial + Tween 80 | 250/>500 | - | 500/>500 | 250/>500 | 250/>500 | 500/>500 |
| Anfotericina B | - | 4/4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 2/2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | - | - | |
| Sulf. Gentamicina | 8/8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | - | - | 16/16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,0/1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 8,0/8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |

(-) não ensaiado

6.7.3 Avaliação das características sensoriais e pH do suco de laranja

Não houve alterações no aspecto, cor e pH dos sucos com e sem conservante ao longo do período de avaliação. Também não houve mudança no suco contendo o sistema conservante em relação ao que não continha.

O suco de laranja ao qual foi adicionado o conservante apresentou intensa alteração de sabor e odor quando comparado ao controle, mas mostrou-se constante ao longo dos dias.

Uma possibilidade para utilização do sistema conservante desenvolvido em suco de laranja e outros alimentos, sem causar danos as características sensoriais, seria a utilização de concentrações menores, porém associadas à outras técnicas como pressão hidrostática, ou mesmo a incorporação do óleo essencial em polímeros com liberação controlada durante estocagem, como sugerido por Buonocore et al. (2004).

6.8 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

6.8.1 Teste de eficácia do conservante

6.8.1.1 Validação da metodologia através da escolha de neutralização do sistema conservante

O ensaio de padronização do sistema neutralizante faz-se necessário para escolha do agente capaz de inativar o conservante contido no produto, impedindo assim, que o mesmo interfira no crescimento do microrganismo.

Para todos os microrganismos ensaiados houve uma recuperação de $\geq 70\%$ com a utilização do neutralizante Dey Engley®, concluindo que tal neutralizante foi efetivo para ser utilizado no teste de desafio do conservante (Tabela 49).

Tabela 49- Recuperação de microrganismos viáveis em UFC.g⁻¹ para validação do sistema neutralizante em diferentes preparações farmacêuticas.

| Amostra | <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | <i>E. coli</i> ATCC 8739 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| | UFC.g ⁻¹ | | | | |
| Creme sem conservante | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |
| Creme com combinação óleo essencial + Tween 80® | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |
| Xarope sem conservante | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |
| Xarope com combinação óleo essencial + Tween 80® | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |
| Xampu sem conservante | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² |
| Xampu com combinação óleo essencial + Tween 80® | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² |
| Controle Solução Salina | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |
| Controle neutralizante | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 1.10 ² | 2.10 ² |

6.8.1.2 Teste eficácia do sistema conservante

O teste de desafio é utilizado para avaliar a efetividade de um sistema conservante contra contaminação microbiológica durante a vida útil de um produto acabado (CTFA, 2003).

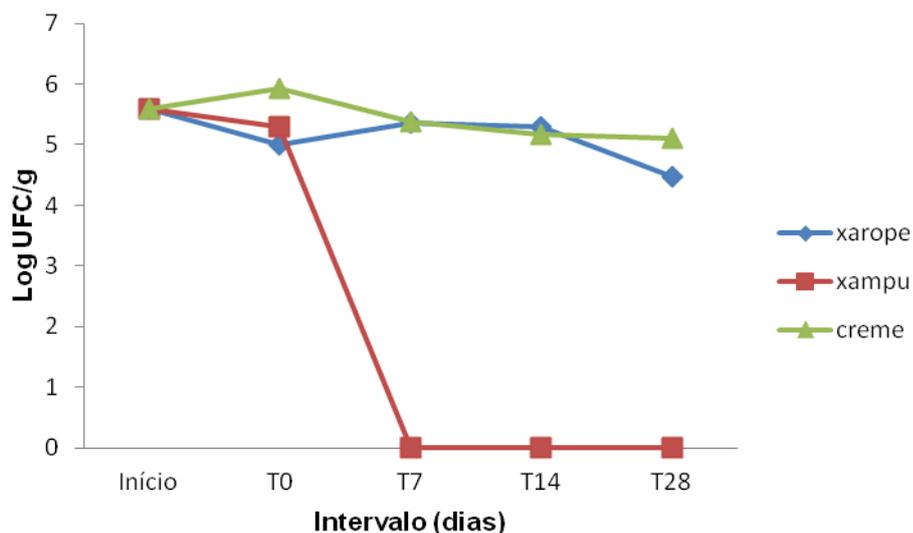
Durante os testes, o conservante à base de *L. origanoides* mostrou-se efetivo frente à todos os microrganismos desafiantes quando presente em xampu e xarope, atendendo às exigências da Farmacopéia Americana (USP 34- NF29, 2010). Todavia, quando presente no creme o mesmo não foi efetivo contra desafiantes bacterianos, não havendo redução de Log de UFC ao longo do período analisado, apresentando-se eficaz somente frente a fungos (Tabela 50).

Tabela 50- Número de sobreviventes (Log de UFC.g⁻¹) de *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em preparações farmacêuticas com e sem adição do sistema conservante.

| Amostra | Microrganismos | Inóculo solução salina | T0 | T7 dias | T14 dias | T28 dias |
|--|------------------------|------------------------------|------|------------|-------------|-------------|
| Creme sem conservante | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,69 | 5,0 | 5,0 | 5,4 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 6,4 | 6,0 | 5,95 | 6,17 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 6,3 | 6,14 | 5,87 | 5,6 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 6,44 | 6,51 | 6,74 | 6,55 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 6,47 | 5,11 | 4,0 | 4,0 |
| Creme com combinação óleo essencial + Tween 80® | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,92 | 5,38 | 5,17 | 5,11 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 5,57 | 5,57 | 5,84 | 5,82 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 6,0 | 6,25 | 6,17 | 6,36 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 6,23 | 6,0 | 6,4 | 6,6 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 6,0 | 5,69 | 6,3 | 6,2 |
| Xarope sem conservante | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,30 | 5,46 | 5,23 | 4,30 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 5,7 | 4,86 | 3,8 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 5,77 | 2,47 | 2,0 | 0 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 5,6 | 4,39 | 3,0 | 0 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 5,97 | 4,6 | 4,0 | 3,0 |
| Xarope com combinação óleo essencial + Tween 80® | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,0 | 5,36 | 5,3 | 4,47 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 5,64 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 5,0 | 4,0 | 0 | 0 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 5,6 | 4,9 | 0 | 0 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 5,94 | 4,76 | 4,11 | 0 |
| Xampu sem conservante | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,3 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 5,98 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 6,0 | 2,0 | 0 | 0 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |
| Xampu com combinação óleo essencial + Tween 80® | <i>A. brasiliensis</i> | 5,59 | 5,3 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>C. albicans</i> | 6,0 | 5,93 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 6,0 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 6,0 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>S. aureus</i> | 5,98 | 6,0 | 0 | 0 | 0 |

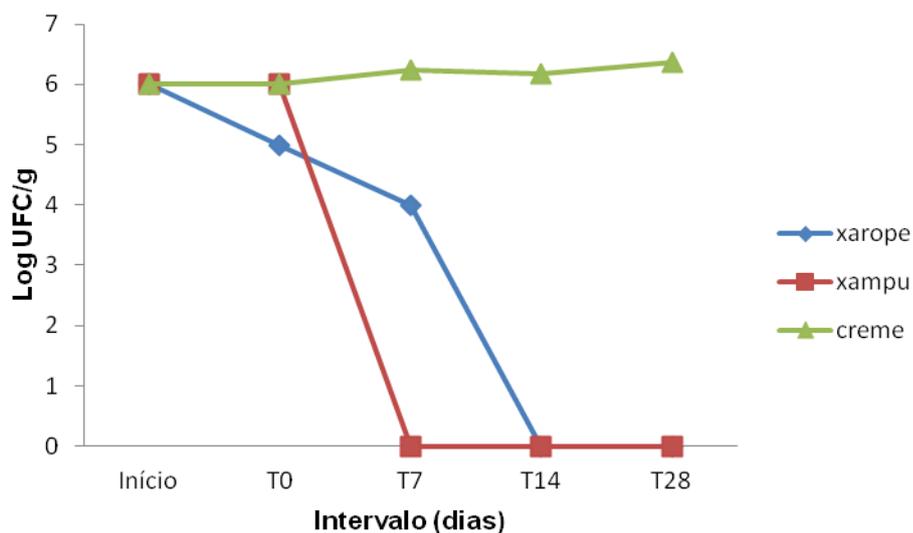
Em preparações creme, o sistema conservante demonstrou características bacteriostáticas e fungistáticas. Em xarope o mesmo mostrou-se bactericida, fungicida frente à *C. albicans* e fungistático frente à *A. brasiliensis*. Já na formulação de xampu o mesmo apresentou-se bactericida e fungicida (Figuras 12 a 16).

Figura 12- Gráfico do perfil de redução de Log de UFC.g⁻¹ de *Aspergillus brasiliensis* em preparações farmacêuticas contendo sistema conservante



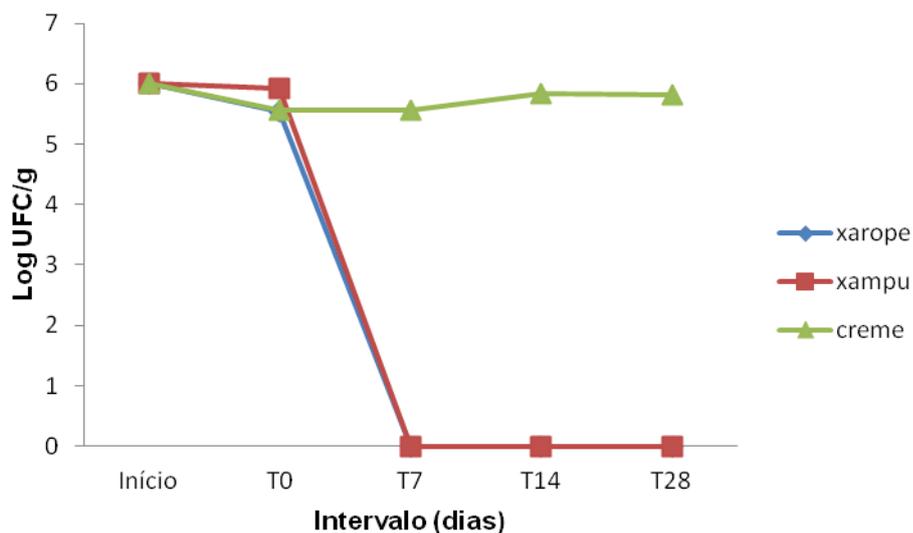
Fonte: Autora.

Figura 13- Gráfico do perfil de redução de Log de UFC.g⁻¹ de *Candida albicans* em preparações farmacêuticas contendo sistema conservante



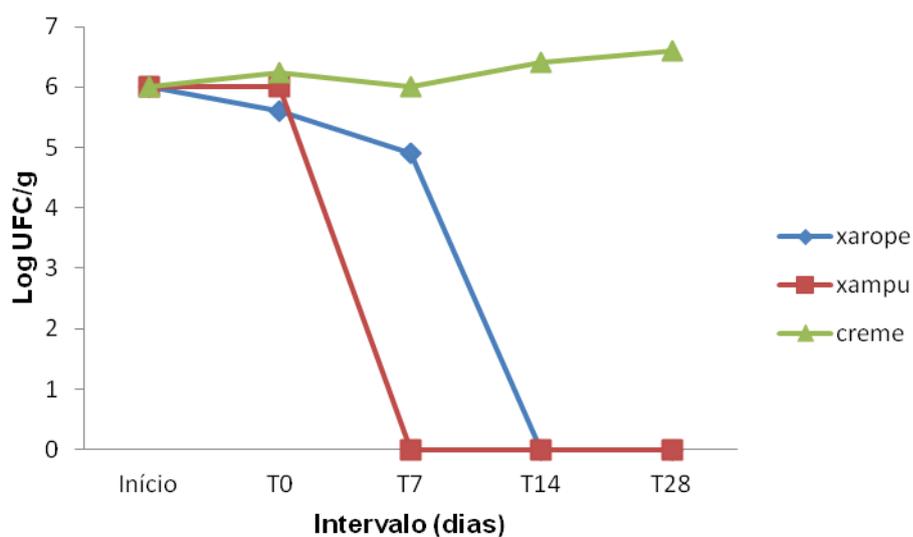
Fonte: Autora.

Figura 14- Gráfico do perfil de redução de Log de UFC.g⁻¹ de *Escherichia coli* em preparações farmacêuticas contendo sistema conservante



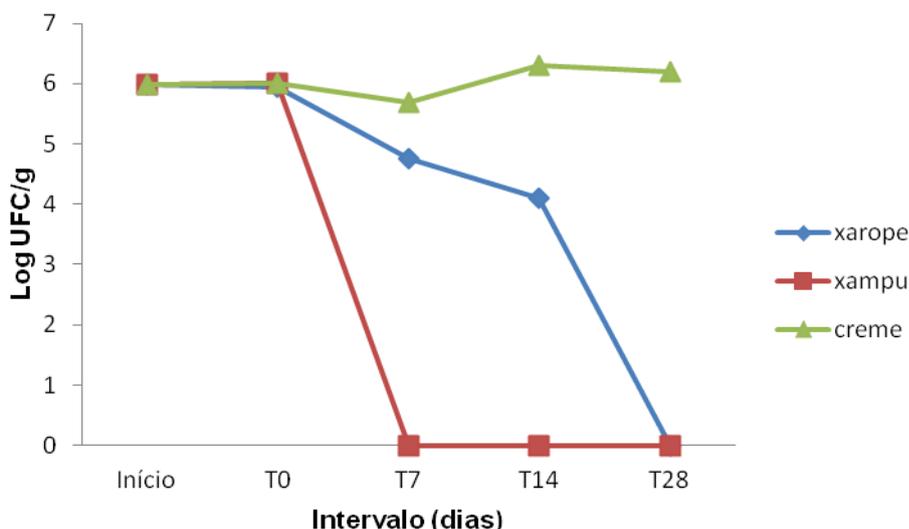
Fonte: Autora.

Figura 15- Gráfico do perfil de redução de Log de UFC.g⁻¹ de *Pseudomonas aeruginosa* em preparações farmacêuticas contendo sistema conservante



Fonte: Autora.

Figura 16. Gráfico do perfil de redução de Log de UFC.g⁻¹ de *Staphylococcus aureus* em preparações farmacêuticas contendo sistema conservante



Fonte: Autora.

O aumento na concentração do conservante poderia levar a uma melhora na ação antimicrobiana na formulação creme, porém isso poderia acarretar em alterações nas características organolépticas e sensoriais da formulação, além de alterações físico-químicas, podendo levar ainda ao aparecimento de reações alérgicas, uma vez que estudos relatam que alergenicidade de cosméticos está relacionada a concentração de conservantes (CHOI et al., 2004; LUNDOV et al., 2009).

O conservante mostrou-se mais ativo nas preparações em sistemas aquosos frente à todos os microrganismos, e de maneira geral mais ativo frente à *C. albicans* e bactérias Gram negativas.

Os resultados encontrados neste trabalho não corroboram aos obtidos por Maccioni et al. (2003), pois ao avaliarem o efeito conservante de óleos essenciais em preparações creme (O/A) e hidrogéis, mostraram que os microrganismos Gram positivos foram mais sensíveis que os negativos, além de não terem sido eficazes frente à *C. albicans*. Ainda segundo esses autores, a efetividade dos óleos avaliados foi atribuída a características específicas da membrana das células bacterianas.

Diversos fatores influenciam na ação dos conservantes, como pH, temperatura, constituintes da formulação, e microrganismos contaminantes (RUSSEL, 2003).

Alguns ingredientes podem influenciar potencializando a ação do conservante, ou reduzindo a ação do mesmo (RUSSEL, 2003).

A inatividade do conservante em formulação creme pode estar relacionada à interação do óleo essencial com o tensoativo não iônico (Tween 80®) considerando que ocorre a complexação do óleo na porção hidrofóbica do tensoativo. A afinidade do óleo essencial pelo micéla do surfactante presente na formulação creme pode levar a uma menor disponibilidade do óleo e promover uma parcial neutralização da ação antimicrobiana do mesmo (NOSTRO et al., 2004).

Existem relatos da interação de alguns surfactantes não iônicos que se complexam com os conservantes, comprometendo a ação dos mesmos interferindo na solubilidade destes na porção hidrofílica do surfactante, com a formação de pontes de oxigênio, por exemplo (CTFA, 1995; FIORENTINO; CHORILLI; SALGADO, 2011).

A interação óleo essencial - tensoativo (Tween 80®) pode ter feito com que o conservante se tornasse mais hidrofílico, sendo portanto, pouco ativo em creme e efetivo em sistemas aquosos como xampu e xarope.

Uma outra justificativa para efetividade do óleo essencial em sistemas aquosos é que embora sejam compostos altamente lipofílicos, insolúveis na fase aquosa, em muitos casos eles tem uma relativa hidrofílicidade dada pela presença de constituintes com grupos funcionais polares (NOSTRO et al., 2004) a exemplo do carvacrol, principal componente do óleo essencial de *L. origanoides*, o qual possui solubilidade de 830+/- 10 ppm (parte por milhão), pertencente ao grupo 1 de compostos capazes de formar pontes de hidrogênio. (GRIFFIN et al., 1999).

Observou-se durante a realização do teste de desafio em xampu, que na amostra sem conservante, quando contaminado com *P. aeruginosa* apresentou microrganismo com sete dias, o que pode ser explicado pelo fato de tal microrganismo ser especialmente capaz de se adaptar às mudanças no ambiente (FLAWN, MALCOLM, WOODROFFE, 1973). Em estudo conduzido por estes autores os mesmos observaram que tal microrganismo possui a maior atividade de sulfatase, sendo capazes de degradar por hidrólise o grupo sulfato presente nos detergentes. Segundo esses autores ainda, a matéria utilizada na formulação pode

influenciar nos resultados do teste de desafio, uma vez que a mesma amostra pode vir contaminada com substâncias conservantes, o que faria com que um teste de desafio realizado com preparações contendo detergentes conservados, poderiam indicar uma formulação auto-conservante.

6.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações contendo sistema conservante

De maneira geral as preparações farmacêuticas contendo o sistema conservante não apresentaram ação antimicrobiana (Tabela 51), sendo observada ação somente do xampu frente à fungos.

Embora a avaliação e comparação de dados como CIM possa ser o primeiro passo para a escolha de um conservante, os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram que a avaliação da atividade antimicrobiana de preparações através de metodologia de microdiluição preconizadas para substâncias isoladas, bem como a metodologia desenvolvida por Hernandez et al. (2013) para determinação de atividade microbicida não são adequadas para triagem de preparações e sim somente para compostos ativos em meios de cultura.

Tabela 51- Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de creme, xarope e xampu com e sem adição do sistema conservante.

| Amostra | <i>A. brasiliensis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Creme sem conservante | - | - | - | - | - |
| Creme com 0,125% combinação óleo essencial + Tween 80® | - | - | - | - | - |
| Xarope sem conservante | - | - | - | - | - |
| Xarope com 0,125% combinação óleo essencial + Tween 80® | - | - | - | - | - |
| Xampu sem conservante | 2.500/5.000 | 5.000/>5.000 | - | - | - |
| Xampu com 0,125% combinação óleo essencial + Tween 80® | 2,500/5.000 | 5.000/>5.000 | - | - | - |
| Anfotericina B | 4/4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 2/2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | - | - | |
| Sulf. Gentamicina | - | - | 16,0/16,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,0/1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 8,0/8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |

6.8.3 Avaliação das características sensoriais e pH das preparações farmacêuticas

As preparações de creme, xarope e xampu não sofreram alterações no aspecto após a adição do conservante. Nenhuma alteração foi observada também nos tempos T7, T14 e T28 dias em relação ao seu estado inicial no T0.

Em relação à coloração, a formulação creme e xampu não sofreram alterações em nenhum dos períodos avaliados, e nem após a adição do

conservante. A formulação do xarope após a adição do conservante apresentou-se levemente modificada, uma vez que observou-se uma coloração mais amarelada. Porém não houve alteração nos tempos T7, T14 e T28 dias, comparado ao T0.

A formulação creme não apresentou alteração de odor quando comparado com o creme sem conservante, além de não ter sofrido alteração nos períodos de tempo em que ocorreram as análises. As características organolépticas do xarope e xampu foram intensa e levemente modificadas, respectivamente. Porém ao longo do período analisado, não houve alteração quando comparado ao T0.

Quanto ao pH, ao longo do período de 28 dias não houve alterações significativas das preparações contendo o conservante. Observou-se alteração no xarope sem adição do conservante a partir do 14º dia, provavelmente isso ocorreu por este estar sem conservante e conseqüentemente pode ter havido contaminação microbiana, o que alterou o pH (Tabela 52).

Tabela 52- Avaliação da alteração nos valores de pH de preparações farmacêuticas com ou sem adição de sistema conservante no período de 0 a 28 dias.

| Amostra | T0 | T7 dias | T14 dias | T28 dias |
|----------------------------------|---------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Creme sem adição de conservante | - | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração |
| Creme com adição de conservante | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração |
| Xarope sem adição de conservante | - | Sem alteração | Alteração (acidificação) | Alteração (acidificação) |
| Xarope com adição de conservante | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração |
| Xampu sem adição de conservante | - | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração |
| Xampu com adição de conservante | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração | Sem alteração |

7 CONCLUSÕES

- Foram coletadas 117 espécies das quais 93 foram produtivas em óleo essencial com teor acima de 2,5%, sendo que 61% das espécies apresentaram como componente majoritário o carvacrol;
- Foram encontrados quimiotipos dentro das espécies de *Lippia* havendo predominância dos quimiotipos carvacrol e endo-fenchol;
- As melhores atividades antimicrobianas foram obtidas com plantas da família Verbenaceae dentro do gênero *Lippia*;
- Houve sinergismo entre óleos essenciais com diferentes composições químicas e para Nipagin®;
- A DL₅₀ do óleo essencial de *L. origanoides* carvacrol TI 136 foi de 3,5 g.Kg⁻¹ animal;
- A IC₅₀ do óleo essencial de *L. origanoides* carvacrol TI 136 em células de fibroblasto de camundongo foi de 0,150 µL.mL⁻¹;
- O óleo essencial de *L. origanoides* carvacrol TI 136 não apresentou potencial de irritação dérmica;
- O óleo essencial mostrou-se negativo para o teste de Ames, apresentando-se não mutagênico;
- O sistema conservante desenvolvido alterou as características organolépticas e sensoriais de suco de laranja e xarope;
- O sistema conservante foi eficaz em suco de laranja e preparações farmacêuticas de bases aquosas;
- A combinação de óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol com Tween 80® pode vir a ser utilizado como sistema conservante em suco de laranja e xarope, desde que novos ensaios sejam realizados a fim de se melhorar as características sensoriais;
- As metodologias de microdiluição para determinação de CIM e CBM/CFM padronizadas para compostos ativos não tem reprodutibilidade para preparações farmacêuticas e alimentícias;
- O sistema conservante desenvolvido pode ser utilizado como conservante em xampu;
- Com exceção das características sensoriais, o sistema conservante não alterou as preparações e alimento testados quanto seu aspecto e pH;

- O óleo essencial de *L. origanoides* TI 136- carvacrol em associação com Tween80® é promissor agente conservante, principalmente para sistemas aquosos, seguro do ponto de vista toxicológico, porém para que seu uso comercial seja viabilizado são necessários estudos que melhorem suas características organolépticas e sensorias. Provavelmente a tecnologia de encapsulamento possa ser uma solução.

REFERÊNCIAS

- ABU-DARWISH, M.S., et al. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. **BioMed Research International**, p.1-9, 2013.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**. Allured Publ. Corp, Carol Stream, 1995.
- ALMEIDA, J. R.G. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p.638-641, 2006.
- ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International Journal of Toxicology**, v. 25, p.129–127, 2006.
- ARIDOGAN, B.C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of Pharmacal Research**, v.25, n.6, p.860-864, 2002.
- ARRUDA, T. A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.307-311, 2006.
- ARWEILER, N. B. et al. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil - a pilot study. **Clinical Oral Investigation**, v.4, p.70-73, 2000.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 46, p.446-475, 2008.
- BAIRD, R.M.; BLOOMFIELD, S.F. **Microbial quality assurance in cosmetic, toiletries & non-sterile pharmaceuticals**. New York: Taylor & Francis, 258 p, 1996.
- BARR, L. et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. **Journal of Applied Toxicology**, v.32, p.219–232, 2012.
- BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v.17, p.3989-4006, 2012.
- BENKEBLIA N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technol**, v.37, p.263-268, 2004.
- BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.
- BEVILACQUA, A. et al. Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: a review. **Formatex**, p.1157-1166, 2011..

BIAPA, N.P.C. et al. Acute and subacute toxicity studies of *Zingiber officinalis* roscoe essential oil on mice (swiss) and rats (wistar). **African Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacy**, v.1, n.1, p. 39-49, 2010.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.349-356, 2007.

BRANNA, T. *Preservative market update*. **Household and Personal Products Industry**, v. 45, n.5, p.109-128, 2008.

BRANNAN, D.K. (ed.) **Cosmetic microbiology: a practical handbook**. New York, CRC Press, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso 03/2010.

BUONOCORE, G.G. et al. Antimicrobial release systems from highly swellable polymers. **Journal of Food Protection**, v. 67, p.1190–1194, 2004.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CARVALHO Jr, P.M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essencial oil of *Cordia verbenaceae* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.297-301, 2004.

CHEMICALLAND21, disponível em <http://www.chemicalnd21.com>, acesso em 05 de setembro de 2013.

CHEN, J. et al. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.221, n.3, p.278–284, 2007.

CHOI, S. H, et al. Monitoring of cosmetic preservatives in commercial skin creams. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 23, p.60, 2004.

CHORILLI, M. et al. Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.30, n.1, p.10-21, 2009.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, p.22-24, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Document M7-A9. Approved Standard - Ninth Edition, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Document M27A3. Approved Standard-Third Edition, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Document M38-A2. Approved Standard- Second Edition, 2008.

COSMÉTICOS & PERFUMES. **Conservantes**, p. 28-52. Disponível em : <<http://www.insumos.com.br/>>, acesso em 12/02/2014.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. A. Óleos essenciais e química fina. **Revista Química Nova**, v.16, n.3, 1993.

CTFA. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association Microbiology Committee. **Cosmetic & Toiletries**, v.118, p.81-86, 1995.

CTFA. The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association. CTFA Preservative Challenge and Stability Testing Survey. **Cosmetic & Toiletries**, v.118, n.4, p.67-74, 2003.

CUTTER, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.601-607, 2000.

ÇETIN, B. et al. Antimicrobial activities of essential oil and hexane extract of fennel *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell. against foodborne microorganisms. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.1, p.196-204, 2010.

DARBRE, P.D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology** v. 24, p. 5-13. 2004.

DARBRE, P.D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. **Best Pract. Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, p. 121-143, 2006.

DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W.. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 561-578, 2008.

DE AZEREDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v.44, p. 1541–1548, 2011.

DECKER Jr., R.L. Frequency of preservative use in cosmetic formulas as disclosed to FDA – 1984. **Cosmetics & Toiletries**, v.100, p.65-68, 1985.

DELAQUIS, P.J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed

fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.101–109, 2002.

DELGADO, B. et al. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distribution. **Food Microbiology**, v. 21, p. 327-334, 2004.

DRAIZE, J.H.; WOODWARD, D.G.; CALVERY, H.O. Methods for study of irritation and toxicity substances applied to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 377-90, 1944.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

EEC. European Economic Community. Disponível em <<http://www.oehc.uchc.edu>>, acesso em 05/09/2013.

EHIVET, F.E. et al. Characterization and antimicrobial activity of sweetpotato starch-based edibles film containing origanum (*Thymus capitatus*) oil. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, p.178-184, 2011.

EMIN, P. **Influence de paramètres physiologiques et physicochimiques sur l'activité inhibitrice de la nisine vis-a-vis des listerias**. Paris: Memoire, p.59,1992.

FANDOHAN, P. et al. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2493-2497, 2008.

FDA. Food and Drug Administration. **Food Additives permitted for direct addition to food for human consumption**, Part 172, 1999. Disponível em <<http://www.fda.gov>>, acesso em 10/10/2013.

FENG, W.; ZHENG, X. Control of *Alternaria alternata* by cassia oil in combination with potassium chloride or sodium chloride. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1317-1322, 2006.

FINE, D. H. et al. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, p.157-161, 2000.

FIorentino, F. A. M.; CHORILLI, M.; SALGADO H. R. N. The use of the challenge test to analyse preservative efficiency in non-sterile cosmetic and health products: applications and critical points. **Analytical Methods**, v.3, p.790-798, 2011.

FLAWN, P.C.; MALCOLM, S.A.; WOODROFFE, R.C.S. Assessment of the preservative capacity of shampoos. **Journal of the Society of Cosmetics Chemists**, v.24, p. 229-238, 1973.

FONTENELLE, R.O.S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.5, p.934-940, 2007.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê conservantes**, n. 18, p.30-51, 2011. Disponível em <<http://www.revista-fi.com>>, acesso em 12/02/2014

FRANCO, A.L. et al. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L. (Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.iv, n.2, p. 208-220, 2007.

FREDERIKSEN, H.; JORGENSEN, N.; ANDERSSON, A.M.. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, p. 1-10, 2010.

FREITAS, B.R. **Avaliação de atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham. visando sua aplicação como conservante em preparações cosméticas**. 2008. Tese Doutorado do Programa de Pós- Graduação em Farmácia e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 170p., 2008.

FYFE, L.; ARMSTRONG, F.; STEWART, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 9, p.195-199, 1998.

GOULD, G.W. Preservation: Present, past and future. **British Medical Bulletin**, v.56, p.84-96, 2000.

GRIFFIN, S.G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour Fragrance Journal**, v.14, p.322-332, 1999.

HAYES, A.J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.535-543, 2002.

HERNANDES, C. et al. *Flash microbiocide*: A Rapid and Economic Method for Determination of MBC and MFC. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p.850-852, 2013.

HODGSON, I.; STEWART, J.; FYFE, L. Inhibition of bacteria and yeast by oil of fennel and paraben: development of synergistic antimicrobial combinations. **Journal of Essential Oil Research**, 1998.

HOUTMAN, C.J. et al. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 6415- 6423, 2004.

HSOUNA, A.B.; HAMDI, N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. **Lipids in Health and Disease**, v.11, n.167, p.1-7, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n.12, p.1-24, 2012.

IPEK, E. et al. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/ microsomal test. **Food Chemistry**, v.93, p.551-556, 2005.

JANJUA, N.R. et al. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 5564-5570, 2007.

KALEMBA, D., KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003.

KARPANEN, T.J. et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p.1031-1036, 2008.

KAWASE, K.Y.F.; COELHO, G.L.V.; LUCHESE, R.H. Uso de ácido benzóico micronizado na conservação de suco de laranja. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p.1-7, 2009.

LACHOWICZ K.J. et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, 26, p. 209-214, 1998.

LUNDOV, M.D. et al. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. **Contact Dermatitis**, v.60, n.2, p.70-78, 2009.

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

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-215, 1983.

MEEKER, J.D. et al. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 252-257, 2011.

MENDOZA-YEPES, M.J. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v.17, p.47-55, 1997.

MILLER, W.R. **Estrogen and Breast Cancer**. Chapman and Hall: London, 1996.

NGUEFACK, J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v.23, p.377–383, 2012.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v.264, p. 382–388, 1994.

NOSTRO, A. et al. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.395-401, 2004.

NUNES, X. P. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p.642-644, 2006.

OISHI, S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. **Archives Toxicology**, v.76, p. 423-429, 2002.

O'LEARY et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.170, p.197-219, 2012.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v.101, p. 236–240, 2007.

ORTH, D.S.; KABARA, J.J. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. **Cosmetic Toilet.**, v. 113, p. 51-58, 1998.

PAHOJI, M.R. et al. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 943-951, 2011.

PAHOJI, M.R. et al. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and Nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n.2, p. 283-290, 2011(b).

PAN, P. et al. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **Journal of Clinical Periodontology**, v.27, p.256-261, 2000.

PATRONE et al. *In Vitro* Synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v.60, p. 237-241, 2010.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, p.39- 46, 1997.

PEDERSEN, S.; MARRA, F.; NICOLI, S.; SANTI, P. *In vitro* permeation and retention of parabéns from cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v.29, p.361-367, 2007.

PEI, R.S. et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, v. 74, p.379-383, 2009.

PEREIRA, A.A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.887-893, 2008.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

REHDER, V. L. G. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 6, p.67-71, 2004.

ROJAS-GRAU, M.A. et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering** , v.81, p. 634-641, 2007.

RUSSEL, A.D. Challenge Testing: principles and practice. **International Journal of Cosmetic Sciences**, v.25, p.147-153, 2003.

SALVAGNINI, L.E. et al. Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 75-77, 2006.

SANTOS, F.V. **Avaliação da mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado**. 2006. Tese Doutorado Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, São Paulo, 2006.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SEO, S. B. et al. Development of natural preservative system using the mixture of chitosan- *Inula helenium* L. extract. **International Journal of Cosmetic Science** v.24, p.195-206, 2002.

SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, p.19-21, 2003.

SFEIR, J. et al. *In Vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, p. 1-9, 2013.

SHELDON, A.T. JR. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p.1650-1656, 2005.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp.* **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.1289-1296, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre / Florianópolis. Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 387-416, 1999.

SINHA, G.K. ; GULATI, B.C. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. **Indian Perfumer**, v. 34, p. 126–129, 1990.

SIQUEIRA, V.L. **Cuidados microbiológicos em cosméticos e produtos de higiene pessoal**. Informativo CRQ – IV. Artigo técnico, julho/agosto, 2005. Disponível em: <http://www.crq4.or.br/informativo/agosto_2005/pagina08.php>, acesso em 07/01/2007.

SKOCIBUSIC, M.; et al. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. **Fitoterapia**, v. 75, p.733-736, 2004.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202- 1205, 1996.

SOUSA, P.J.C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p. 217-221, 2008.

STAMMATI, A. et al. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food Chemical Toxicology**, v.37, p.813-823, 1999.

SUEKE, H.; KAYE,S.B.; NEAL,T.; HALL,A.; TUFT, S.; PARRY, C.M. An *in vitro* investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. **Immunology and Microbiology**, v.1, n.8, p. 4151-4155, 2010.

TAINTER, D. R.; GRENIS, A. T. **Spices and seasonings**. New York: VCH Publishers, Inc., p. 251, 1993.

TAVARES, S.R. et al. Parabens in male infertility- Is there a mitochondrial connection? **Reproductive Toxicology**, v. 27, p.1-7, 2009.

TRIPATHI, R.; KAUSHIK, D.; TRIPATHI, A.; RASAL, V.P.; KHAN, S.A. Acute and subacute toxicity studies on vetiver oil in rats. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.31, p.71-77, 2006.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474-2478, 2005.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, 1561–1568, 2002.

ULTEE, A.; SLUMP, R.A.; STEGING, G.; SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal Food Protection**, v. 63, 620-624, 2000.

UNNIKRISHNAN, V.; NATH, B.S. Hazardous chemicals in foods. **Indian Journal of Dairy Bioscience**, v.11, p.155-158, 2002.

USP. United States Pharmacopeia. General Chapter <51> **Antimicrobial Effectiveness Testing**, USP 34-NF29, US Pharmacopeia, Rockville, Maryland, USA, 2010.

USP. United States Pharmacopeia. XXIX ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.14, p.57-67, 2012.

VALERO, M.; GINER, M.J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.90-94, 2006.

VELDHUIZEN, et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of Carvacrol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 1874-1879, 2006.

ZOMORODIAN, K. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Nepeta Cataria* L. against common causes of oral infections. **Journal of Dentistry**, v. 10, n. 4, p.329-337, 2013.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p. 1445-1450, 2008.

YE, X. et al. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.12, p. 1843-1846, 2006.

ANEXO A

<http://www.ibama.gov.br>

AUTORIZAÇÕES ESPECIAIS DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO
AUTORIZAÇÃO n° 002/2009

**Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) (Processo Principal n°
02001.000466/2009-77)**

6. Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais como conservantes em produtos farmacêuticos e alimentícios, coordenado pela Dra. Ana Maria Soares Pereira (Processo n° 02001.005063/2011-39).

ANEXO B



Comitê de Ética



em Pesquisa

Ribeirão Preto, 16 de novembro de 2010

Prezado(a) Senhor(a) Prof(a) Dr.(a) Ana Maria Soares Pereira

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Sêres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS E ALIMENTÍCIOS" tendo como pesquisador(a) Prof(a) Dr(a) Ana Maria Soares Pereira, em reunião ocorrida em 07 de maio de 2010, registrado sobre o ComÊt: 038/2010.

Temos a ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Profª Drª Luciana Bezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Sêres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP