



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB**  
**PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS – PPGFARMA**

**PRISCILA ABREU PIMENTA**

**POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum*  
*Vulgare*) COMO ALTERNATIVA PARA USO COMO CONSERVANTE  
EM SISTEMAS EMULSIONADOS TÓPICOS**

Salvador

2023

**PRISCILA ABREU PIMENTA**

**POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum  
Vulgare*) COMO ALTERNATIVA PARA USO COMO CONSERVANTE  
EM SISTEMAS EMULSIONADOS TÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Milleno Dantas Mota

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bizogne Souto

Linha de Pesquisa: Linha II – Avaliação de Fármacos, Biomarcadores, Produtos Naturais e Sintéticos

**Salvador**

**2023**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Professor Edivaldo Machado Boaventura – UNEB – Campus I  
Bibliotecária: Ana Cristina Gusmão CRB-5 / 844

Pimenta, Priscila Abreu

Potencial do óleo essencial de orégano (*origanum vulgare*) como alternativa para uso como conservante em sistemas emulsionados tópicos / Priscila Abreu Pimenta. – Salvador, 2023.

62 f. : il.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Milleno Dantas Mota.

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo Bizogne Souto.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia Departamento de Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA. 2023.

Contém referências.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Conservante natural 3. Emulsão cremosa. I. Mota, Milleno Dantas. II. Souto, Ricardo Bizogne. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.


CDD : 615.321

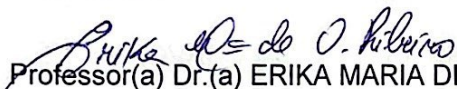
## FOLHA DE APROVAÇÃO


"POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*) COMO ALTERNATIVA PARA USO COMO CONSERVANTE EM SISTEMAS EMULSIONADOS TÓPICOS"

PRISCILA ABREU PIMENTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 20 de setembro de 2023, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

  
Professor(a) Dr.(a) MILLENO DANTAS MOTA  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB  
Doutorado em Biotecnologia  
Universidade Federal da Bahia

  
Professor(a) Dr.(a) ERIKA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB  
Doutorado em Química  
Universidade Federal da Bahia

  
Professor(a) Dr.(a) NEILA DE PAULA PEREIRA  
Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Doutorado em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Universidade Federal do Paraná

Ao meu avô, Nicodemos (*i.m.*).

## AGRADECIMENTOS

É com profunda gratidão que expresso meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de maneira significativa para a realização desta dissertação. Neste momento de conclusão, sinto-me emocionada ao reconhecer a importância de cada indivíduo que esteve ao meu lado nessa jornada desafiadora.

Primeiramente, quero expressar minha imensa gratidão a Deus por me conceder a força, a paz e a saúde física e mental necessárias para enfrentar os obstáculos e concretizar este trabalho. Sua orientação constante iluminou meu caminho e me deu coragem para superar os desafios.

Ao meu amado marido, expresso meu mais profundo agradecimento. Seu amor incondicional, paciência e incentivo constante foram a força motriz por trás deste sucesso. Sua presença ao meu lado tornou esta jornada mais leve e significativa.

À minha querida família, que sempre esteve ao meu lado, agradeço pelo apoio inabalável e amor constante que me envolve.

Ao meu orientador Prof. Milleno, expresso minha sincera gratidão. Sua dedicação, compromisso e responsabilidade foram fundamentais para a qualidade deste estudo. Agradeço por sua orientação valiosa, por compartilhar seus conhecimentos e por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço ao Prof. Ricardo por sua coorientação e contribuições inestimáveis. Sua perspicácia e generosidade enriqueceram este trabalho, tornando-o mais coeso e robusto. Sua orientação, discussões e comprometimento deixaram uma marca profunda e sou sinceramente grata por isso.

À minha turma, agradeço por compartilharmos este trajeto repleto de desafios e aprendizado. Nossas trocas foram enriquecedoras e fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Em especial a minha dupla querida, Ana Paula.

À banca examinadora, agradeço pela disponibilidade em avaliar este trabalho. Suas contribuições e sugestões são preciosas para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFARMA), agradeço por compartilharem seu conhecimento e experiência, moldando meu percurso acadêmico de maneira significativa.

À dedicada secretária do programa, Léia, minha gratidão pela atenção, paciência e suporte em todos os momentos. Sua disposição em auxiliar fez toda a diferença.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram presentes nessa jornada, meu sincero agradecimento. Esta dissertação não é apenas minha, mas sim um reflexo do apoio, amor e contribuições generosas de todos vocês.

Que este trabalho possa contribuir para o avanço do conhecimento em nossa área e inspirar outros a perseguirem suas paixões acadêmicas. Com humildade e gratidão, encerro este capítulo, olhando para o futuro com esperança e determinação.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

PIMENTA, P. A. **Potencial do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare*) como alternativa para possível uso como conservante em sistemas emulsionados tópicos** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023; 62p.

Bases dermatológicas são destinadas a veicular os mais diversos fármacos, e em geral, possuem uma mistura de lipídeos e água, o que propicia o crescimento de diversos microrganismos. A inclusão de conservantes na formulação é um fator imprescindível para garantir a qualidade e a estabilidade microbiológica das preparações. Em geral, os óleos essenciais podem ser considerados como potenciais agentes conservantes naturais, pois são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais e antimicóticas. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial conservante do óleo essencial de orégano em bases dermatológicas. O estudo foi conduzido com um delineamento laboratorial experimental, utilizando óleo essencial de orégano, realizando avaliação antimicrobiana, estudo de pré-formulação de base dermatológica, testes de estabilidade e de prateleira. Observou-se que o óleo essencial de orégano utilizado conseguiu inibir *C. albicans* a partir de uma concentração de 0,312%; *E. coli* a partir de 0,625% e *S. aureus* a partir de 1,25%; e *P. aeruginosa* < 0,156%. A incorporação do óleo na base não gerou alterações significativas, dessa forma concluiu-se que o OE de orégano apresenta potencial conservante natural. Contudo, mais investigações são necessárias para determinar as concentrações ideais do OE de orégano como agente antimicrobiano e é fundamental avançar com testes desafio, alergênicos e toxicológicos desses produtos. Os achados desta pesquisa desdobram variadas possibilidades para o desenvolvimento de um produto inovador, seguro e com viabilidade para pedido de propriedade industrial do tipo patente de invento.

**Palavras-chave:** óleos essenciais; conservante natural; emulsões cremosas.

## ABSTRACT

PIMENTA, P. A. **Potential of essential oil of oregano (*Origanum Vulgare*) as an alternative for possible use as a preservative in described emulsified systems** (dissertation). Salvador: Department of Life Sciences, Bahia State University, 2023; 62p.

Dermatological bases are designed to deliver the most diverse drugs, and in general, they contain a mixture of lipids and water, which promotes the growth of different microorganisms. The inclusion of preservatives in the formulation is an essential factor to guarantee the quality and microbiological stability of the disciplines. In general, essential oils can be considered as potential natural preservative agents, as they are known for their antimicrobial, antifungal, antioxidant, antiviral and antimycotic properties. The objective of this research was to evaluate the conservative potential of oregano essential oil on a dermatological basis. The study was conducted with an experimental laboratory design, using oregano essential oil, carrying out antimicrobial evaluation, dermatological-based pre-formulation study, stability and shelf tests. Note that the oregano essential oil used was able to inhibit *C. albicans* from a concentration of 0.312%; *E. coli* from 0.625% and *S. aureus* from 1.25%; and *P. aeruginosa* < 0.156%. The incorporation of the oil into the base did not generate significant changes, thus it was concluded that the oregano EO has natural preservative potential. However, further investigations are possible to determine the ideal concentrations of oregano EO as an antimicrobial agent and it is essential to move forward with the testing, allergen and toxicological challenge of these products. The findings of this research unfold into several possibilities for the development of an innovative, safe product that can be applied for industrial property in the form of an invention patent.

**Keywords:** essential oils; natural preservative; creamy emulsions.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**µg** - micrograma

**CBM** - concentração bacteriana mínima

**CIM** - concentração inibitória mínima

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EPO** - Escritório Europeu de Patentes

**FDA** - Food and Drug Administration

**INPI** - Instituto Nacional da Propriedade Intelectual

**mg** - miligramas

**mL** – mililitro

**m/m** - relação massa/massa

**OE** – óleo essencial

**RNA** - ácido ribonucleico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Estrutura da pele e suas camadas .....	17
<b>Figura 02.</b> Estruturas químicas dos principais agentes conservantes usados em produtos farmacêuticos: a) ácido benzóico; b) ácido sórbico; c) clorocresol; d) fenoxietanol; e) metilparabeno; f) propilparabeno, e; g) triclosan. ....	21
<b>Figura 03.</b> Ramo fresco de orégano ( <i>Origanum Vulgare L.</i> ) .....	25
<b>Figura 04.</b> Resultados da prospecção de patentes depositadas no EPO entre o período de julho/2020 a junho/2022, por país, de acordo com os critérios de busca previamente definidos. ....	33
<b>Figura 05.</b> Fluxograma para seleção dos estudos .....	35
<b>Figura 06.</b> Fluxograma das etapas da metodologia utilizada .....	42
<b>Figura 07.</b> Esquema representativo da placa de microdiluição de <i>Candida albicans</i> .....	46
<b>Figura 08.</b> Esquema representativo da placa de microdiluição de <i>Escherichia coli</i> .	46
<b>Figura 09.</b> Esquema representativo da placa de microdiluição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo da placa de microdiluição de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
<b>Figura 11.</b> Formulações armazenadas em estufa.....	53
<b>Figura 12.</b> Formulações armazenadas em geladeira.....	53
<b>Figura 13.</b> Formulações armazenadas em temperatura ambiente.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Limites microbianos para produtos farmacêuticos.....	20
<b>Tabela 02.</b> Fórmula do creme base não-iônico .....	28
<b>Tabela 03.</b> Estudos envolvendo avaliação de atividade antimicrobiana do OE de Orégano .....	36
<b>Tabela 04.</b> Diluições realizadas em tubos.....	44
<b>Tabela 05.</b> Atividade do Óleo Essencial de Orégano sobre os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> .....	48
<b>Tabela 06.</b> Fórmulas desenvolvidas.....	52

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 PELE.....	17
3.2 BASES DERMATOLÓGICAS.....	18
3.3 ESTABILIDADE BIOLÓGICA DE BASES DERMATOLÓGICAS .....	19
3.4 CONSERVANTES .....	20
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	23
<b>3.5.1 Óleo essencial de orégano</b> .....	<b>24</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 PROSPECÇÃO TEÓRICA .....	26
<b>4.1.1 Revisão integrativa</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1.2 Prospecção de patentes</b> .....	<b>26</b>
4.2 AMOSTRAS.....	27
4.3 ESTUDO DE FORMULAÇÃO .....	27
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	28
4.5 TESTES DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO .....	29
<b>4.5.1 Avaliação das Características Organolépticas</b> .....	<b>29</b>
4.5.1.1 Aspecto .....	29
4.5.1.2 Cor .....	30
4.5.1.2 Odor.....	30
<b>4.5.2 Avaliação das características físico-químicas</b> .....	<b>31</b>
4.5.2.1 Determinação do valor de pH.....	31
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
5.1 RESULTADOS PRELIMINARES DA PROSPECÇÃO DE PATENTES .....	32
5.2 ARTIGO 1: Atividade Antimicrobiana do óleo essencial de Óregano: uma revisão integrativa. ....	34

<b>5.2.1 Introdução</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2.2 Materiais e métodos</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2.3 Resultados e discussão</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2.4 Conclusão</b> .....	<b>39</b>
5.3 ARTIGO 2: Avaliação da atividade antimicrobiana e potencial conservante do óleo essencial de orégano ( <i>Origanum Vulgare</i> ) .....	40
<b>5.3.1 Introdução</b> .....	<b>40</b>
<b>5.3.2 Materiais e métodos</b> .....	<b>42</b>
5.3.2.1. Substância de teste .....	42
5.3.2.2. Microrganismos .....	43
5.3.2.3 Padronização dos inóculos .....	43
5.3.2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	43
5.3.2.4.1. <i>Preparação das placas</i> .....	44
5.3.2.4.2 <i>Controles</i> .....	44
5.3.2.3.3 <i>Análise da atividade antimicrobiana</i> .....	44
<b>5.3.3 Resultados e discussão</b> .....	<b>45</b>
5.3.3.1 Atividade antimicrobiana .....	45
5.3.3.2 Potencial Conservante .....	49
<b>5.3.4 Conclusão</b> .....	<b>51</b>
5.4 DESENVOLVIMENTO DE BASES CONTENDO O OE DE ORÉGANO .....	51
5.5 TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL .....	52
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>61</b>
ANEXO A - Cromatograma obtido para a amostra OEO-B .....	61
ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo 2. ....	62

# 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1970 já se discutia sobre desenvolvimento sustentável na Conferência das Nações Unidas atrelado a qualidade de vida para as gerações atuais e futuras. No decorrer dos anos o interesse dos consumidores por informações acerca da nocividade ou da capacidade de determinados produtos ou substâncias serem prejudiciais à saúde humana foi aumentando gradativamente (FURTADO, 2020). A partir do início da década de 2010, percebeu-se um aumento exponencial da demanda mundial por produtos farmacêuticos ou cosméticos contendo componentes de origem natural, em virtude de uma maior popularização de informações e conscientização dos consumidores quanto à sustentabilidade. Deste modo é notável o impacto no desenvolvimento de novas formulações, onde cada vez mais insumos sintéticos são substituídos pelos de origem vegetal. Em vista da extensa diversidade fitoecológica e de biomas existentes no Brasil, diversas plantas são utilizadas como insumos no desenvolvimento de formulações, alcançando resultados de produtos pioneiros e inovadores (SILVA et al., 2019).

A escolha de um veículo adequado, ou bases para o preparo de formulações, e dos insumos que o compõe, é essencial durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos de uso tópico (medicamentos ou cosméticos). Neste sentido, diferentes bases dermatológicas podem ser desenvolvidas, como géis, cremes e pomadas, com o objetivo de veicular os mais diversos fármacos e ativos. Em geral, essas bases possuem uma mistura de lipídeos, vitaminas, água e outros componentes que propiciam o crescimento de diversos micro-organismos. Em decorrência disto, a inclusão de conservantes na formulação é um fator imprescindível para garantir a qualidade e a estabilidade microbiológica das preparações, impedindo a proliferação microbiana. Há uma grande diversidade de conservantes utilizados no mercado, mas percebe-se uma tendência mundial crescente do uso de produtos e conservantes naturais e mais seguros (SILVA et al., 2019; FALLEH et al., 2020; GALO et al, 2022). Todos os conservantes sintéticos disponíveis no mercado apresentam algum risco de hipersensibilidade, o que corrobora com a importância de novos estudos com conservantes naturais (MATOS; ROSA, 2018). Os parabenos são conservantes utilizados em grande escala na manipulação, mesmo com efeitos tóxicos conhecidos, como o aumento da linhagem

celular cancerígena do tecido mamário; o metilparabeno e propilparabeno ainda são os conservantes mais designados, presentes em cerca de 48% de cosméticos e produtos de higiene pessoal (GALO et al, 2022). Conforme publicado no “Caderno de Tendências 2019-2020”, a busca por produtos com ingredientes de origem natural é uma tendência de comportamento e consumo, que cresce entre 8% e 25% ao ano no mundo todo (ABIHPEC, 2019). A produção mundial de óleos essenciais foi estimada em 253 mil toneladas em 2021, avaliadas em U\$ 10,3 bilhões e deve atingir mais de 345 mil toneladas em 2026 (MARKET AND MARKET, 2021).

O presente estudo se justifica pela necessidade de maior produção de conhecimento para a área de medicamentos e cosméticos, visto que os estudos de conservantes naturais estão mais focados na área alimentícia e os conservantes sintéticos disponíveis para bases dermatológicas possuem algum risco de hipersensibilidade (MATOS; ROSA, 2018).

Neste contexto, os óleos essenciais podem ser considerados como potenciais agentes conservantes naturais, pois são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais e antimicóticas (MATOS; ROSA, 2018; FALLEH et al., 2020). Entre a espécies mais utilizadas de forma convencional para fins antissépticos, está uma planta encontrada em todo o mundo, *Origanum vulgare L.* (família Lamiaceae), popularmente conhecido como orégano (JANANI et al., 2019); tendo em sua composição química uma mistura de vários componentes bioativos, como: carvacrol, terpinoleno, timol,  $\gamma$ -terpineno e ortocimeno (ASENSIO et al., 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o potencial conservante do óleo essencial (OE) de orégano em formulações semissólidas de uso externo.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antimicrobiana do OE de orégano frente aos principais contaminantes de formulações farmacêuticas;

Definir a concentração inibitória mínima OE de orégano;

Desenvolver base dermatológica contendo OE de orégano como conservante microbiológico;

Avaliar estabilidade físico-química do produto desenvolvido;

Correlacionar a CIM do OE de orégano com uma possível ação conservante;

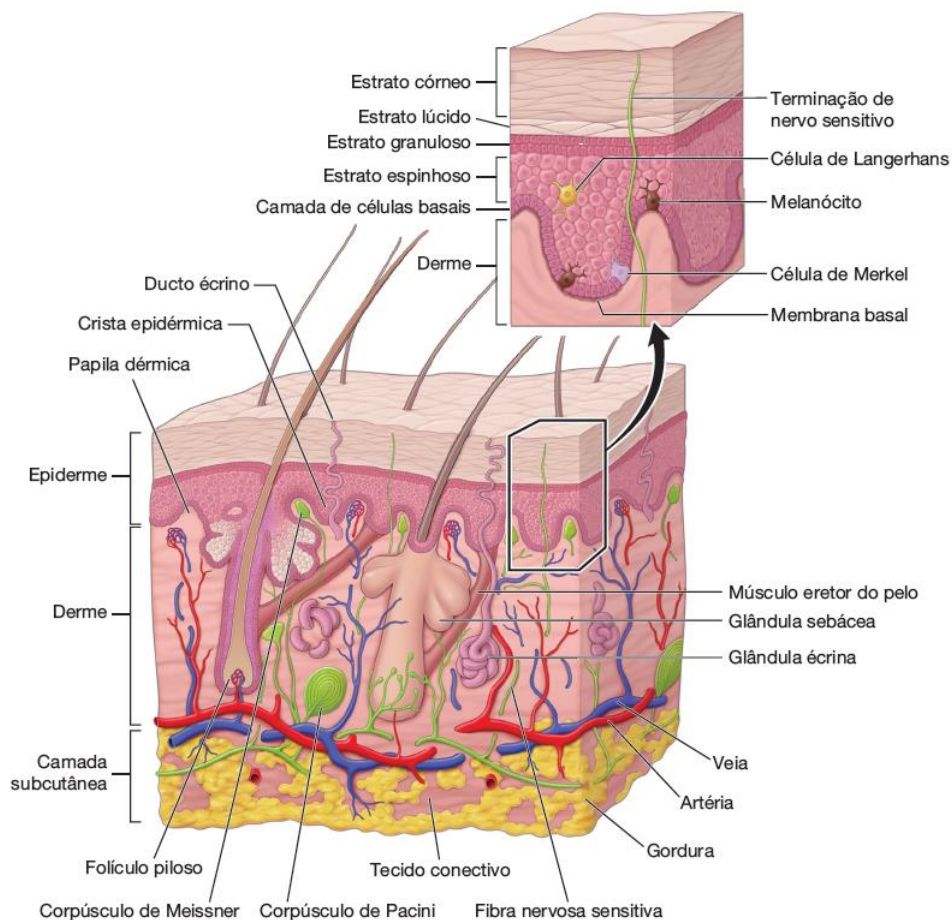
Quantificar o impacto tecnológico do uso de óleos essenciais de orégano como adjuvantes em formulações de uso tópico.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, composta por duas camadas, a epiderme e a derme (figura 1). A camada mais externa é a epiderme, que atua como uma barreira de proteção, a fim de impedir a entrada de agentes infecciosos e perda de água corporal, tendo uma grande extensão de exposição e absorção. Possui como funções a proteção física, imunológica e regulação térmica para o corpo, todavia é uma área com sensibilização de contato e altas possibilidades de irritação (HARRIS, 2009; SILVA et al., 2020; GALO et al., 2022).

**Figura 1 – Estrutura da pele e suas camadas**



Fonte: BOHJANEN, 2014

A epiderme, composta por queratinócitos, atua como sua principal barreira de proteção. A penetração de produtos pode ocorrer de duas maneiras, dependendo de suas propriedades físico-químicas: por meio da via transdérmica ou da via transanexal. Na primeira, o produto pode passar entre as células (intercelular) ou através delas (transcelular), sendo um processo mais lento devido à espessura do estrato córneo. A via transanexal envolve a penetração pelos folículos pilosos ou pelas glândulas sebáceas, sendo mais rápida devido à menor resistência encontrada pelo produto. Uma vez atravessada a epiderme, o produto precisa se difundir pela derme, a camada mais profunda e menos vascularizada da pele, onde estão os fibroblastos, colágeno e elastina. Por fim, os componentes são absorvidos pela hipoderme, o tecido subcutâneo que contém vasos sanguíneos e linfáticos, responsáveis por transportá-lo pela circulação sistêmica até os demais órgãos (HARRIS, 2009).

O pH desempenha um papel fundamental na proteção da pele. Na maior parte do rosto e do corpo, a faixa de pH ideal da pele situa-se entre 4,7 e 5,75. Para manter a saúde da pele, é importante que os produtos dérmicos tenham um pH que se assemelhe ao dessa faixa. O pH neutro é 7, o mesmo pH da água pura. Qualquer valor abaixo desse é considerado ácido, enquanto valores acima são alcalinos. O pH natural da pele é levemente ácido, o que é crucial para a sua proteção (HARRIS, 2009; BOHJANEN, 2014; GALO et al., 2022).

### 3.2 BASES DERMATOLÓGICAS

O Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira apresenta diversos exemplos de fórmulas de bases para o preparo de formulações farmacêuticas que são usadas como ponto de partida para o desenvolvimento de novos produtos, sendo feitos pequenos ajustes de acordo com a compatibilidade entre os componentes ou disponibilidade do insumo no laboratório ou no mercado. Essas bases para uso dermatológico são de natureza líquida ou semissólida e têm a função de incorporar e veicular diversas substâncias ativas. As bases semissólidas abrangem fórmulas de cremes, géis, pastas, pomadas, loções, xampus, que a partir de suas aplicações na pele desempenham o papel de ação local ou penetração percutânea de medicamentos, além disso, proteger, amaciar e suavizar a pele. Os

principais constituintes de sistemas emulsionados são: ceras autoemulsionantes, emolientes, conservantes e água purificada (BRASIL, 2012).

Conforme definido na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira:

Emulsão é a forma farmacêutica líquida de um ou mais princípios ativos que consiste de um sistema de duas fases com pelo menos dois líquidos imiscíveis e no qual um dos líquidos é disperso na forma de pequenas gotas (fase interna ou dispersa) no outro líquido (fase externa ou contínua). Normalmente é estabilizada por meio de um ou mais agentes emulsificantes. E o creme é a forma farmacêutica semissólida que consiste de uma emulsão, contém um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base apropriada e é utilizada, normalmente, para aplicação externa na pele ou nas membranas mucosas (BRASIL, 2019, p.16).

### 3.3 ESTABILIDADE BIOLÓGICA DE BASES DERMATOLÓGICAS

O desenvolvimento microbiológico ocorre em produtos não estéreis e com alto teor de água, como soluções e emulsões. A estabilidade microbiológica de um produto é considerada quando há esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano de acordo com os requisitos especificados nas literaturas científicas (BRASIL, 2012).

A legislação brasileira estabelece para formulações de uso farmacêutico a ausência de microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e coliformes totais e fecais conforme descrito na Tabela 1 (MATOS; ROSA, 2018; BRASIL, 2022).

Tabela 1. Limites microbianos para produtos farmacêuticos.

<b>Produtos</b>	<b>Contagem total de bactérias aeróbias</b>	<b>Pesquisa de patógenos</b>
<p><b>“TIPO I”</b></p> <p>a) produtos para uso infantil;</p> <p>b) produtos para área dos olhos; e</p> <p>c) produtos que entram em contato com mucosas.</p>	não mais que $10^2$ UFC/g ou ml, sendo o limite máximo igual a $5 \times 10^2$ UFC/g ou ml;	Ausência de: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g ou 1ml; de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g ou 1ml; e de Coliformes totais e fecais em 1g ou 1ml.
<p><b>“TIPO II”</b></p> <p>Demais produtos cosméticos suscetíveis a contaminação microbiológica.</p>	não mais que $10^3$ UFC/g ou ml, sendo o limite máximo igual a $5 \times 10^3$ UFC/g ou ml;	Ausência de: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g ou 1ml; de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g ou 1ml; e de Coliformes totais e fecais em 1g ou 1ml.

Fonte: Adaptado de Brasil (2022)

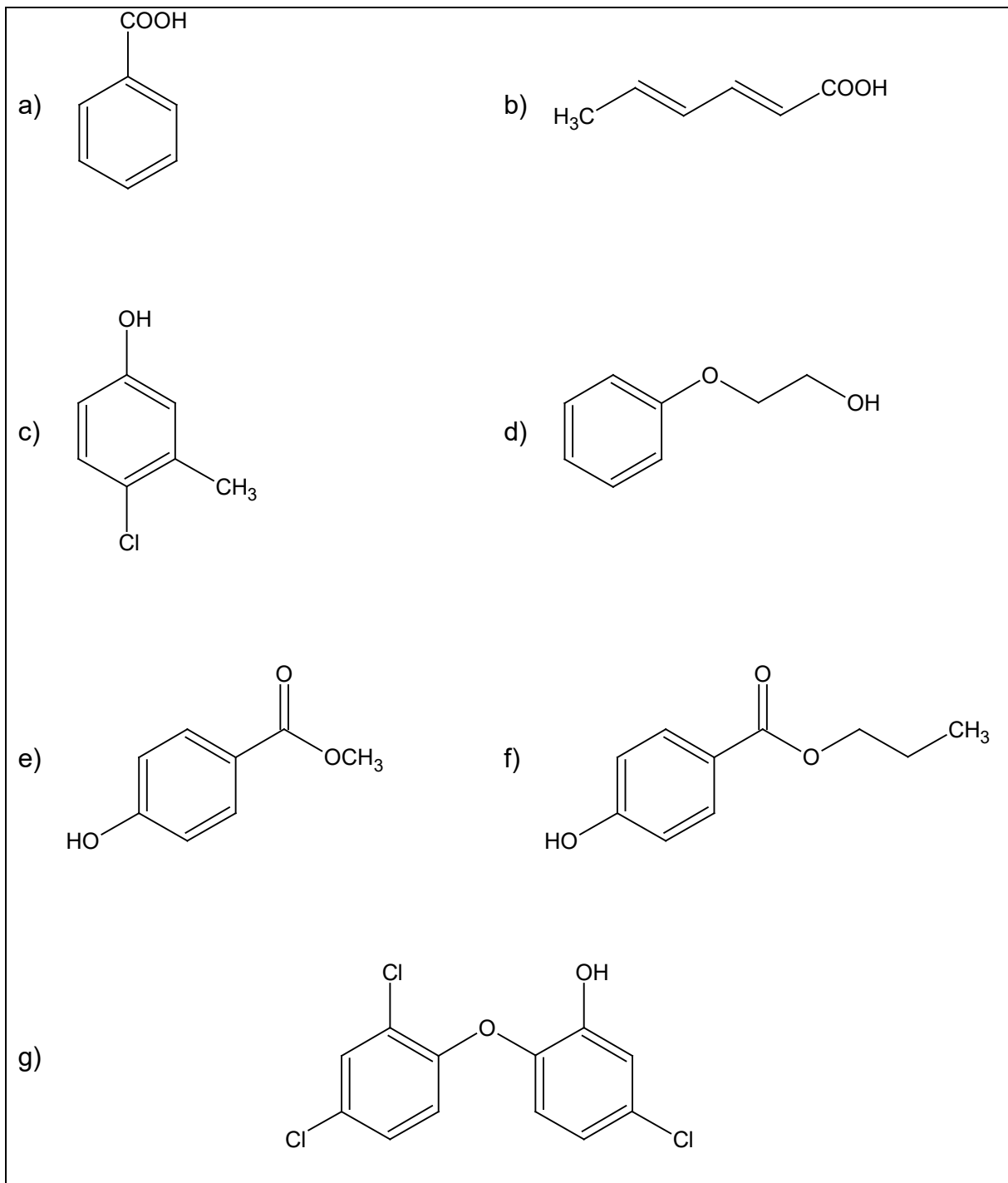
### 3.4 CONSERVANTES

Conservantes antimicrobianos são aditivos que retardam ou inibem o desenvolvimento de microrganismos prejudiciais à saúde humana. A inclusão de conservantes às formulações farmacêuticas não estéreis e com alto teor de água é indispensável para estabilizar ou inibir o crescimento de microrganismos, tendo como objetivo constituir atividade conservante durante a vida útil do produto nas condições de armazenamento adequadas (MATOS; ROSA, 2018; SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2020).

O estudo realizado por Galo e colaboradores (2022), apresentou características gerais de diferentes conservantes microbianos naturais e sintéticos, que agem contra bactérias e fungos, utilizados em indústrias e farmácias magistrais,

dentre eles: ácido benzoico, ácido sórbico, clorocresol, fenoxietanol, parabenos e triclosan (Figura 2).

**Figura 2 – Estruturas químicas dos principais agentes conservantes usados em produtos farmacêuticos: a) ácido benzóico; b) ácido sórbico; c) clorocresol; d) fenoxietanol; e) metilparabeno; f) propilparabeno, e; g) triclosan.**



Fontes: Brasil (2019); Formiga, Batista e Pessoa (2022); Rowe, Sheskey e Quinn (2009).

O ácido benzoico (Figura 2-a) é um ácido carboxílico aromático espontaneamente presente em tecidos vegetais e animais que também pode ser produzido por microrganismos; amplamente utilizado como agente bactericida e antifúngico em alimentos, cosméticos, produtos de higiene, dentre outros, e foi um dos primeiros conservantes autorizados pelo FDA, são utilizados em pHs abaixo de 4,2; embora não sejam prejudiciais à saúde humana, há relatos que proporcionam alguns efeitos indesejados como a irritabilidade da pele e os olhos (GALO, 2022).

O ácido sórbico (Figura 2-b) é muito utilizado como conservante alimentar, de origem vegetal, possui a habilidade de inibir ou retardar o desenvolvimento de leveduras, bolores e bactérias; é considerado seguro quando em comparação a outros compostos e é mais eficaz quando o pH do meio é mais ácido (GALO, 2022).

O clorocresol (Figura 2-c) é um fenol clorado, obtido através da cloração do m-cresol, eficaz contra bactérias (gram-positivas e gram-negativas), bolores e leveduras, levemente solúvel em água, possui odor difícil de mascarar, é eficaz em pH ácido, tem atividade básica na parede celular, seu mecanismo de ação envolve a ruptura e permeabilidade geral da membrana citoplasmática (GALO, 2022).

O fenoxietanol (Figura 2-d) é um glicol éter, proveniente naturalmente do chá verde, também pode ser produzido sinteticamente através do processo do fenol combinado com o óxido de etileno, tem amplo espectro de ação bactericida e baixa sensibilidade dérmica, é considerado seguro por não possuir potencial de estimulação de estrogênio como nos demais conservantes, entretanto, há relatos atípicos de efeitos adversos, como urticária. Este composto fenólico promove a ruptura da membrana celular dos microrganismos pela solubilização de lipídeos, através da desnaturação protéica, em que esteja mais permeável em relação aos íons de potássio ou atua na inibição da síntese do DNA e RNA (GALO, 2022).

Os parabenos (Figuras 2-e e 2-f) são conservantes de amplo espectro microbiano, possuem elevada compatibilidade com diversas matérias-primas, baixo custo e são relativamente seguros, em função disso são os conservantes mais utilizados pelo mercado. Contudo, apresentam ação estrogênica, podendo gerar o aumento da linhagem celular cancerígena do tecido mamário. O mecanismo de ação conservante dos parabenos é complexo e ainda não é totalmente conhecido, sabe-se que possuem atuação sobre a síntese de DNA ou RNA, ou sobre os mecanismos

de transporte pelas membranas; possui efetividade em uma ampla escala de pH, tendo melhor atividade em pH ácido (FERNANDES et al., 2013; GALO et al., 2022).

O triclosan (Figura 2-g), popularmente conhecido como igarsan, age contra bactérias gram positivas e gram negativas, além de alguns fungos. Abundantemente empregado em produtos como sabonetes, produtos de cuidados pessoais, xampus, produtos veterinários e domésticos, sua ação em altas concentrações causa danos às membranas das células bacterianas, interrompendo a síntese de proteínas e lipídeos; em baixas concentrações permeiam a parede celular bacteriana, tendo como alvo os citoplasmas e a membrana, incluindo síntese de RNA e produção de macromoléculas. A utilização do triclosan pode gerar distúrbios endócrinos, ademais, pesquisas já apontaram um acúmulo no organismo e alta absorção pelo corpo humano, com achados desse conservante na urina, plasma e leite materno (FORMIGA et al., 2022; GALO et al., 2022).

A fim de minimizar os efeitos adversos e riscos de hipersensibilidade da pele com o uso de formulações dermatológicas, muitos estudos estão direcionados a reduzir ou até mesmo substituir os conservantes tradicionais sintéticos por conservantes de origem natural (MATOS; ROSA, 2018; SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2020).

### 3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

OE correspondem a menos do que 5% da matéria seca vegetal, no entanto possuem altas concentrações de ativos. São produtos voláteis, geralmente líquidos e incolores à temperatura ambiente. Quimicamente, OE são uma mistura de vários componentes químicos bioativos, como terpenos, terpenóides e fenólicos, possuindo propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, antimicóticas, antiparasitárias e inseticidas (FALLEH et al., 2020).

Pela grande variabilidade de seus compostos químicos, os mecanismos de ação dos OE ainda não estão formalmente instituídos. Todavia, considera-se que não seja atribuído a um único mecanismo, pois é provável que este seja relacionado a diversos alvos da célula bacteriana, visto que a

hidrofobicidade/lipofilicidade dos OE permite que eles permeiem pela membrana citoplasmática da célula, mitocôndrias, camadas de ácidos graxos, polissacarídeos e fosfolipídios, além da capacidade de desintegrar a parede celular bacteriana e demais estruturas. Estudos demonstram que os OE ricos em compostos fenólicos como timol, carvacrol ou eugenol exibem maior atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar. Esses terpenofenóis têm como alvo as proteínas amina e grupos hidroxilamina na membrana bacteriana para modificar sua permeabilidade levando à morte da bactéria. Evidências corroboram que os componentes em menores quantidades, como o p-cimeno, possuem um papel importante na eficiência antimicrobiana dos OE, possivelmente por exibir um efeito sinérgico com os outros componentes químicos (FALLEH et al., 2020).

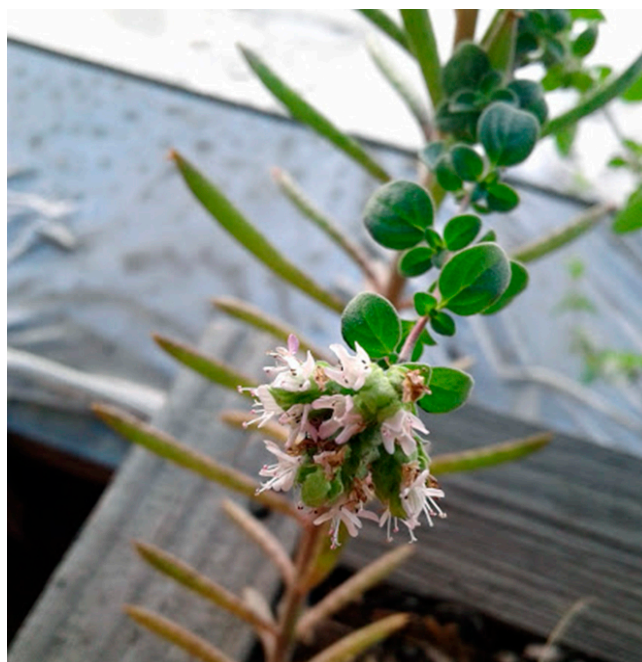
### 3.5.1 Óleo essencial de orégano

A espécie *Origanum vulgare* L. (figura 3), popularmente conhecida como orégano, é uma herbácea perene, aromática, ereta, de hastes algumas vezes arroxeadas, medindo até 90 cm de altura, com folhas simples, esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. Apresenta determinadas exigências climáticas, produzindo melhor qualidade da planta em invernos secos e ensolarados. No Brasil, a maior parte do orégano comercializado é importado, porém, há cultivo da espécie principalmente nas regiões sul e sudeste do país (FERNANDEZ et al., 2020).

Desde o século VII a.C. as folhas do orégano são utilizadas como erva para condimentar e aromatizar alimentos, existem relatos antigos de uso como conservante de alimentos de origem animal, controlador de microrganismos e endoparasitas e como promotor de crescimento em animais de fazenda (LIAQAT et al., 2021). O orégano é uma planta aromática com ampla distribuição no mundo; o OE de orégano possui uma mistura complexa de compostos, sua composição inclui terpenos, geralmente mono e sesquiterpenos. Os principais terpenos identificados nas diferentes espécies de orégano são carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno.

Terpinen-4-ol, linalol,  $\gamma$ -mirceno, hidrato de trans-sabineno e  $\gamma$ -cariofileno também estão presentes (LUO et al., 2022).

**Figura 3 – Ramo fresco de orégano (*Origanum Vulgare L.*)**



Fonte: UNIRIO, 2017

Distintas atividades do OE de orégano já são conhecidas, como antimicrobiana, antitumoral, antimutagênica, analgésica, antiespasmódica, antiparasitária e antiplaquetária (MOGHROVYAN et al., 2020). Deste modo, o orégano é uma respeitável fonte de metabólitos secundários naturais, de grande importância para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Apesar da grande quantidade de dados sobre a composição química do OE de orégano, verificou-se que a averiguação da composição e as propriedades biológicas ainda não foram totalmente exploradas, visto que dados da literatura relatam composição diferenciada de acordo com a região cultivada; o OE destilado de orégano turco, tem como componentes principais, timol (58,3%) e carvacrol (16,1 - 63,97%), da Grécia - carvacrol (88,7 %), da China -  $\gamma$ -citronelol (85,3 %), da Jordânia - hidrato de trans-sabineno (27,2 %), da Bulgária - espatulenol (20,7%), do Brasil - tripineno (30,5%) (MOGHROVYAN et al., 2020).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido com um delineamento de uma revisão teórica e um experimento laboratorial, utilizando óleos essenciais, realizando o estudo formulação de bases dermatológicas, avaliando a atividade antimicrobiana do OE de orégano, incorporando o OE na base e testando a estabilidade físico-químico deste produto.

### **4.1 PROSPECÇÃO TEÓRICA**

Foi realizada uma busca sobre os principais microrganismos contaminantes de formulações de uso tópico e as atividades do óleo essencial de orégano descritas nas bases de dados científicas como: Capes periódicos, Scielo e Pubmed. Ademais, foi feito um levantamento de dados sobre as tecnologias patenteadas a fim de identificar o impacto econômico e tecnológico do uso de óleos essenciais como adjuvantes em formulações de uso tópico.

#### **4.1.1 Revisão integrativa**

Foi conduzida uma revisão integrativa abrangendo diversas abordagens metodológicas, no recorte temporal de 2016 a 2022; utilizando os descritores: "Antimicrobial activity" and "Oregano essential oil" indexados nas bases de dados Pubmed e Scielo até junho de 2022.

#### **4.1.2 Prospecção de patentes**

A prospecção foi executada utilizando os pedidos de patentes registrados na European Patent Office (EPO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI) durante um período de dois anos, que abrangeu de julho de 2020 a junho de 2022. As palavras chaves e os termos utilizados foram: "essential oil" AND (cosmetic OR "pharmaceutical product" OR "galenic base" OR emulsion) AND (preservative OR "antimicrobial preservative") NOT (packing OR package OR packaging), sendo utilizados operadores lógicos para

a obtenção de diferentes resultados (“AND”, para características exigidas; “OR”, para sinônimos ou palavras de sentidos semelhantes, e; “NOT”, para exclusão de palavras). Dessa forma, pretendeu-se ter como resultados patentes relacionadas ao uso de óleos essenciais com finalidade conservante em produtos farmacêuticos de uso tópico, mas não relacionadas à embalagem ou armazenamento.

#### 4.2 AMOSTRAS

Foram utilizadas três amostras de óleo essencial de orégano, de fabricantes distintos, identificadas como OEO-A, OEO-B e OEO-C. Foram solicitados por e-mail os cromatogramas dos referidos OE as três empresas, recebemos retorno com os certificados de análise química do OEO-B (Anexo A); o fabricante do OEO-C não retornou aos nossos contatos quanto a cromatografia e a do OEO-A retornou os contatos informando que ainda estava em processo de análise.

#### 4.3 ESTUDO DE FORMULAÇÃO

Para a formulação da base dermatológica, foram adotadas as recomendações da Farmacopeia Brasileira (6ª edição), do Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira, do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, do Guia de Controle de Qualidade e avaliação de segurança de Produtos Cosméticos e seguindo as Boas Práticas de Fabricação conforme a RDC nº 67/2007 (MATOS; ROSA, 2018; BRASIL, 2004; BRASIL, 2012; BRASIL, 2019). A base utilizada foi o creme base não-iônico baseado em adaptações de formulações descritas no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012), a seleção desta base é fundamentada pela característica não-iônica possuir maior compatibilidade com a maioria dos ativos.

A formulação do creme base não-iônico foi elaborada conforme a descrição apresentada na Tabela 2; sendo utilizado o método à quente em face da base emulsionante selecionada. A etapa da fase oleosa foi conduzida a 75°C, enquanto a fase aquosa foi aquecida a 80°C. A fase aquosa foi então combinada com a fase oleosa sob agitação, sendo essa agitação mantida até que o sistema resfriasse a aproximadamente 40°C. Nesse ponto, a fase complementar foi introduzida. A

agitação foi mantida até que a mistura alcançasse a temperatura ambiente. Inicialmente, duas formulações de creme foram preparadas: uma com conservantes (0,5% de parabenos) e outra sem conservantes. A partir da formulação sem conservantes, incorporaram-se o OE de orégano em concentrações conforme a CIM, CIM -50% e CIM +50% até completa homogeneização. Os cremes foram acondicionados em recipientes de vidro de 40g.

As formulações, ajustadas às concentrações correspondentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM), metade da CIM (CIM -50%) e 50% acima da CIM (CIM +50%) do óleo essencial de orégano, foram designadas como A2, A1 e A3, respectivamente. Além disso, a formulação contendo parabenos foi designada como creme de controle positivo (A4), enquanto a formulação sem conservantes foi designada como creme de controle negativo (A5). Os componentes e suas concentrações nas formulações estão detalhados na Tabela 6 dos resultados.

**Tabela 2. Fórmula do creme base não-iônico.**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (% , m/m)</b>
<b>Fase aquosa</b>	
EDTA dissódico	0,05 %
Água	q.s.p 100 %
<b>Fase oleosa</b>	
Miristrato de isopropila	6,00 %
Cera autoemulsionante não-iônica	14,00 %
Butilidroxitolueno (BHT)	0,05 %
<b>Fase complementar</b>	
Conservante	A definir

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando a técnica de microdiluição em placas de 48 poços. As etapas procedimentais dessa avaliação foram apresentadas em ordem cronológica no Artigo 2 (item 5.3.2).

## 4.5 TESTES DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

As formulações testes e seus controles foram submetidos ao teste de Estabilidade Normal. Os parâmetros avaliados para ambos foram recomendados pela ANVISA: características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físico-químicas (pH) (BRASIL,2004).

Para os testes de Estabilidade Normal as amostras da formulação foram submetidas a avaliações sob condições normais de armazenamento, a 25°C, incubadas em estufa e em geladeira; a fim de identificar algum tipo de alteração no produto por altas ou baixas temperaturas. Esse teste tem como objetivo coletar dados para prever se o produto se manterá estável durante o período de análise, o que ajuda a determinar sua durabilidade, prazo de validade e interação com a embalagem utilizada. Inicialmente, as amostras foram analisadas nos momentos 0, 7, 15, 30 e 60 dias (BRASIL, 2004).

### 4.5.1 Avaliação das Características Organolépticas

#### 4.5.1.1 Aspecto

As amostras foram analisadas visualmente para detectar alterações macroscópicas, como turvação, separação de fases ou precipitação. O aspecto das amostras foi descrito como fluído ou viscoso, homogêneo ou heterogêneo, transparente ou opaco. As amostras foram classificadas em três categorias:

Normal: Sem alterações

Leve: Alterações sutis, como separação de fases e/ou turvação

Grave: Alterações significativas, como separação de fases e/ou precipitação

#### 4.5.1.2 Cor

A cor da amostra foi comparada com a cor de um padrão armazenado em um frasco da mesma especificação sob luz natural (BRASIL, 2010). A amostra foi classificada em quatro categorias:

Normal: Sem alterações

Leve: Alterações sutis, como mudança de tonalidade e/ou intensidade

Modificada: Alterações significativas, como mudança de tonalidade e/ou intensidade

Intensamente modificada: Alterações graves, como mudança de tonalidade, intensidade e/ou presença de manchas

#### 4.5.1.3 Odor

As amostras e os padrões de referência foram comparados pelo olfato, após serem acondicionados no mesmo material de embalagem (BRASIL, 2010). As amostras foram classificadas em cinco categorias, de acordo com as alterações observadas no odor:

Normal: Sem alterações

Leve: Alterações sutis, como mudança de intensidade

Modificada: Alterações significativas, como mudança de intensidade

Intensamente modificada: Alterações graves, como mudança de intensidade e/ou presença de outros odores

## **4.5.2 Avaliação das características físico-químicas**

### 4.5.2.1 Determinação do valor de pH

A determinação foi por meio das tiras de pH universais ou papel indicador tornassol, essa técnica utiliza o tornassol, uma substância na qual as tiras de papel são imersas. Após secagem, essas tiras podem revelar as mudanças no pH da substância. Cada número presente na tira corresponde a uma escala de pH, cujas descrições estão detalhadas na embalagem do produto (BRASIL, 2010).

## 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações foram submetidas a uma análise estatística descritiva simples e foram apresentadas por meio de gráficos e tabelas utilizando os programas Microsoft Excel® e Word®.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

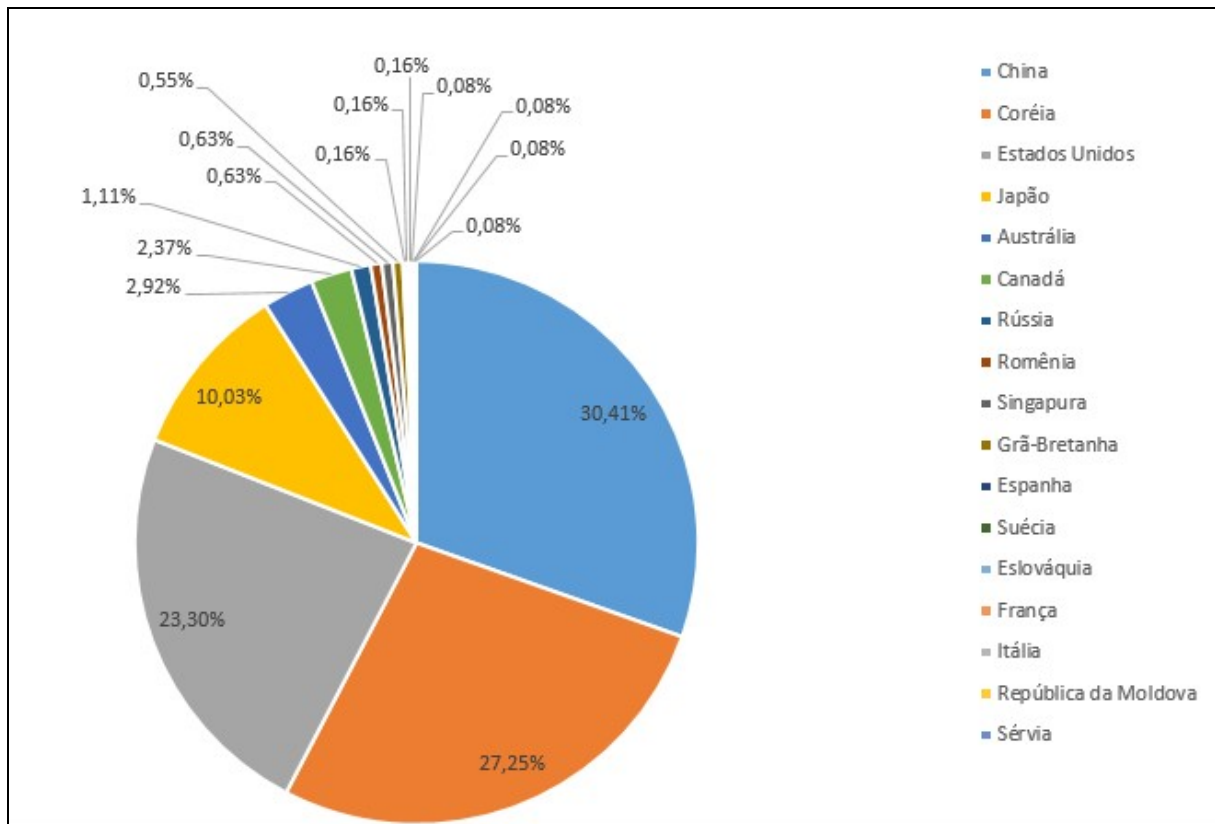
Os resultados deste estudo estão parcialmente expostos por meio de manuscritos. Deste modo, o item 5.1 traz os resultados preliminares da prospecção de patentes, posteriormente esses resultados serão escritos em formato de artigo e submetido ao Journal of Medical and Biological Sciences. O item 5.2 é uma revisão integrativa escrita sob a forma de artigo científico abordando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de óregano e será submetido ao Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. O item 5.3 é um artigo que apresenta o estudo prático da atividade antimicrobiana do óleo essencial de óregano e foi submetido a Revista Scientia Plena (Qualis A4). As referências citadas nestes resultados, encontram-se listadas na lista geral de referências, a fim de evitar repetições.

### 5.1 RESULTADOS PRELIMINARES DA PROSPECÇÃO DE PATENTES

Foram encontrados 1105 depósitos de patentes na base EPO com a busca "essential oil" AND (cosmetic OR "pharmaceutical product" OR "galenic base" OR emulsion) AND (preservative OR "antimicrobial preservative") NOT (packing OR package OR packaging), na base INPI nenhuma patente foi encontrada. Ao se avaliar o número de documentos depositados por país (Figura 4), percebe-se um maior número de depósitos por países asiáticos, liderado pela China com 30,4% do total mundial, seguido da Coreia com 27,3% e Japão com 10,0%. Os Estados Unidos foram responsáveis por 23,3% dos depósitos, enquanto não foi encontrada nenhuma patente depositada pelo Brasil.

Com a finalidade de ter maior especificidade na busca, foi realizada uma nova pesquisa com os termos gerais da busca e incluindo a palavra "óregano" em inglês nas palavras-chaves da pesquisa, o número de resultados reduziu para cinco documentos. Entretanto, nenhum destes apresentava o OE de óregano com a função de conservante.

**Figura 4 – Resultados da prospecção de patentes depositadas no EPO entre o período de julho/2020 a junho/2022, por país, de acordo com os critérios de busca previamente definidos.**



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

Das cinco patentes depositadas, apenas uma utiliza especificamente o OE de orégano, contudo não está relacionada a atividade conservante, pois trata-se de uma composição cosmética específica para o couro cabeludo tendo o óleo de orégano como ingrediente ativo para ação calmante, anti-inflamatória e tratamento de caspa (HYUN, 2020); as demais não utilizam a espécie estudada nesta pesquisa, sendo relacionadas a composições cosméticas e produtos cosméticos isentos ou substancialmente isentos de silicones sintéticos, utilizando extrato de bambu (ELIZABETH, 2022); composição cosmética ou dermatológica e seu método de preparação e aplicação, composta de diversos aditivos não incluindo o orégano (ZHENFANG, 2021); composições envolvendo um ou mais compostos organofosforados ou organossulfurados para tratar contaminantes em uma composição líquida ou líquida, para matar, prevenir e/ou inibir o crescimento de microrganismos (BURZELL, 2021); e por fim formulações de produtos à base de seda e métodos relacionados de preparação (SCOTT, et al. 2021).

## 5.2 ARTIGO 1: Atividade Antimicrobiana do óleo essencial de Óregano: uma revisão integrativa.

### 5.2.1 Introdução

Há uma tendência mundial crescente do uso de produtos e conservantes naturais e mais seguros. Óleos essenciais (OE) são potenciais agentes conservantes naturais, pois são metabólitos secundários sintetizados por plantas aromáticas e medicinais, que correspondem a menos do que 5% da matéria seca vegetal, no entanto possuem altas concentração de ativos. São produtos voláteis, geralmente líquidos e incolores à temperatura ambiente. Quimicamente, OE são uma mistura de vários componentes químicos bioativos, como terpenos, terpenóides e fenólicos, possuindo propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, antimicóticas, antiparasitárias e inseticidas (FALLEH et al., 2020). A produção mundial de óleos essenciais está estimada em 253 mil toneladas em 2021, avaliadas em U\$ 10,3 bilhões e deve atingir mais de 345 mil toneladas em 2026 (MARKET AND MARKET, 2021).

A espécie *Origanum vulgare* L. ( família *Lamiaceae* ), popularmente conhecido como orégano, é uma planta encontrada em todo o mundo, que tem sido usada de forma convencional para fins antissépticos (JANANI et al., 2019). A composição química do OE de *O. vulgare* é uma mistura de vários componentes químicos bioativos, como: terpinoleno, timol,  $\gamma$ -terpineno e ortocimeno (ASENSIO et al., 2020).

O presente estudo teve por objetivo discutir a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a diferentes microrganismos.

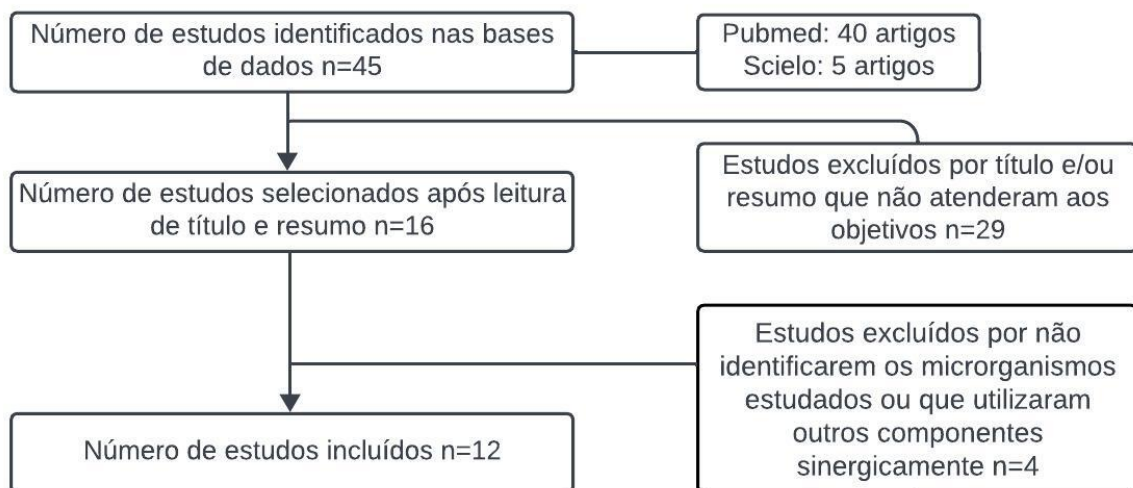
### 5.2.2 Materiais e métodos

Trata-se de uma revisão integrativa, a qual permite incluir estudos com diferentes abordagens metodológicas, no recorte temporal de 2016 a 2022. Os descritores utilizados para a busca nas bases de dados foram: "Antimicrobial activity" and "Oregano essential oil". O critério para seleção e inclusão das publicações foi descrever estudos experimentais que avaliassem a atividade antimicrobiana relacionada a óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare L.*); em publicações indexadas nas bases de dados Pubmed e Scielo até junho de 2022. Foram excluídas as publicações que constituíam uma revisão da literatura ou que testaram OE de outra espécie concomitantemente.

### 5.2.3 Resultados e discussão

A pesquisa no banco de dados eletrônico Pubmed identificou 40 estudos e no banco Scielo foram identificados 5 estudos, sem duplicatas. Após a leitura do título e do resumo, foram excluídas 29 publicações que não estavam inseridas nos critérios de inclusão, permanecendo 16 para leitura completa. Em seguida foram excluídos aqueles que não identificaram os microrganismos estudados ou que utilizaram outros componentes sinergicamente, ficando assim, 12 estudos, que atenderam os critérios de inclusão, conforme demonstrado na Figura 5.

**Figura 5: Fluxograma para seleção dos estudos**



A Tabela 3 exibe os 12 estudos que atenderam aos critérios de inclusão, fornecendo detalhes sobre os autores, objetivos e os microrganismos nos quais o Óleo Essencial de orégano demonstrou atividade antimicrobiana.

**Tabela 3. Estudos envolvendo avaliação de atividade antimicrobiana do OE de Orégano**

Autor/ano	Objetivo	Microrganismos que o OE apresentou atividade antimicrobiana
Araújo; Longo. (2016)	Avaliar a ação antimicrobiana (bactericida e bacteriostática) do óleo essencial comercial de <i>O. vulgare</i> sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , bactérias envolvidas em toxinfecções alimentares.	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .
Hać-Szymańczuk et al. (2018)	Avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana de preparações de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) em carne de frango, armazenada em condições de congelamento.	<i>Pseudomonas spp.</i> , Bactérias lácticas, <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> .
Janani et al. (2019)	Determinar a composição química do óleo essencial de orégano, concentração inibitória mínima (CIM) e avaliar sua eficiência antimicrobiana contra <i>Enterococcus faecalis</i> .	<i>Enterococcus faecalis</i>
Pavli et al. (2019)	Avaliar a eficácia do óleo essencial de orégano incorporado em filmes comestíveis de alginato de sódio quando aplicado em presunto fatiado inoculado com um coquetel de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> , com ou sem pré-tratamento por processamento de alta pressão (HPP).	<i>Listeria monocytogenes</i>
Rostro-Alanis et al. (2019)	Caracterizar frações separadas de óleo por destilação fracionada a vácuo a baixa pressão.	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> e <i>Candida albicans</i> .
Asensio et al. (2020)	Estudar a estabilidade e caracterizar as propriedades reológicas de uma nanoemulsão estável com OE de orégano; determinar a atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares; e avaliar os efeitos inibidores de sensor de quorum de OE em nanoemulsões.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> Scott, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Badekova et al. (2020)	Formular um novo gel dental anticárie <i>Origanum vulgare</i> com alta atividade antimicrobiana.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Carvalho et al. (2020)	Investigar a influência do orégano OE na inibição de <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em uma mistura interna de "Alheira"; durante o armazenamento.	<i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .

(continua na próxima página)

**Tabela 3. Estudos envolvendo avaliação de atividade antimicrobiana do óleo essencial de Orégano (continuação).**

Nagmetova et al. (2020)	Avaliar se a celulose impregnada com óleo essencial de orégano natural poderia apresentar atividade antibacteriana contra cepas de <i>Cronobacter</i> , que podem ocorrer em alimentos, causando doenças e intoxicações alimentares.	<i>Cronobacter</i>
Pérez et al. (2020)	Avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano região de Junín (Peru) contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>
Enayatifard et al. (2021)	Produzir nanoemulsão estável de óleo essencial de orégano e examinar sua ação protetora contra alguns microrganismos contaminantes de alimentos selecionados.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus niger</i> .
Luo K et al. (2022)	Investigar o efeito inibitório e a atividade germicida do óleo essencial de orégano sobre <i>V. vulnificus</i> e seu possível mecanismo de inibição.	<i>Vibrio vulnificus</i>

Fonte: Dados da pesquisa (2022).

As propriedades biológicas dos OE estão correlacionadas diretamente com a composição química, os efeitos antimicrobianos estão relacionados a compostos fenólicos, hidrocarbonetos monoterpenos, monoterpenos totais e sesquiterpenos. Tanto bactérias gram-positivas, quanto as bactérias gram-negativas demonstraram sensibilidade ao óleo essencial de orégano. O timol atua como um transportador transmembrana de cátions monovalentes, deixando seu próton hidroxila por outro íon. O cimeno atua sinergicamente, expandindo a membrana. O terpineol possui um grupo hidroxila, mas não possui alta atividade antimicrobiana, possivelmente devido à carência de sistema eletrônico deslocado de ligações duplas. Os componentes de um OE tem maior atividade antimicrobiana atuando sinergicamente, do que os componentes principais agindo isoladamente (ASENSIO et al., 2020). Hać-Szymańczuk e colaboradores (2018) concluíram que a atividade antimicrobiana do óleo de orégano está associada à presença dos compostos: carvacrol, cânfora, linalol, R (+) limoneno, 1,4-cineol e  $\gamma$ -terpineno.

Em sua pesquisa, Janani e colaboradores (2019) demonstraram que o óleo essencial de orégano é composto por carvacrol (41,2%),  $\gamma$ -terpineno (12,68%), p-cimeno (9,47%),  $\alpha$ -terpineno (1,19%) como os compostos principais e  $\beta$ -cariofileno (0,83%),  $\beta$ -linalol (0,67%),  $\beta$ -bisaboleno (0,601%),  $\alpha$ -pineno (0,6%),  $\beta$ -pineno (0,5%),

terpinen-4-ol (0,41%), borneol (0,4%), 3-tujeno (0,4%), espatulenol (0,4%), miristicina (0,25%) e apiol (0,14%). Os resultados da avaliação microbiológica demonstraram atividade antimicrobiana contra *E. Faecalis* com MIC de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e a concentração bacteriana mínima (CBM) de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Araújo e Longo (2016) avaliaram a capacidade de inibição do crescimento e viabilidade para *E. coli*. Eles observaram que o OE de *O. vulgare* demonstrou poder de inibição de crescimento e viabilidade para *E. coli* com concentração inibitória mínima (CIM) de 6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para *S. aureus* com CIM de 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Contudo, novos estudos são necessários para que sejam determinadas as concentrações ideais do orégano como antimicrobiano natural, considerando os fatores que influenciam sua composição e a quantidade e qualidade dos compostos ativos.

Quanto a concentração, o OE de orégano a 4% demonstrou a maior atividade antimicrobiana contra *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, entretanto as concentrações mais baixas usadas (0,195% e 0,0975%) resultaram em redução de crescimento microbiológico apenas para *L. Monocytogenes*, após 21 dias de armazenamento. Ademais, a concentração de 0,195% apresentou um impacto negativo na aceitação do consumidor, por alterações sensoriais desagradáveis (CARVALHO et al., 2019).

Diversos estudos avaliaram a ação antimicrobiana do OE em nanoemulsões, verificou-se que a atração eletrostática aprimora a combinação com cargas na superfície do patógeno; ao ter contato com as nanoemulsões, os microrganismos liberam parte de seu conteúdo interior resultando em morte celular. Portanto, a emulsificação aumenta a dispersibilidade do OE em solução aquosa e sua estabilidade físico-química, aumentando sua atividade antimicrobiana (ASENSIO et al., 2020; ENAYATIFARD et al., 2021). Um emulsificante incluído na formulação final, na forma de nanoemulsão do OE de *Orégano Vulgare* apresentou atividade significativa contra *S. aureus*, *C. albicans* e *A. Niger*; dessa forma, foi considerado agentes antimicrobianos com grande potencial de uso em indústrias alimentícias como conservantes de alimentos, pois nanoemulsões tratam-se de um sistema de entrega capaz de garantir uma menor concentração de compostos antimicrobianos, como óleos essenciais na fase aquosa (ENAYATIFARD et al., 2021). Assim como, a aplicação combinada de filmes comestíveis e OE nas fatias de presunto, levou a uma redução significativa ou ausência do patógeno (PAVLI et al., 2019).

Em um estudo realizado por Nagmetova e colaboradores (2020), concluiu que a celulose bacteriana impregnada com OE de orégano apresenta forte e moderada atividade antimicrobiana contra todas as cepas do gênero *Cronobacter*. Os resultados encontrados sugerem que futuramente o biopolímero pode ser utilizado como embalagem ecológica de alimentos. Em outro estudo, percebeu-se um prolongamento da estabilidade de armazenamento de carne embalada a vácuo de frangos congelados por 9 meses com a adição de óleo de orégano a 0,1%, houve uma desaceleração nas alterações microbiológicas relacionadas a *Pseudomonas* spp., Bactérias lácticas, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e fermento nos músculos do peito de frango (HAĆ-SZYMAŃCZUK et al., 2018).

Há um aumento de determinados compostos devido ao método de extração (por destilação a vácuo), que proporciona uma elevação da atividade biológica; foi o que demonstrou o estudo de Rostro-Alanis e colaboradores (2019). A primeira fração é destilada a uma temperatura de 82 ° C e a última fração destilando a 140 ° C, ao final do processo, obtém-se cinco frações (F1, F2, F3, F4, F5), e o óleo não destilado (Unoil). A avaliação de atividade antimicrobiana apresentou inibição para *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Candida albicans* para as frações 3, 4 e Unoil, enquanto F1 e F2, não apresentaram atividade antimicrobiana. O mesmo padrão foi observado para *S. typhi* e *C. Albicans*, com Unoil e F4 exibindo a melhor atividade antimicrobiana. Por outro lado, quando testados contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, F3 e F4, apresentaram atividade reduzida em comparação com Unoil. O carvacrol é o principal componente ao qual é atribuída a atividade antimicrobiana, é importante considerar a diminuição do carvacrol em ambas as frações (F3, F4) em relação ao Unoil. A atividade antimicrobiana não é atribuível a um mecanismo específico, deste modo, pode variar de uma espécie para outra.

#### 5.2.4 Conclusão

Os resultados do estudo demonstraram que o óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana para diversos microrganismos, dentre eles: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cronobacter*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, Bactérias lácticas, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*. Contudo,

para que o orégano possa ser utilizado como agente antimicrobiano, medicamento ou conservante, devem ser considerados diversos fatores, assim como, as concentrações antimicrobianas e citotóxicas da espécie devem ser estabelecidas.

5.3 ARTIGO 2: Avaliação da atividade antimicrobiana e potencial conservante do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare*).

### 5.3.1 Introdução

Conservantes antimicrobianos são aditivos que retardam ou inibem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes em produtos farmacêutico, cosmético e alimentícios, que podem ser prejudiciais à saúde humana. A inclusão de conservantes às formulações é indispensável para minimizar ou inibir o crescimento de microrganismos, tendo como objetivo manter a estabilidade do produto durante sua vida útil, em condições adequadas de armazenamento (MATOS; ROSA, 2018; SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2020). Dentre os conservantes utilizados no mercado, que em sua maioria são sintéticos, podem ser citados como exemplo o ácido benzoico, o ácido sórbico, o imidazolidiniluréia, o clorocresol, o tricosan e os parabenos. Estes conservantes por sua vez podem apresentar algum grau de irritação/toxicidade e serem danosos a saúde humana. Destaca-se a utilização em grande escala dos parabenos como conservantes, compostos que possuem propriedades estrogênicas, o que pode gerar o aumento da linhagem celular cancerígena do tecido mamário. Como resultado desse cenário, percebe-se uma tendência a uma busca crescente pela substituição e uso de conservantes naturais, visando maior segurança (SILVA, 2019; FALLEH et al., 2020; GALO et al., 2022). Alternativas promissoras incluem extratos de plantas, óleos essenciais e micocinas. Usar substâncias bioativas naturais com baixa toxicidade e resistência microbiana é uma abordagem inovadora e sustentável, substituindo componentes sintéticos por alternativas naturais no desenvolvimento de novos produtos (MARTELLI et al., 2022).

Óleos essenciais (OE) são potenciais agentes conservantes naturais, constituídos de metabólitos secundários sintetizados por plantas aromáticas e medicinais, que correspondem a menos do que 5% da matéria seca vegetal, no

entanto com altas concentração de ativos. São produtos voláteis, geralmente líquidos e incolores à temperatura ambiente. Quimicamente, OE são uma mistura de vários componentes químicos bioativos, como terpenos, terpenóides e fenólicos, que comumente apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, antimicóticas, antiparasitárias e inseticidas (FALLEH et al., 2020). A produção mundial de óleos essenciais está estimada em 253 mil toneladas em 2021, avaliadas em U\$ 10,3 bilhões e estima-se que essa produção deve ultrapassar as 340 mil toneladas em 2026 (MARKETS AND MARKETS, 2021).

O orégano, *Origanum vulgare L.* (família Lamiaceae), é uma planta facilmente encontrada em âmbito mundial, e muito usada convencionalmente para fins antissépticos (JANANI et al., 2019); é uma herbácea perene, aromática, ereta, de hastes algumas vezes arroxeadas, medindo até 90 cm de altura, com folhas simples, esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. Apresenta determinadas exigências climáticas, produzindo melhor qualidade da planta em invernos secos e ensolarados. Seus principais países produtores abrangem Grécia, Turquia e Itália. No Brasil, a maior parte do orégano comercializado é importado, porém, há cultivo da espécie principalmente nas regiões sul e sudeste do país (FERNANDEZ et al., 2020).

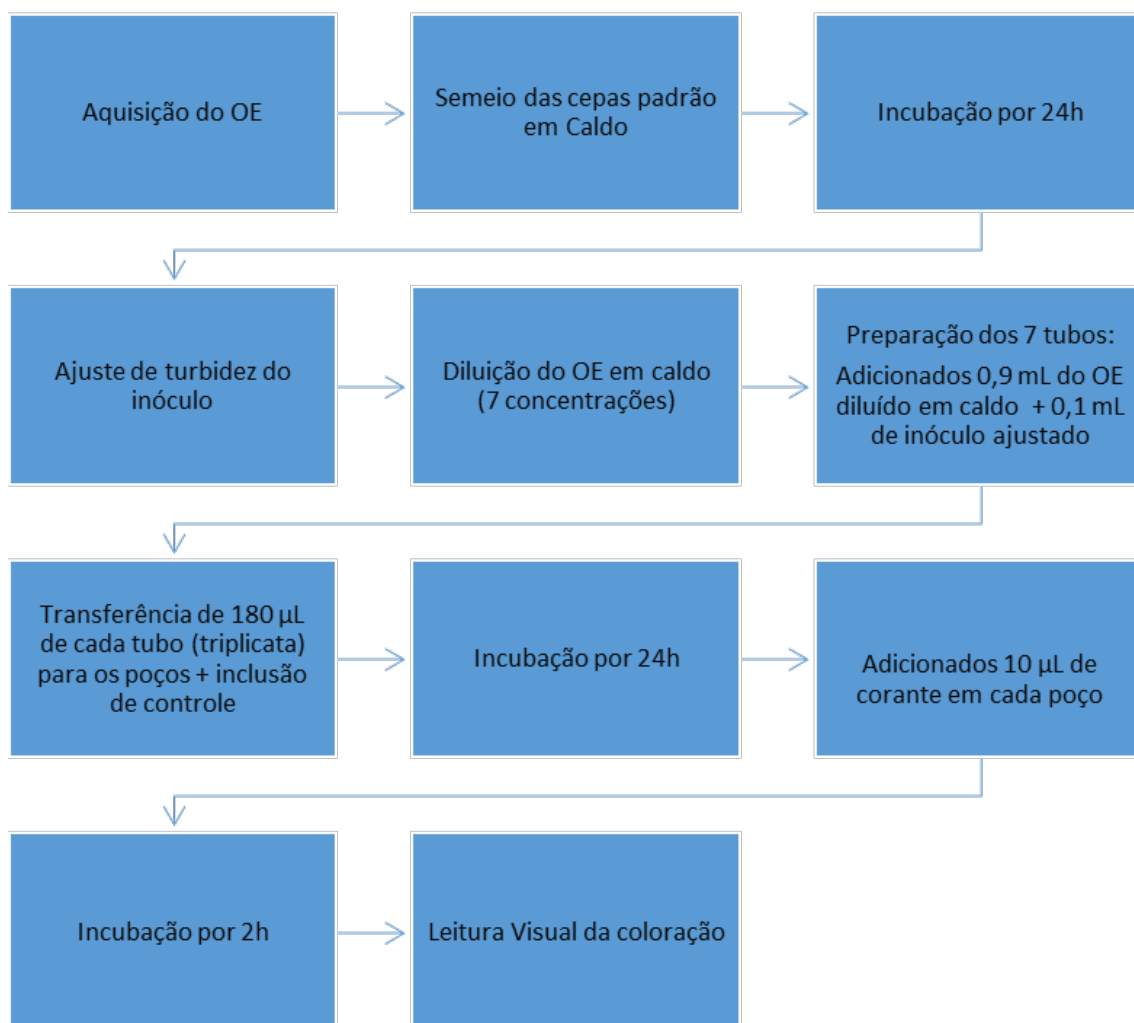
A composição química do orégano é uma mistura de vários componentes bioativos, como: carvacrol, terpinoleno, timol,  $\gamma$ -terpineno e ortocimeno (ASSENSIO et al., 2020; LUO et al., 2022). Apesar da grande quantidade de dados sobre a composição química do OE de orégano, verificou-se que a sua composição, bem como suas propriedades biológicas, ainda não foram totalmente exploradas, visto que dados da literatura relatam composição diferenciada de acordo com a região cultivada; o OE destilado de orégano turco, tem como componentes principais, timol (58,3%) e carvacrol (16,1 - 63,97%), da Grécia - carvacrol (88,7 %), da China – gama-citronelol (85,3 %), da Jordânia - hidrato de trans-sabineno (27,2 %), da Bulgária - espatulenol (20,7%), do Brasil - tripineno (30,5%) (MOGHROVYAN et al., 2019).

Este estudo teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida Albicans*.

### 5.3.2 Materiais e métodos

As etapas da metodologia deste trabalho foram sequenciadas em ordem cronológica, conforme ilustrado na Figura 6.

**Figura 6: Fluxograma das etapas da metodologia utilizada**



#### 5.3.2.1. Substância de teste

O óleo essencial comercial de orégano (*Origanum vulgare*), CAS nº84012-24-8, marca Amantikir 10 mL, lote: 05.3036, obtido por destilação a vapor das folhas,

em Minas Gerais, foi adquirido em uma loja própria da marca. Ademais, essa pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) pelo nº: A931587.

#### 5.3.2.2. Microrganismos

Para os testes antimicrobianos, foram utilizadas cepas padrão ATCC 25922 (*E. coli*), ATCC 25923 (*S. aureus*), ATCC 27853 (*P. aeruginosa*) e ATCC 10231 (*C. albicans*). As amostras bacterianas foram semeadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e a fúngica foi semeada em caldo tioglicolato.

#### 5.3.2.3 Padronização dos inóculos

O inóculo foi preparado adicionando-se uma colônia isolada do microrganismo diretamente em meio de cultura e este foi incubado a 37 °C por 24 horas. Os inóculos foram ajustados por turbidez para 1 e 3 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (determinado espectrofotometricamente no comprimento de onda 660nm com absorbância entre 0,08 e 0,11, utilizando o equipamento Specord 200 Plus Analytik Jena) (NCCLS,2003).

#### 5.3.2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando a técnica de microdiluição (ARAUJO; LONGO, 2016) em caldo em placas de 48 poços com fundo em forma de U.

#### 5.3.2.4.1. Preparação das placas

O meio de cultura utilizado nos testes para bactérias foi preparado com caldo BHI contendo 1% de polissorbato 80 (Tween 80), e o óleo essencial de orégano foi diluído em série nas concentrações de: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,152 e 1,562  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3152% e 0,1562%), conforme Tabela 4. Para cada microrganismo foi utilizada uma placa de 48 poços. Em microtubos, foram adicionados 0,9 mL do meio de cultura com diferentes concentrações do óleo essencial de orégano e 0,1 mL de inóculo ajustado das amostras (com concentração de 1 a  $3 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, alíquotas de 180  $\mu\text{L}$  de cada tubo foram transferidas em triplicata para os poços da placa de 48 poços, juntamente com os controles positivo e negativo. A placa foi incubada estaticamente a 37°C por 24 horas. A mesma metodologia foi aplicada para o inóculo fúngico, diferenciando apenas a substituição do caldo BHI pelo caldo tioglicolato.

**Tabela 4: Diluições realizadas em tubos**

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
<b>Concentração (%)</b>	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
<b>OE orégano (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,152	1,562
<b>Caldo (mL)</b>	0,9	0,95	0,975	0,9875	0,9937	0,9968	0,9984

#### 5.3.2.4.2 Controles

O controle positivo consistiu no meio de cultura acrescido de Tween 80 e inóculo do microrganismo, enquanto o controle negativo consistiu apenas no meio de cultura com Tween 80. Além disso, foi utilizado o meio de cultura sem Tween 80 na placa para verificar se o Tween tinha algum efeito sobre os microrganismos.

#### 5.3.2.3.3 Análise da atividade antimicrobiana

Após o período de incubação, foi utilizado um método colorimétrico com solução do corante de viabilidade celular cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1%. Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  dessa solução em cada poço e após duas horas foi

realizada a leitura de forma visual, observando a ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela mudança de cor da solução, para o vermelho, indicando o crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor quantidade do produto capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo avaliado, evidenciada pela ausência de qualquer mudança na coloração (OSTROSKY et al., 2008; CLSI, 2012).

### 5.3.3 Resultados e discussão

Os dados quantitativos da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano foram obtidos por meio da determinação do CIM. Os testes foram realizados com sete concentrações decrescentes (diluição seriada), variando de 10% a 0,156% v/v.

#### 5.3.3.1 Atividade antimicrobiana

A investigação da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial foi testada em relação a quatro microrganismos clinicamente relevantes, utilizando o método de microdiluição. Observou-se que o óleo essencial de orégano utilizado conseguiu inibir *C. albicans* a partir de uma concentração de 0,312% (Figura 7); *E. coli* a partir de 0,625% (Figura 8) e *S. aureus* a partir de 1,25% (Figura 9). É relevante mencionar que, na concentração mais baixa testada, não houve crescimento de *P. aeruginosa* (Figura 10). Portanto, a concentração inibitória mínima foi definida como sendo inferior a  $1,562 \mu\text{L mL}^{-1}$  ( $< 0,156\%$ ). Ao analisar visualmente a atividade do corante, observou-se que quanto mais vívido ou intenso ele aparecia, maior era o crescimento bacteriano na solução.

Figura 7: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Candida albicans*.

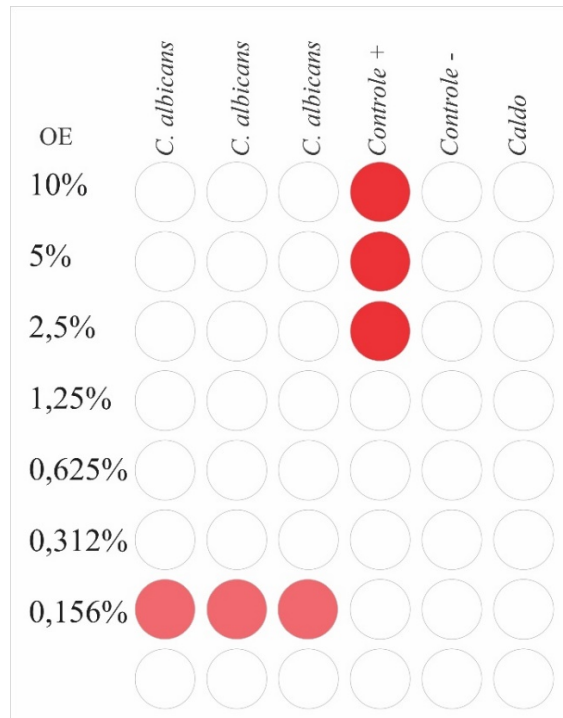


Figura 8: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Escherichia coli*.

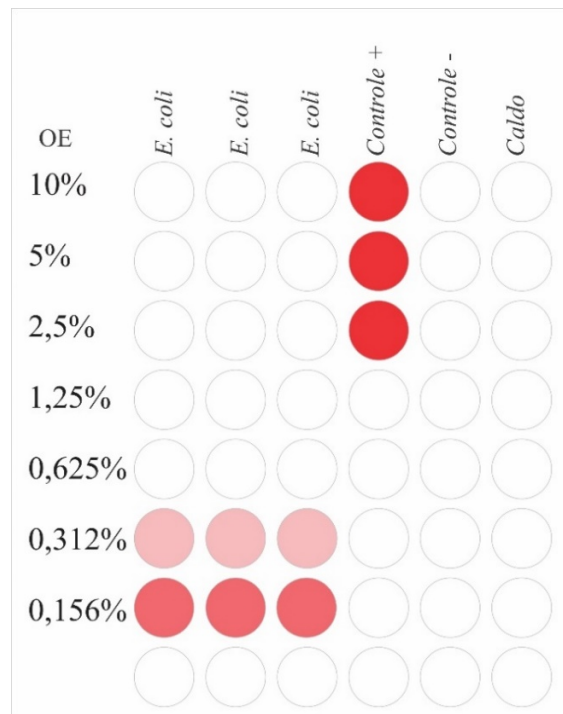


Figura 9: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Staphylococcus aureus*.

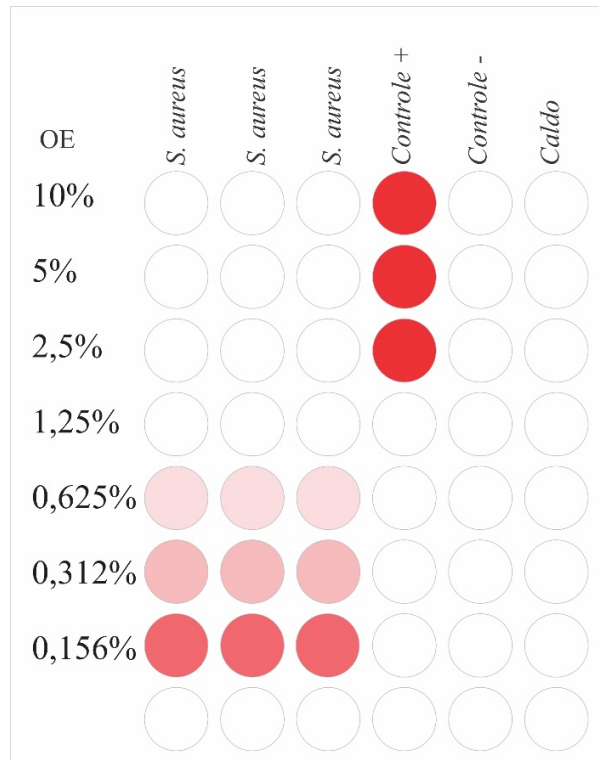
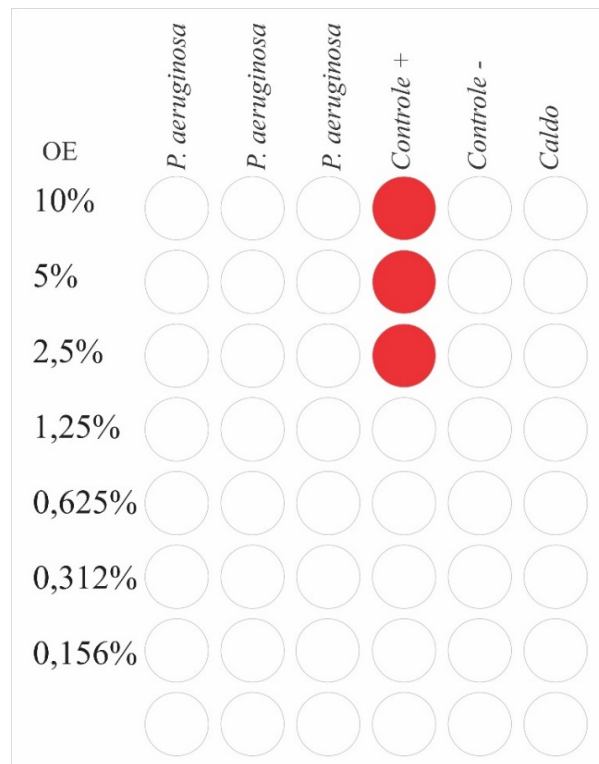


Figura 10: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Pseudomonas aeruginosa*.



Os resultados revelaram variações nas concentrações de inibição conforme o microrganismo (Tabela 5).

**Tabela 5: Atividade do Óleo Essencial de Orégano sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans***

Microrganismos	Concentrações do OEO (%)						
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
<b><i>C. albicans</i></b>	-	-	-	-	-	-	+
<b><i>E. coli</i></b>	-	-	-	-	-	+	+
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>S. aureus</i></b>	-	-	-	-	+	+	+

Legenda: (-)inibição; (+)crescimento.

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão em consonância com estudos anteriores (JANANI et al., 2019; ASENSIO et al., 2020; ARAUJO; LONGO, 2016; CARVALHO et al., 2019) conduzidos com o óleo essencial de orégano.

Araújo e Longo (2016) avaliaram a capacidade de inibição do crescimento e viabilidade para *E. coli* e *S. aureus*. Eles observaram que o OE de *O. vulgare* demonstrou poder de inibição de crescimento e viabilidade para *E. coli* com concentração inibitória mínima (CIM) de 6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,625%) e para *S. aureus* com CIM de 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (1,25%); dados semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Em sua pesquisa, Janani e colaboradores (2019), demonstraram na avaliação microbiológica atividade antimicrobiana contra *E. Faecalis* com CIM de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (2,5%) e a concentração bacteriana mínima (CBM) de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; sendo o OE utilizado composto por carvacrol (41,2%),  $\gamma$ -terpineno (12,68%), p-cimeno (9,47%),  $\alpha$ -terpineno (1,19%) como os compostos principais e  $\beta$ -cariofileno (0,83%),  $\beta$ -linalol (0,67%),  $\beta$ -bisaboleno (0,601%),  $\alpha$ -pineno (0,6%),  $\beta$ -pineno (0,5%), terpinen-4-ol (0,41%), borneol (0,4%), 3-tujeno (0,4%), espatulenol (0,4%), miristicina (0,25%) e apiol (0,14%).

Quanto a concentração, o OE de orégano a 4% demonstrou a maior atividade antimicrobiana contra *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, entretanto as

concentrações mais baixas usadas (0,0975%) resultaram em redução de crescimento microbiológico apenas para *L. Monocytogenes* (CARVALHO et al., 2019).

A variação na atividade antimicrobiana observada em estudos distintos pode ser atribuída às mutações nas linhagens bacterianas empregadas, uma vez que cepas pertencentes à mesma espécie podem apresentar distintos níveis de resistência. Adicionalmente, é crucial considerar a diversidade de óleos essenciais utilizados, dado que as concentrações dos componentes ativos podem diferir. Essas variações podem ser resultado das flutuações sazonais na colheita do orégano, bem como de fatores geográficos que influenciam a composição, qualidade e quantidade do óleo essencial.

As propriedades biológicas dos OE estão correlacionadas diretamente com a composição química, os efeitos antimicrobianos estão relacionados a compostos fenólicos, hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos totais e sesquiterpênicos. Tanto bactérias gram-positivas, quanto as bactérias gram-negativas demonstraram sensibilidade ao óleo essencial de orégano. O timol atua como um transportador transmembrana de cátions monovalentes, deixando seu próton hidroxila por outro íon. O cimeno atua sinergicamente, expandindo a membrana. O terpineol possui um grupo hidroxila, mas não possui alta atividade antimicrobiana, possivelmente devido à carência de sistema eletrônico deslocado de ligações duplas. Os componentes de um OE tem maior atividade antimicrobiana atuando sinergicamente, do que os componentes principais agindo isoladamente, a atividade antimicrobiana do óleo de orégano está associada à presença dos compostos: carvacrol, cânfora, linalol, R (+) limoneno, 1,4-cineol e  $\gamma$ -terpineno (HAĆ-SZYMAŃCZUK et al., 2018).

### 5.3.3.2 Potencial Conservante

A consistência entre os resultados fortalece a evidência de que o óleo essencial de orégano possui propriedades antimicrobianas efetivas e pode ser considerado uma opção promissora de conservante, atuando no combate a microrganismos potencialmente patogênicos.

A legislação brasileira estabelece a ausência de microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e fungos do

gênero *Aspergillus* em produtos de origem vegetal para uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular) e para bases galênicas; assim como, determina limites máximos de outros microrganismos (BRASIL, 2019). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária exerce sua regulamentação dos conservantes por meio da RDC Nº 528/2021. Essa Resolução aborda a relação das substâncias com propriedades conservantes que são autorizadas para uso em produtos destinados à higiene pessoal, cosméticos e perfumes, e estabelece os limites máximos permitidos para concentração dessas substâncias. Outros componentes presentes nas formulações podem apresentar propriedades antimicrobianas, desempenhando um papel relevante na preservação desses itens, como óleos essenciais específicos e álcoois selecionados. Contudo, tais substâncias não são abrangidas pelo âmbito desta Resolução (BRASIL, 2021).

Entre os conservantes frequentemente utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas, os parabenos são os mais designados, utilizados em grande escala na manipulação, mesmo com efeitos tóxicos conhecidos [5]. São ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzoico e apresentam características, como um amplo espectro de ação e alta solubilidade em água. Entre os parabenos mais utilizados como conservantes, estão o metilparabeno e o propilparabeno. O metilparabeno apresenta CIM de 0,200% para *Pseudomonas aeruginosa*, 0,100% para *Escherichia coli*, 0,150% para *Staphylococcus aureus* e 0,100% para *Candida albicans*. Por sua vez, o propilparabeno demonstra CIM de 0,080%, 0,040%, 0,040% e 0,013%, respectivamente, para esses mesmos microrganismos (FERNANDES et al.,2013).

A concentração máxima autorizada de parabenos nas formulações é de 0,4% para cada substância individualmente e 0,8% para combinações de sais ou ésteres. No entanto, devido à sua alta eficácia, na prática, suas concentrações frequentemente não excedem 0,3% (BRASIL, 2021; FERNANDES et al.,2013; BRASIL, 2012).

Avaliando os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que as concentrações iniciais empregadas de óleo essencial de orégano com objetivo conservante seja de aproximadamente 0,7%, calculado com base no CIM identificado para a amostra testada. Entretanto, são requeridas investigações adicionais acerca dos fatores que influenciam a ação conservante, a estabilidade físico-química do produto no qual será incorporado, testes desafio, bem como a

quantificação e a qualidade dos compostos ativos do OE que será utilizado. A realização desses estudos adicionais desempenhará um papel fundamental para viabilizar o uso comercial do óleo essencial de orégano como conservante.

### 5.3.4 Conclusão

Com base nos resultados obtidos, foi constatado que o óleo essencial de orégano demonstrou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida Albicans*. Isso confere ao óleo potencialidade conservante, tornando-o adequado para aplicação em diversos produtos das indústrias cosmética, farmacêutica e em farmácias de manipulação. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para estabelecer as concentrações ideais de orégano como agente antimicrobiano natural. Estes estudos devem levar em consideração os elementos que afetam a composição do óleo, o produto no qual será incorporado, bem como a quantidade e qualidade dos compostos ativos que estão presentes.

## 5.4 DESENVOLVIMENTO DE BASES CONTENDO O OE DE ORÉGANO

Após submeter as três amostras obtidas à técnica de microdiluição, verificou-se que somente a amostra OEO-A apresentou atividade antimicrobiana para os microrganismos testados. Portanto, as formulações subsequentes foram desenvolvidas incorporando apenas o OEO-A para demais avaliações.

Com base na determinação da CIM, foram desenvolvidas três formulações com a incorporação de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano como conservante (A1, A2 e A3), além dos controles positivos (A4) e negativos (A5); a composição final e suas respectivas concentrações estão descritas na Tabela 6.

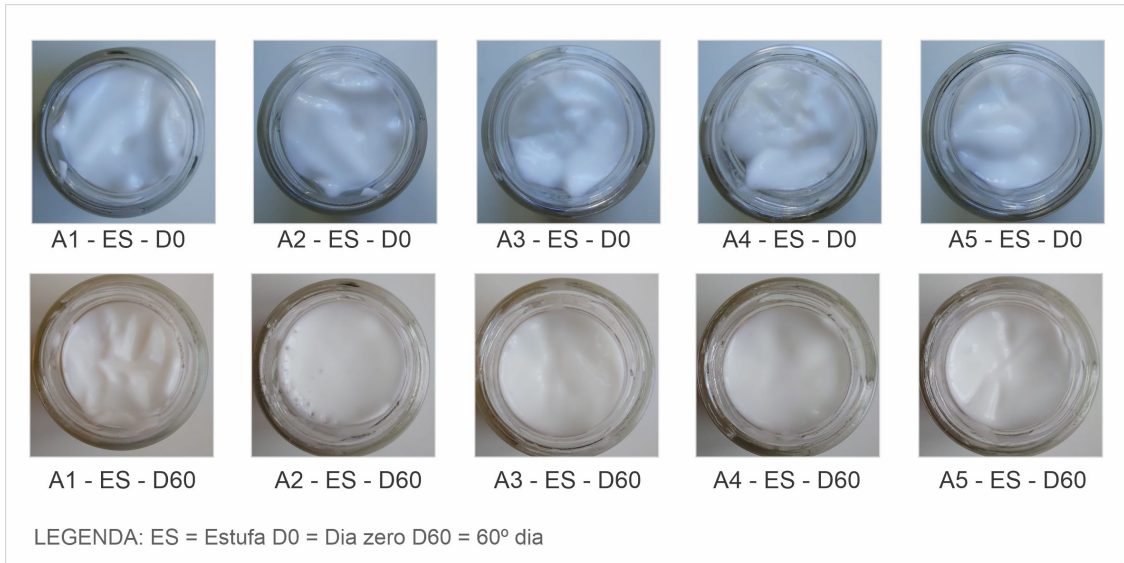
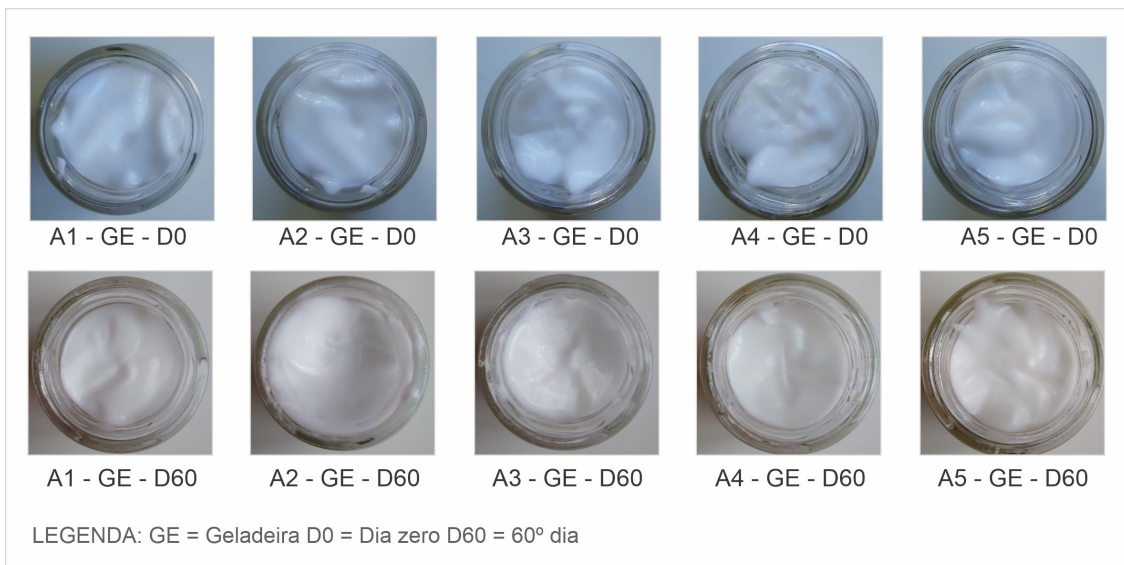
**Tabela 6. Fórmulas desenvolvidas**

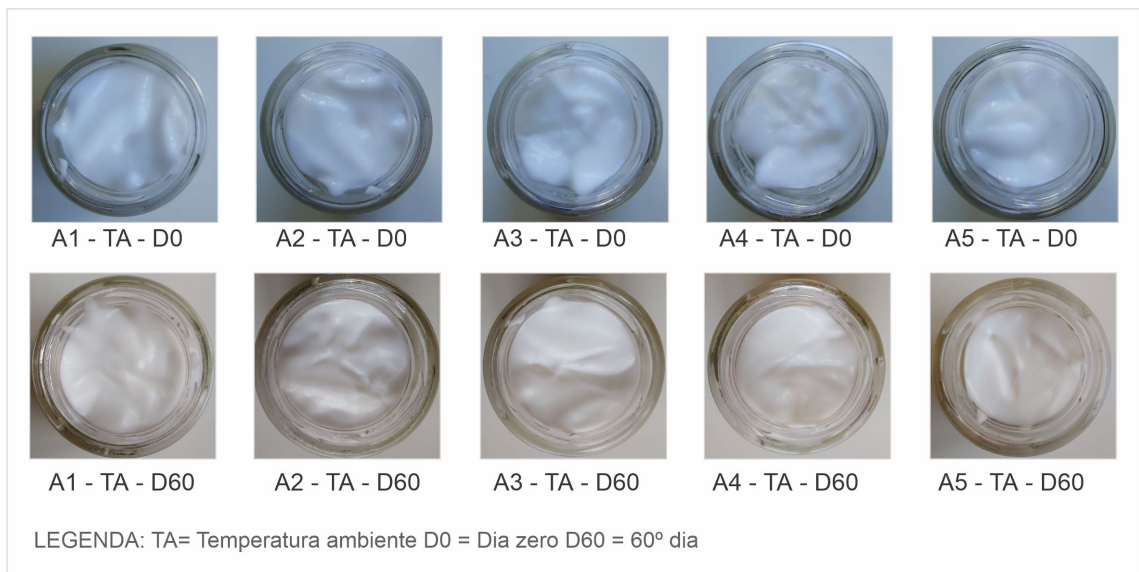
	A1	A2	A3	A4	A5
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%, m/m)</b>	<b>Concentração (%, m/m)</b>	<b>Concentração (%, m/m)</b>	<b>Concentração (%, m/m)</b>	<b>Concentração (%, m/m)</b>
<b>Fase aquosa</b>					
EDTA dissódico	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %
Água	q.s.p 100 %	q.s.p 100 %	q.s.p 100 %	q.s.p 100 %	q.s.p 100 %
<b>Fase oleosa</b>					
Miristrato de isopropila	6,00 %	6,00 %	6,00 %	6,00 %	6,00 %
Cera autoemulsionante não-iônica	14,00 %	14,00 %	14,00 %	14,00 %	14,00 %
Butilidroxitolueno (BHT)	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %
<b>Fase complementar</b>					
OE de orégano	0,312%	0,625%	0,937%	-	-
Parabenos	-	-	-	0,5%	-

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012.

## 5.5 TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

Tendo em vista os aspectos físico-químicos e organolépticos mensurados nos Testes de Estabilidade, de forma geral, constatou-se que as formulações se mantiveram estáveis em condições normais e extremas de armazenamento (figuras 11, 12 e 13), houve maiores variações das formulações quando expostas a temperaturas elevadas, alterando levemente o aspecto, no entanto, continuou em conformidade com a literatura. As amostras mantiveram um pH constante dentro das diretrizes estabelecidas. Os cremes apresentaram valores de pH entre 5,0 e 6,0, que se enquadram na faixa de adequada para a pele. O pH ideal de uma formulação é determinado considerando tanto a estabilidade dos princípios ativos utilizados quanto a compatibilidade com a tolerância da pele (BRASIL, 2004; HARRIS, 2009).

**Figura 11: Formulações armazenadas em estufa****Figura 12: Formulações armazenadas em geladeira**

**Figura 13: Formulações armazenadas em temperatura ambiente**

Os testes de estabilidade indicaram que a incorporação do óleo essencial de orégano ocorreu sem gerar alterações significativas em comparação com os grupos de controle positivos e negativos. No entanto, para viabilizar a comercialização do óleo essencial de orégano como conservante, é imprescindível ampliar o período de avaliação da estabilidade, examinar os resultados em diferentes formatos de formulação, como, por exemplo, em gel.

Adicionalmente, é fundamental investigar a possibilidade de crescimento microbiológico nas formulações e conduzir testes para avaliar tanto a irritabilidade quanto a toxicidade. Somente ao realizar essas etapas poderemos assegurar a eficácia e a segurança do óleo essencial de orégano para sua utilização como conservante.

## 6 CONCLUSÕES

A atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de orégano foi avaliada em relação aos principais contaminantes de formulações farmacêuticas, revelando eficácia contra os quatro microrganismos clinicamente relevantes, sugerindo seu potencial como conservante.

A concentração inibitória mínima do OE de orégano foi determinada, fornecendo informações cruciais para a utilização segura deste óleo como agente antimicrobiano natural em formulações.

Uma base dermatológica contendo o OE de orégano como conservante foi desenvolvida com sucesso, demonstrando a viabilidade prática de sua aplicação em produtos dermatológicos.

A estabilidade do produto desenvolvido foi avaliada, um passo importante para garantir sua eficácia e segurança ao longo do tempo.

O impacto tecnológico do uso de óleo essencial de orégano como adjuvante em formulações de uso tópico foi quantificado, abrindo possibilidades para inovações na indústria cosmética e farmacêutica.

Os resultados indicam que o óleo essencial de orégano pode representar uma alternativa promissora como conservante em diversos produtos das indústrias cosmética, farmacêutica e de manipulação, incluindo o desenvolvimento de produtos inovadores, seguros e com potencial para patenteamento.

## REFERÊNCIAS

ABIHPEC, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Do vegano ao sem perfume: indústria de cosméticos aposta em segmentação**, 2019. Disponível em: <https://abihpec.org.br/do-vegano-ao-sem-perfume-industria-de-cosmeticos-aposta-em-segmentacao>. Acesso em: 7 Jul. 2022.

ALMEIDA, Jhenyfer Caroliny *et al.* Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutritime**. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/site/wp-content/uploads/2020/01/Artigo-506.pdf>. Acesso em: 11 Jun. 2021.

ARAUJO, Márcio Martins de; LONGO, Priscila Larcher. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 83, n. 0, p. 1-7, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702014>.

ASENSIO, Claudia Mariana *et al.*. Rheological Behavior, Antimicrobial and Quorum Sensing Inhibition Study of an Argentinean Oregano Essential Oil Nanoemulsion. **Frontiers In Nutrition**, [S.L.], v. 7, 9 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.569913>.

BADEKOVA, Karakoz Zh *et al.* Formulation of an *Origanum vulgare* based dental gel with antimicrobial activity. **Journal Of Taibah University Medical Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 712-718, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtumed.2021.05.009>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Séries Temáticas, vol.1, 2004.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância sanitária. **RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007**. Aprova o regulamento técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de medicamentos em farmácias e seus anexos. Brasília: Ministério da Saúde, ANVISA. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 2.ed. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 528, de 4 de agosto de 2021**. Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 35/20. Brasília: Ministério da Saúde, ANVISA. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 752, de 19 de setembro de 2022**. Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os

requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília: Ministério da Saúde, ANVISA. 2022.

BURZELL, Cynthia. **Methods to reduce contamination, biofilm and fouling from water systems, surfaces, and products**. WO2021003419A1. Depósito: 02 jul. 2020. Concessão: 01 jul. 2021.

CARVALHO, Marta I. P. *et al.* Influence of oregano essential oil on the inhibition of selected pathogens in “Alheira” during storage. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 13-23, 30 mar. 2019. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (Poznan University of Life Sciences). <http://dx.doi.org/10.17306/j.afs.0624>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Approved standards M100-S22. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 16th ed. Wayne: CLSI; 2012.

ELIZABETH, Thomas Kirsten. **Silicone-Free Cosmetic Compositions**. US11351110B2. Depósito: 17 jun. 2020. Concessão: 07 jun. 2022.

ENAYATIFARD, Reza *et al.* Anti-Microbial Potential of Nano-Emulsion form of Essential Oil Obtained from Aerial Parts of *Origanum Vulgare L.* as Food Additive. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 327-334, 23 fev. 2020. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.34172/apb.2021.028>.

FALLEH, Hanen *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chem.** 2020 Nov 15;330:127268. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127268. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32540519.

FERNANDES, J.P.S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A.C.G.; SOUSA, M.R.; SILVA, G.R.; CIANCIULLI, M.E.; CORRÊA, M.F.; FERRARINI, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Química Nova**. v.36, n.6, p.890 893, 2013.

FERNANDEZ, Ana *et al.* AUTENTICAÇÃO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) ORGÂNICO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR E QUIMIOMETRIA. **Química Nova**, Campo Mourão, v. 43, n. 10, p. 1500-1504, 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170616>.

FORMIGA, A. L. D.; BATISTA, L. M.; PESSOA, W. F. B. Resistência bacteriana associada ao uso de Triclosan em produtos de cuidados pessoais: uma revisão narrativa. **Archives of Health**, v. 3, n. 2, p. 308–313, 2022.

FURTADO, B. dos A. Cosméticos Sustentáveis e a Intenção de Compra de Consumidores no Brasil. **Management in Perspective**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 59–78, 2020. DOI: 10.14393/MIP-v1n1-2020-47103. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/RevistaMiP/article/view/47103>. Acesso em: 6 jul. 2022.

GALO, Amanda Alves; OUTA, Camila Yoshie; SANTOS, Lidiane Ribeiro dos; BERTOLUCI, Raquel Silveira; BARSOTTI, Nathália Silveira. Conservantes farmacotécnicos utilizados em produtos dermocosméticos magistrais. **Brazilian Journal Of Natural Sciences**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 1-10, 24 maio 2022. Brazilian Journal of Natural Sciences. <http://dx.doi.org/10.31415/bjns.v4i3.157>.

GELALETI, Daniela et al. Estabilidade de Formulação Dermocosmética contendo extrato de *Pelargonium Graveolens*. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. I.], v. 2, n. 1, p. 16, 2019. DOI: 10.31415/bjns.v2i1.31. Disponível em: <http://www.bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/31>.

HAĆ-SZYMAŃCZUK, Elżbieta et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. **Food Science And Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 449-457, 16 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-018-0491-1>.

HARRIS, Maria Inês. Pele - estrutura, propriedades e envelhecimento (3a. edição - revista e ampliada). 3. ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2009. v. 1. 352p.

HYUN, Yoo Hae. **Oregano or Origanum vulgare Essential oil Cosmetics or external use for scalp composition which containing oregano oil for scalp soothing anti-inflammation dandruff improvement as an active ingredient**. KR20200123559A. Depósito: 22 abr. 2019. Concessão: 30 out. 2020.

JANANI, Krishnamachari et al. Chemical constituent, minimal inhibitory concentration, and antimicrobial efficiency of essential oil from oreganum vulgare against *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. **Journal Of Conservative Dentistry**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 538, 2019. Medknow. [http://dx.doi.org/10.4103/jcd.jcd\\_80\\_19](http://dx.doi.org/10.4103/jcd.jcd_80_19).

LIAQAT, I. et al. Antimicrobial and toxicological evaluation of *Origanum vulgare*: an in vivo study. **Brazilian Journal Of Biology**, Lahore, v. 83, n. 244551, p. 1-8, 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.244551>.

LLANA-RUIZ-CABELLO, María et al. Characterisation and antimicrobial activity of active polypropylene films containing oregano essential oil and *Allium* extract to be used in packaging for meat products. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 783-792, 18 jan. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2017.1422282>.

LUO, Kunyao et al. Antibacterial Effect of Oregano Essential Oil against *Vibrio vulnificus* and Its Mechanism. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 403, 30 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11030403>.

MARKETS AND MARKETS. Essential Oils Market Size, Share, Trends and Forecast to 2026 | COVID-19 Impact Analysis. **MarketsandMarkets**, Mar 2021. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/essential-oil-market-119674487.html>. Acesso em: 8 jul. 2021.

MARTELLI, Cristina E.; SILVA, Cassia da J. .; VIEIRA, J. .; DE SOUZA MARQUEZONI, R.; FERREIRA Gandra, R. Conservação de formulação tópica utilizando micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. **Scientia Plena**, [S. I.], v. 18, n. 10, 2022. DOI: 10.14808/sci.plena.2022.104502. Disponível em: <https://www.scientiaplenua.org.br/sp/article/view/6611>.

MATOS, Janara De Camargo; ROSA, Nina. Atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca alternifolia* comparada a conservantes químicos usados em bases cosméticas. **Revista Remecs - Revista Multidisciplinar de Estudos Científicos**

**em Saúde**, v. 3, n. 4, p. 21–30, 2018. Disponível em: <https://revistaremeccs.com.br/index.php/remecs/article/view/22/pdf>. Acesso em: 11 Jun. 2021.

MOGHROVYAN, Armenuhi et al. Essential Oil and Ethanol Extract of Oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian Flora as a Natural Source of Terpenes, Flavonoids and other Phytochemicals with Antiradical, Antioxidant, Metal Chelating, Tyrosinase Inhibitory and Antibacterial Activity. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 25, n. 16, p. 1809-1816, 23 ago. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612825666190702095612>.

NAGMETOVA, Gulden et al. Antibacterial Activity of Biocellulose with Oregano Essential Oil against *Cronobacter* Strains. **Polymers**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1647, 24 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym12081647>.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PAVLI, Foteini et al. Antimicrobial Activity of Oregano Essential Oil Incorporated in Sodium Alginate Edible Films: control of *listeria monocytogenes* and spoilage in ham slices treated with high pressure processing. **Materials**, Atenas, v. 12, n. 22, p. 3726, 12 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma12223726>.

PÉREZ, Andrea Carhuallanqui; SALVATIERRA, Maria Elena Salazar; DELGADO, Daphne Ramos. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. **Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal Of High Andean Research**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 23-33, 22 jan. 2020. Universidad Nacional Del Altiplano Puno Peru. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.530>.

ROSTRO-ALANIS, Magdalena de J. et al. Chemical Composition and Biological Activities of Oregano Essential Oil and Its Fractions Obtained by Vacuum Distillation. **Molecules**, México, v. 24, n. 10, p. 1904, 17 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24101904>.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009. CD-ROM.

SCOTT, Delisle et al. **Silk-based product formulations and methods of use**. US201916972021A. Depósito: 04 jun. 2019. Concessão: 29 jul. 2021.

SILVA, Suzana Bento et al. Ação antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e da alicina, sua utilização em formas farmacêuticas e possível associação para o tratamento de infecções dérmicas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 34555–34565, 2020. Disponível

em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/11171>. Acesso em: 11 Jun. 2021.

SILVA, Fábio Vinícius Ferreira et al. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaifera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Teresina, v. 30, n. 974, p. 1-10, 13 ago. 2019. Revista Eletronica Acervo Saude. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e974.2019>.


UNIRIO. **Herbário do Instituto de Biologia**. *Origanum vulgare* L. [Internet]. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/origanum-vulgare-l>>. Acesso em: 1 set. 2023.

ZHENFANG, Lin. **Cosmetic or dermatological composition as well as preparation method and application thereof**. CN113230172A. Depósito: 24 mai. 2021. Concessão: 10 ago. 2021.

ZHOU, Yan et al. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 112, p. 7-13, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.102>.

## ANEXOS

ANEXO A - Cromatograma obtido para a amostra OEO-B. Observação: o nome e CNPJ do solicitante foram ocultados na imagem para preservar sua identidade.



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
Telefax : (31) 3409-6380 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

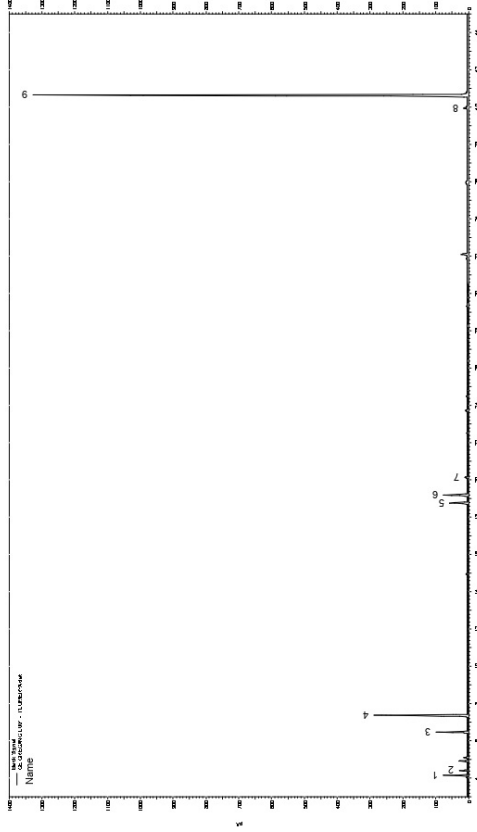
**UFMG**

Composição Química

Solicitante: [REDACTED] CNPJ: [REDACTED]

**ÓLEO ESSENCIAL de ORÉGANO**

Nome comercial: Óleo Essencial de Orégano  
Nomenclatura botânica: Origanum vulgare  
Extração: Arraste a vapor  
Parte da planta: Raiz  
Origem: Brasil  
Lote: 002



Pico	IR*	Constituintes	%
1	1180	α-terpineno	2.3
2	1187	α-felandreno	0.8
3	1242	γ-terpineno	3.8
4	1266	p-cimeno	12.9
5	1568	linalool	2.5
6	1580	β-cariofileno	4.1
7	1605	germacreno d	0.4
8	2131	timol	0.6
9	2149	carvacrol	67.9
		outros	4.6

Obs: IR\* de coluna polar


*Vany Ferraz*

**Método de análise:** Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A.  
Coluna: ECWax-10 30m x 0,32mm x 0,25 μm (Alltech). Temp.: Coluna: 50°C (5 min), 3°C/min a 200°C. Injetor: 200°C Split: 1/30. Detecor FID: 22 0°C. Vol. de injeção: 1 ul.

Dra. Vany Ferraz  
Laboratório de Cromatografia  
Departamento de Química – UFMG  
vanyferraz@ufmg.br  
Belo Horizonte, 02/06/2020

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil -Cep:31.270-901

## ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo 2.

[SP] Agradecimento pela submissão  Caixa de entrada x**Carlos Alexandre Borges Garcia via Revista SCIENTIA PLENA** <pen-bounces@emnuvens.com.br>  
para mim ▾

seg., 28 de ago., 22:51 (há 22 horas)



Prezado(a) Priscila Abreu Pimenta,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Avaliação da atividade antimicrobiana e potencial conservante do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare*)." para a revista Scientia Plena. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso da avaliação do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema disponível em:

URL do Manuscrito: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/authorDashboard/submission/7461>  
Login: priscilaabreu07

Em caso de dúvidas, entre em contato através da página de submissão na revista ("Discussão da pré avaliação" ou "Discussão da avaliação"). Pedimos a atenção em acompanhar a comunicação entre editor-autor via email, checando regularmente o *spam*. Informamos que a submissão será analisada previamente no atendimento ao foco e escopo da revista, pelo sistema antiplágio CrossCheck e na adequação às normas disponibilizadas em [www.scientiaplena.org.br/sp/about/submissions#onlineSubmissions](http://www.scientiaplena.org.br/sp/about/submissions#onlineSubmissions), podendo ser arquivada em caso de inadequação/não atendimento.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Scientia Plena

---