



FACULDADE DE PINDAMONHANGABA

**GABRIELA LAIATE
RAUL CARTAGENA ROSSI**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONSERVANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.) EM
COSMÉTICOS.**

**Pindamonhangaba – SP
2012**



**GABRIELA LAIATE
RAUL CARTAGENA ROSSI**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONSERVANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.) EM
COSMÉTICOS.**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel em Farmácia pelo curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientadora: Prof.^a Silvia Mobbille Awoyama

**Pindamonhangaba – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Laiate, Gabriela; Cartagena-Rossi, Raul;
Avaliação da atividade conservante do óleo essencial de Tomilho
(*Thymus vulgaris L.*) em cosméticos / Gabriela Laiate; Raul
Cartagena Rossi / Pindamonhangaba-SP : FAPI Faculdade de
Pindamonhangaba, 2012.

25f

Monografia (Graduação em Farmácia) FAPI-SP.

Orientador: Profª Silvia Mobbille Awoyama.

1 Óleo Essencial de Tomilho. 2 Conservante. 3 Cosmético. 4
Microrganismos.

I Avaliação da atividade conservante do óleo essencial de Tomilho
(*Thymus vulgaris L.*) em cosméticos II Gabriela Laiate; Raul
Cartagena Rossi.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONSERVANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris L.*) EM
COSMÉTICOS.**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel em Farmácia do curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Data: 12/12/2012

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Profª Silvia Mobbille Awoyama - Faculdade de Pindamonhangaba.

Assinatura _____

Profª Heleneide de Campos Brum - Faculdade de Pindamonhangaba.

Assinatura _____

Profº Germano Siqueira – USP/Lorena – SP.

Assinatura _____

*Dedicamos este trabalho aos nossos protetores,
Deus, Jesus, Maria e Nossos Anjos da Guarda.*

Que passam a nossa frente a cada hora do dia.

DEDICATÓRIAS

Primeiramente, agradeço e dedico aos meus Protetores, segundo aos meus pais Paulo Sérgio Laiate e Silvana Bueno Laiate, que sempre batalharam por mim, a minha vida toda para me dar o melhor. Agradeço e dedico a minha irmã Juliana Laiate por todos os incentivos nestes anos e para as minhas filhas caninas, Dara, Nina e Elô. Agradeço a Victoria Wirtz por toda consideração que recebi, a professora, orientadora e amiga Silvia Mobbille Awoyama. Em especial, agradeço e dedico ao meu namorado e amigo, Raul Cartagena Rossi, que está ao meu lado em cada passo da minha vida.

Essa vitória não é só minha.

Muito Obrigada.

Gabriela Laiate

Gostaria de agradecer e dedicar em primeiro lugar a Deus, e a todos os meus protetores, por tudo que tenho e sou. Em segundo lugar, à minha namorada e grande amiga, Gabriela Laiate, que me incentivou a cursar Farmácia, e também esteve e estará sempre ao meu lado durante todas as etapas de nossas vidas. Agradeço e dedico aos meus pais Telma Cartagena Rossi e Roberto de Castro Rossi, por todo o incentivo durante esses anos. Aos meus sogros, Silvana Bueno Laiate e Paulo Sérgio Laiate, por acreditarem e torcerem por mim. A nossa orientadora e grande amiga Silvia Mobbille Awoyama, por toda a ajuda prestada durante esse período. Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra nos auxiliaram e nos incentivaram.

Muito Obrigado

Raul Cartagena Rossi

AGRADECIMENTOS GERAIS

Agradecemos á todos que nos ajudaram na realização deste trabalho, Professor Carlos Rocha Oliveira, Professora Silvia Querido, colaboradoras da Faculdade de Pindamonhangaba Irene de Aguiar Santos e Barbara Tavares Torres Okada, ao Laboratório Municipal de Análises Clínicas de Pindamonhangada, especialmente a Dr^a Shirley de Abreu, ao Centro de Fitotecnia da APTA e a Industria Aromax, especialmente Evellyn dos Santos.

Nosso Muito Obrigado.

Gabriela Laiate; Raul Cartagena Rossi.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier.

RESUMO

Dentre os problemas enfrentados pela indústria cosmética, a contaminação microbiana se destaca como um dos mais importantes, uma vez que afetam negativamente as formulações, e é de difícil controle. A alternativa mais comumente utilizada é o uso de conservantes cosméticos, substâncias químicas das mais variadas classes, que evitam a proliferação dos microrganismos nas fórmulas, aumentando assim a vida útil desses produtos. Alguns desses conservantes podem apresentar efeitos indesejáveis, tais quais alergias, irritações, e até mesmo efeitos tóxicos. Na tentativa de diminuir esses problemas e aumentar o apelo comercial natural dos cosméticos, esse trabalho baseou-se em substituir esses conservantes sintéticos pelo óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e avaliar suas propriedades frente aos mesmos. Foram preparadas cinco emulsões cosméticas O/A como base. Na primeira, não houve adição de conservantes. Na segunda, adicionou-se o triclosan à formulação. Na terceira, foram adicionados os parabenos (metilparabeno e propilparabeno).

Na quarta fórmula foi adicionado o digluconato de clorexidina, enquanto na quinta e última, foi adicionado o óleo essencial de tomilho, todos em suas concentrações ideais. Essas amostras foram submetidas ao teste de desafio. Também foram realizados antibiogramas com o óleo essencial de tomilho, para os diferentes microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, com o intuito de avaliar os efeitos do mesmo sobre as colônias. O óleo essencial de tomilho se demonstrou muito eficaz contra as espécies bacterianas, tanto em sua forma pura quanto em sua forma emulsionada, também se demonstrou eficaz contra as leveduras testadas, contudo, apenas em sua forma pura, pois o óleo não sucedeu completamente como conservante na forma emulsionada, sugerindo uma possível interferência da fórmula cosmética na sua ação antimicrobiana.

Palavra Chave: Tomilho, óleo essencial, conservantes, cosméticos.

ABSTRACT

Among one of the biggest problems faced by the cosmetic industry, microbial contamination stands as one of the most important, since they adversely affect the formulations, and it is difficult to control. The most commonly used alternative is the use of preservatives, chemicals compounds of different classes which avoid the proliferation of microorganisms within formulas, thus increasing the shelf life of these products. Some of these preservatives may have undesirable effects such as allergies, rashes, and even toxic effects. In an attempt to mitigate these problems and increase the commercial appeal of natural cosmetics, this work is based on replacing these synthetic preservatives by the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and evaluate their properties forward to them. It was prepared five O / W emulsions, in the first no preservative was added, in the second was added Triclosan, parabens were added in the third, in the fourth was added Chlorhexidine, and in the fifth and last one it was added the essential oil of *Thymus vulgaris* L., all in their optimal concentrations, and these samples were submitted to the challenge test. Antibiograms were also prepared, to check the action of the essential oil when applied directly on the colonies, this test was done for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. The oil was very effective against bacterial species, in both forms, pure and emulsified. It was also effective against the tested yeast; however, only in its pure form, because the essential oil didn't successfully preserved the emulsified form, suggesting a possible interference of the cosmetic formula in its antimicrobial action.

Key Words: Thyme, essential oil, preservatives, cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Estrutura química das moléculas de Timol e Carvacrol. Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.
- FIGURA 2** – Ramos de Tomilho (*Thymus vulgaris L.*).
- FIGURA 3** – Extração do óleo essencial de tomilho.
- FIGURA 4** – Formula de emulsão base.
- FIGURA 5** – Preparo das Emulsões.
- FIGURA 6** – Formação da Emulsão.
- FIGURA 7** – Estrutura Química de Metilparabeno. Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.
- FIGURA 8** – Estrutura Química de Propilparabeno. Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.
- FIGURA 9** - Estrutura Química de Triclosan. Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.
- FIGURA 10** – Estrutura Química de Digluconato de Clorexidina. Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.
- FIGURA 11** – Aplicação do óleo essencial à emulsão.
- FIGURA 12** – Emulsões contendo os diferentes conservantes.
- FIGURA 13** – Escala de McFarland.
- FIGURA 14** – Estrias em ágar Müeller Hinton.
- FIGURA 15** – Princípios do método de Kirby Bauer. Fonte: www.anvisa.gov.br
- FIGURA 16** – Introdução dos Discos.
- FIGURA 17** – Antibiogramas Prontos.
- FIGURA 18** – Método do Teste de Desafio.
- FIGURA 19** – Antibiograma para *Staphylococcus aureus*. Placa 01.
- FIGURA 20** – Antibiograma para *Staphylococcus aureus*. Placa 02.
- FIGURA 21** – Antibiograma para *Escherichia coli*. Placa 01.
- FIGURA 22** – Antibiograma para *Escherichia coli*. Placa 02.
- FIGURA 23** – Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*. Placa 01.
- FIGURA 24** – Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*. Placa 02.
- FIGURA 25** – Antibiograma para *Candida albicans*. Placa 01.
- FIGURA 26** – Antibiograma para *Candida albicans*. Placa 02.

FIGURA 27 – Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar manitol.

FIGURA 28 – Emulsão sem conservante em ágar manitol.

FIGURA 29 – Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar MacConkey.

FIGURA 30 – Emulsão sem conservante em ágar MacConkey.

FIGURA 31 – Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar Cetrimide.

FIGURA 32 – Emulsão sem conservante em ágar Cetrimide.

FIGURA 33 - Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar Sabouraud Dextrose.

FIGURA 34 - Emulsão sem conservante em ágar Sabouraud Dextrose.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5 CONCLUSÃO.....	37
6 BIBLIOGRAFIA.....	38

1 INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica de produtos cosméticos é essencial para garantir o seu desempenho correto, principalmente no que diz respeito à segurança, eficácia e aceitabilidade dos mesmos. Uma falha nas medidas preventivas pode gerar produtos inadequados ao consumo, que podem vir a prejudicar a saúde de quem os usa. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que as empresas produtoras implantem as normas de boas práticas de fabricação (BPF), conforme as normas técnicas oficialmente estabelecidas.

Dentre as exigências presentes nas normas, está a necessidade da realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação.

A partir da observação de mercado e das novas tendências em cosmetologia, foi possível concluir que cada vez mais o apelo “natural” se sobressai, devido a inúmeros fatores, tais quais a toxicidade e alergenicidade dos conservantes sintéticos, bem como a mudança de pensamento da sociedade atual, que visa produtos mais ecológicos

O *Thymus vulgaris* L. pertence à família Lamiaceae, é mais precisamente um subarbusto aromático da família das labiadas. Esse subarbusto possui folhas pequenas, lineares ou lanceoladas, suas flores podem ser róseas ou esbranquiçadas. É uma planta originária do Oeste Europeu ao Sudeste da Itália e é especialmente cultivada como condimento alimentar.

A planta possui uma grande quantidade de óleo essencial, rico em timol e carvacrol, moléculas químicas com um apreciável poder antimicrobiano

Os conservantes sintéticos utilizados nesse trabalho já possuem sua comprovada ação conservante, e serão usados para efeito de comparação da efetividade do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. São eles de diferentes classes químicas, como os parabenos (metilparabeno e propilparabeno), os derivados fenólicos (triclosan) e as bisbiguanidas catiônicas (digluconato de clorexidina) e como já mencionado alguns deles podem provocar efeitos indesejáveis em algumas pessoas.

Os microrganismos utilizados nesse trabalho foram de classe bacteriana, tais quais *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e também do reino fungi, tal qual a *Candida albicans*. A escolha desses microrganismos baseou-se na maior probabilidade de contaminação de produtos cosméticos, e também pela padronização do teste de desafio, que requer certas espécies para sua realização.

O presente trabalho tem por objetivo analisar a atividade conservante do óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.), em sua forma pura, e também aplicada à emulsão cosmética, e com isso, tentar substituir esses conservantes sintéticos por substâncias naturalmente

presentes no óleo essencial, com intuito de minimizar os efeitos adversos relacionados ao uso dessas substâncias sintéticas em formulações cosméticas.

1.1 Teste de Desafio

Foi reconhecido previamente que a avaliação da atividade antimicrobiana de um conservante, em formulação cosmética, só pode ser realizada através de testes, nos produtos acabados, que exijam preservação dos mesmos.

O Teste de Desafio do Sistema conservante é um teste padronizado que consiste na contaminação proposital dos produtos acabados com inóculos de cada um dos microrganismos: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Candida albicans* e/ou *Aspergillus sp*, determinando a carga sobrevivente em intervalos de tempo avaliados durante 28 dias. Esse teste tem como objetivo avaliar se a formulação fica segura e inalterada, frente a uma alta carga microbiana (por certo período de tempo), consequentemente nos permite verificar se o conservante está realizando a sua função de forma correta e eficaz. Através desse teste é possível determinar a validade estimada dos produtos finais.

1.2 Antibiograma dos Conservantes

Esse ensaio foi realizado para medir a susceptibilidade e resistência dos microrganismos selecionados frente aos conservantes sintéticos e também ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. em sua forma pura. O objetivo desse teste foi de avaliar o espectro de ação dessas substâncias para as diferentes espécies.

1.3 Óleos Essenciais em Formulações Cosméticas.

Atualmente há um aumento representativo da adição de óleos essenciais em produtos cosméticos. Isso se deve a complexidade desses óleos, que permitem formulações mais sofisticadas, com atividade biológica, aromas fortes e característicos e também a imagem de “marketing natural”, que está cada vez mais presente nesse ramo

A importante atividade antimicrobiana exibida por alguns óleos essenciais quando testados sobre forma de vapor ou emulsificados levou vários autores a propor o uso desses óleos como agentes conservantes para preparações cosméticas, sozinhos ou em conjunto com outros conservantes. Foi sugerido o uso dos óleos essenciais de canela, tomilho, limão, pinho e trevo; pois além de oferecer um aroma prazeroso, podem também garantir proteção contra bactérias e fungos. ¹

2 REVISÃO DE LITERATURA

A indústria de cosméticos é um dos setores da economia que vem crescendo muito nos últimos anos, tendo faturado no ano de 2004 valores na ordem de R\$ 13 bilhões. Uma das características desta indústria é a necessidade contínua de pesquisas em toda a cadeia produtiva e a introdução de inovações em suas linhas de produto.² A indústria de cosméticos engloba os setores de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, e conforme Garcia e Furtado³, caracteriza-se pela necessidade contínua de pesquisas de novos insumos e introdução de inovações em suas linhas de produtos.

O consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem. Esta é a realidade à qual está submetida, também, a indústria cosmética; formulação de produtos naturais, portanto a não inclusão de matérias primas sintéticas para, por exemplo, conservação do produto final.⁴

Conforme Lopes⁵, a multiplicação dos centros de pesquisa e desenvolvimento passa a ofertar cada vez mais novas tecnologias e produtos que se tornam obsoletos rapidamente. Este ambiente majora consideravelmente o consumo, levando ao aumento da exploração dos recursos naturais ao mesmo tempo em que eleva o descarte dos produtos considerados ultrapassados.

Segundo Chorilli et al.⁶ cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado. Os cosméticos, de acordo com os artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 1 e 3º, 49º e 50º do Decreto 79.094/77, podem ser enquadrados em quatro categorias: produtos de higiene, cosmético, perfume e produto de uso infantil. Pelo grau de risco que oferecem são classificados em grau 1 (produtos com risco mínimo) e grau 2 (aqueles com risco potencial), visando a finalidade do uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados quando de sua utilização.

Pelo fato dos produtos estarem susceptíveis a exposição à algum tipo de contaminação, é aconselhável fornecer alguma resistência ao crescimento microbiano. Para inibir o crescimento de organismos residuais e prevenir o crescimento de qualquer outra futura

contaminação, devem ser adicionados nos produtos, agentes químicos antimicrobianos, conhecidos como preservantes.⁷

Preservantes são substâncias com ação bactericida e/ou fungicida adicionadas a produtos de higiene pessoal, perfumes, cosméticos e alimentos com o objetivo de inibir o crescimento e proliferação de microrganismos, tanto para proteger os consumidores quanto para manter a integridade do produto. Mudanças na coloração, odor, consistência de um produto pode ser indícios de contaminação microbiológica. Para evitar essas alterações, a escolha do conservante tem que ser realizada conforme as características da formulação como: susceptibilidade à contaminação, característica físico-químicas e possíveis incompatibilidades. Um conservante ideal precisa ter algumas especificidades como: amplo espectro de atuação, ser efetivo em baixas concentrações para evitar alergias e intoxicações, ser solúvel em meio aquoso, ser estável em temperatura ambiente e pH neutro e não alterar as características do produto.⁸

Apesar de não desejável, há relatos na literatura de reações adversas a cosméticos.⁶ Viglioglia & Rubin⁹ dividem as reações adversas a cosméticos em: reações irritativas: imediatas (ex: hidróxido de sódio) ou acumulativa (ex: tensoativos); reações alérgicas ou sensibilizantes: dermatite de contato (ex: por princípios ativos, veículos, conservantes) ou granuloma alérgico (ex: zircônio); dermatites por fotossensibilização: fototoxia ou fotoalergia; reações sistêmicas: por inalação (ex: fragrâncias) ou por absorção percutânea (ex: persulfato de amônio); reações físicas e outras: por oclusão (ex: foliculite por óleos); ação carcinogênica. Hernandez & Mercier-Fresnel¹⁰ relatam que reações adversas a cosméticos podem ser ocasionadas principalmente pelos conservantes usados em formulações.

A natureza oferece uma infinidade de matérias primas que são potencialmente úteis para aplicação em produtos de cuidados pessoais.⁷ Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal, empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Além desta utilidade possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais e existem aproximadamente 70 condimentos diferentes, cultivados e utilizados em todo mundo.¹¹

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz.¹²

Conforme Novacosk e Torres¹³, os óleos essenciais contidos nas plantas aromáticas são responsáveis pelos diferentes odores que emanam das plantas. São complexos naturais de moléculas voláteis e odoríferas, sintetizadas graças à energia solar pelas células secretoras das

plantas aromáticas, e se apresentam como uma substância líquida e oleosa chamada óleo essencial. Os óleos essenciais podem conter diversas moléculas diferentes e em proporções perfeitamente adaptadas umas as outras. São muito utilizados na indústria cosmética, na perfumaria e na aromaterapia (técnica terapêutica que utiliza os óleos essenciais em massagens, inalações e banhos aromáticos). Muitas indústrias estão pesquisando os óleos essenciais como fontes alternativas, mais naturais e menos nocivas ao meio ambiente. A evaporação das essências da superfície das plantas é considerada um mecanismo de defesa contra as bactérias e fungos além de mecanismo de aproximação de insetos e pássaros polinizadores, garantindo a sua reprodução. É interessante perceber que em uma época na qual se prima a “alta tecnologia”, os estudos se voltem para a Mãe Natureza e desconfiem dos produtos sintéticos. Sabe-se que alguns óleos aromáticos apresentam propriedades anti-sépticas em diversos graus devido à sua riqueza química em fenóis, aldeídos e álcoois.

As espécies *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L., conhecidas como mil-folhas e tomilho produzem óleo essencial com atividade inseticida. A primeira produz óleo de coloração azul pela presença de sesquiterpenos azulênicos, sendo seus compostos majoritários o azuleno e o germacreno-D; a segunda é rica em carvacrol e timol.¹⁴ Sobre o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., inúmeras citações científicas apoiam as propriedades antimicrobianas e o classificam entre os óleos essenciais como o mais potente a esse respeito. A eficácia foi atribuída principalmente ao timol e carvacrol.¹⁵

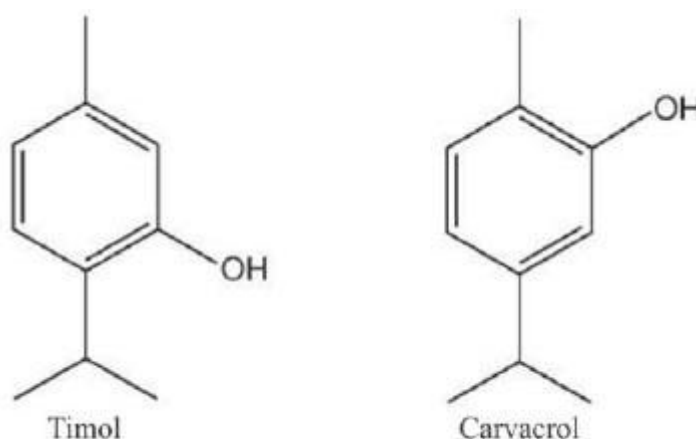


Fig. 1 – Estrutura química das moléculas de Timol e Carvacrol.

Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.

Em termos de segurança, o óleo de *Thymus vulgaris* L. deve ser usado com cuidado em produtos cosméticos de aplicação tópica, por causa do seu potencial efeito caustico na pele. A concentração máxima de timol de 0.15% em produtos de aplicação tópica é recomendada.¹⁶

Em um estudo anterior, o potencial caráter irritativo do óleo de *Thymus vulgaris* L. foi investigado na pele de voluntários saudáveis por métodos não invasivos de bioengenharia.

Após um bem padronizado e repetitivo método de exposição da pele, não foram observados sinais de irritação para uma concentração de 5% do óleo essencial de tomilho, nas mesmas formulações como aquelas aqui utilizadas.¹⁷

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração do óleo essencial de Tomilho.

O óleo essencial foi extraído em parceria ao Centro de Fitotecnia da APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), que realizou o cultivo, colheita e seleção dos ramos de *Thymus vulgaris L.* para a extração do seu óleo.

O processo utilizado foi de extração a vapor, através de um destilador específico para óleos essenciais. Foram separados 582 gramas do vegetal recém-colhido, no período da tarde, do dia nove de Abril 2012. A planta foi colocada dentro do destilador, e logo em seguida coberta completamente com água, deixando cerca de 10 centímetros a mais de água sob o vegetal.

Lacrrou-se o destilador com a sua tampa específica, de maneira a evitar perda de material, e o aparelho foi levado ao aquecimento a uma temperatura de 100°C.

Por volta das 16 horas e 30 minutos o processo de extração começou, quando a primeira gota do óleo essencial se depositou no coletor. Após esse momento, cronometrou-se o tempo de 1 hora. Ao final do processo, foram extraídos 9 gramas do óleo essencial puro, e o produto foi armazenado em um vidro âmbar de 10 gramas com batoque plástico e tampa de rosquear, previamente limpos.



Fig. 2 – Ramos de Tomilho (*Thymus vulgaris L.*).



Fig. 3 – Extração do óleo essencial de tomilho.

3.2 Emulsões.

As emulsões utilizadas nesse trabalho foram preparadas com o mínimo possível de ingredientes, para evitar possíveis interferências. As matérias primas foram adquiridas de fornecedores confiáveis e estavam lacradas, como também toda a vidraria e utensílios foram esterilizados, para que assim pudessem reduzir as chances de contaminação microbiana acidental.

Foram preparadas 250g de emulsão simples a base de água, álcool ceto estearílico, ácido esteárico e cocoamido propilbetaína.

FORMULAÇÃO:	
Álcool Ceto Estearílico.....	32%
Ácido Esteárico.....	13%
Cocoamido Propilbetaína.....	7%
Água Destilada.....	48%

Fig. 4 – Formula de emulsão base.

Após a fabricação dos 250g dessa Emulsão, a mesma foi dividida em 5 frascos plásticos de 50 gramas, previamente esterilizados por óxido de etileno, segundo o fabricante. As emulsões foram fabricadas no dia 26 de Outubro de 2012.



Fig. 5 – Preparo das Emulsões.



Fig. 6 - Formação da Emulsão.

3.4 Conservantes Sintéticos.

Para abranger os mais diversos tipos de conservantes usados na indústria cosmética, foram selecionados quatro conservantes sintéticos de três diferentes classes químicas.

3.4.1 Parabenos:

Esses compostos químicos são os ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico de cadeia curta, com uma hidroxila ligada ao anel benzênico. Foram selecionados dois representantes dessa classe, o primeiro mais hidrofílico e o segundo mais lipofílico, os dois aplicados em conjunto promovem uma proteção da fase aquosa e oleosa simultaneamente.

1º Metilparabeno (IUPAC: 4- hidroxibenzoato de metila).

2º Propilparabeno (IUPAC: 4- hidroxibenzoato de propila).

A soma desses conservantes não deve ser superior a 1,0% da Formulação. Encontram-se na forma de pó cristalino branco, e para a aplicação foram diluídos em quantidade suficiente de álcool etílico 96°GL.

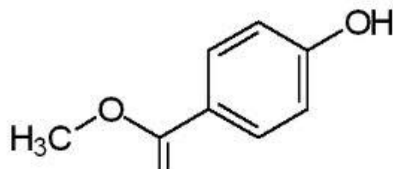


Fig. 7 – Metilparabeno.

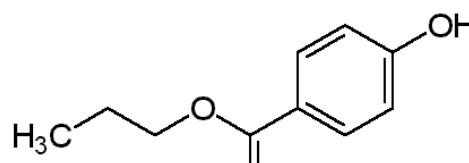


Fig. 8 – Propilparabeno.

Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.

3.4.2 Derivados Fenólicos:

O composto escolhido para representar essa classe química tem uma boa aceitabilidade e é bastante utilizado nesse setor. O Triclosan (IUPAC: 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)pheno), foi o composto selecionado, e pode ser aplicado em emulsões nas concentrações de 0,1 a 1,0%. Apresenta-se na forma de pó cristalino branco, e para sua aplicação também foi diluído em álcool etílico 96°GL.

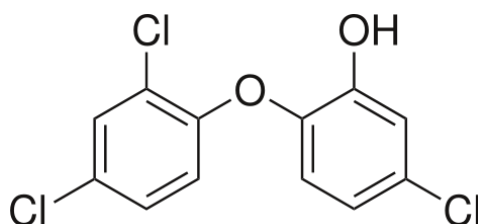


Fig. 9 – Triclosan.

Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.

3.4.3 Bisguanidas Catiônicas:

Foi selecionado o Digluconato de Clorexidina (IUPAC: *N',N''''-hexane-1,6-diylbis[N-(4-chlorophenyl)(imidodicarbonimidic diamide)*). Essa substância possui uma excelente aceitabilidade, é praticamente atóxica, sua concentração pode ser de até 1% nesse tipo de formulação. Apresenta-se na forma líquida, de coloração incolor a amarelo pálido.

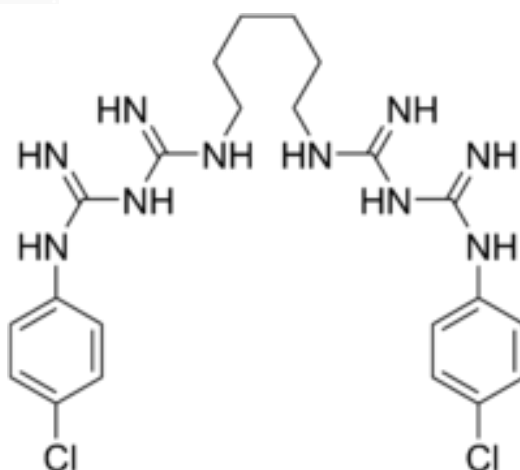


Fig. 10 – Digluconato de Clorexidina.

Fonte: *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed. - Schueller, R. & Romanowsky, P.

Os conservantes foram adquiridos através de uma farmácia de Manipulação, todos com certificado de qualidade do fornecedor, e aprovados para o uso.

3.5 Aplicações do Óleo Essencial de Tomilho e dos Conservantes á Emulsão.

As emulsões, previamente separadas em 5 frascos esterilizados de 50 gramas, foram submetidas a aplicação dos conservantes sintéticos e também ao óleo essencial de Tomilho.

Aplicou-se 1,0% de parabenos, o que equivale a 0,5 gramas de conservante para os 50 gramas do produto. Pelo fato da fase aquosa ser mais susceptível a contaminação microbiana, o Metilparabeno (Hidrofílico) é sempre aplicado em maior quantidade, no caso 0,3 gramas (60% dos conservantes totais da amostra). A quantidade de Propilparabeno aplicado foi 0,2 gramas (40% dos conservantes totais da fórmula). Ambos foram pesados no mesmo recipiente, e diluídos em quantidade suficiente de álcool etílico 96 ° GL, para uma melhor homogeneização a fórmula emulsionada.

Aplicou-se 1,0% de triclosan, 0,5 gramas, previamente diluído em quantidade suficiente de álcool etílico 96°GL, ao seu respectivo frasco, e em seguida o produto foi muito bem homogeneizada.

Aplicou-se 1,0% de digluconato de clorexidina, equivalente a 0,5 gramas, diretamente ao frasco contendo 50 gramas emulsão e realizou-se muito bem a homogeneização. Aplicou-se 5,0% (2,5 gramas) do óleo essencial de tomilho diretamente ao recipiente contendo 50 gramas de emulsão e realizou-se a completa, e uniforme, homogeneização.



Fig. 11 – Aplicação do óleo essencial à emulsão.



Fig. 12 - Emulsões contendo os diferentes conservantes.

3.6 Antibiograma dos Conservantes.

Esse procedimento foi realizado a fim de verificar o potencial e espectro de ação do óleo essencial de Tomilho, quando aplicado sob sua forma pura sob as colônias microbiológicas, para que pudéssemos descobrir se a forma emulsionada interferiria ou não na ação conservante dessa substância.

Para minimizar as chances de conclusões erradas, o teste foi realizado em duplicata, os materiais utilizados foram esterilizados em estufa a 150°C por 2 horas, os meios de cultura e a solução salina foram autoclavados antes do uso (á 134°C por uma hora), o processo de suspensão das colônias em solução salina foi realizado dentro da área de segurança da chama

proveniente do bico de Bunsen, e o esfregaço foi realizado dentro do aparelho de fluxo laminar.

Prepararam-se duas placas de Petri para cada um dos quatro microrganismos, totalizando oito placas. O meio de cultura de escolha para a realização desse teste foi o Müller Hinton, uma vez que facilita permeação dos produtos testados no meio, sem interferir na ação, e por ser o meio padronizado para o teste de susceptibilidade antimicrobiana.

Para realizar o esfregaço de cada microrganismo, precisou-se preparar uma suspensão direta das colônias, já então cultivadas. Essa suspensão foi preparada em solução salina 0,9%, até obter uma turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml, padrão estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.



Fig. 13 – Escala de McFarland.

Dentro do aparelho de fluxo laminar, foram realizados os inóculos dessas suspensões às placas de petri contendo o meio de cultura já pronto. Com o auxílio de um swab, foram feitas estrias superficiais seguindo a técnica de esgotamento de inóculo, a placa foi totalmente preenchida por estrias.



Fig. 14 – Estrias em ágar Müller Hinton.

A técnica de antibiograma escolhida foi a de disco-difusão (Método de Kirby-Bauer), que consiste em colocar pequenos discos de papel filtro, impregnados com a substância a ser

analisada, em diferentes zonas da placa contendo o meio de cultura. Haverá a difusão dos antimicrobianos ao redor de cada disco, e um halo de lise se tornará visível.

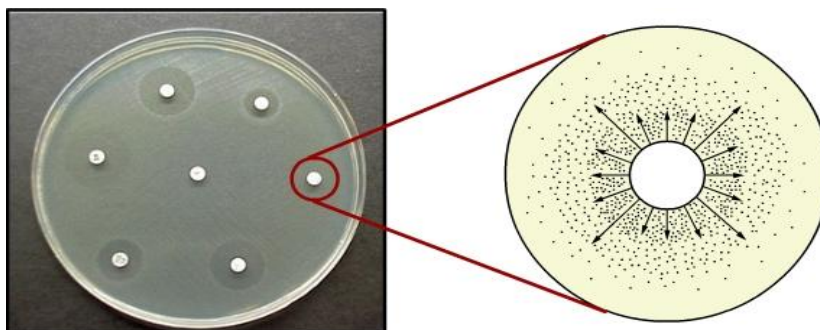


Fig. 15 – Princípios do método de Kirby Bauer.

Fonte: www.anvisa.gov.br

O antibiótico usado para efeito comparativo foi a Lomefloxacina, e o antifúngico foi a Nistatina. Usaram-se discos prontos já vendidos em kits de antibiograma, para a observação do surgimento do halo, caso o óleo de tomilho não formasse um halo visível. Impregnaram-se discos de papel filtro com óleo essencial de tomilho e esses discos foram colocados na parte superior das placas contendo as estrias. Na parte inferior, foram colocados os discos do antibiótico, para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli*. Os discos de antifúngico foram usados apenas para a *Candida albicans*.

Após todo esse processo, as placas foram colocadas em estufa de crescimento por um período de 48 horas a uma temperatura de 37°C.



Fig. 16 – Introdução dos Discos.

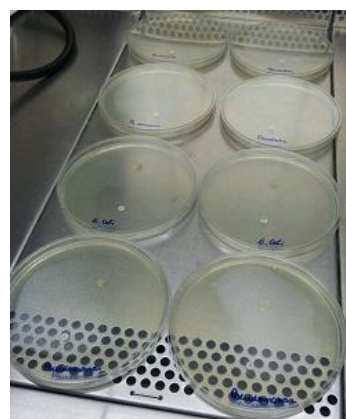


Fig. 17 – Antibiogramas Prontos.

3.7 Teste de Desafio – “Challenge Test”.

O teste de desafio consiste na contaminação proposital do produto com carga de microrganismos específicos, e também no monitoramento dos sobreviventes em intervalos de tempo, segundo métodos e padrão internacionalmente recomendados, para garantir um produto final seguro e estável.¹⁰

Para a realização desse teste, todos os cuidados já anteriormente citados também foram tomados. O teste foi realizado em triplicata para cada microrganismo utilizado, em cada formulação testada, foram testadas as emulsões com conservantes sintéticos, a emulsão contendo o óleo essencial e a emulsão sem conservantes.

Foi preparada uma suspensão com os microrganismos (diferentes suspensões para cada espécie usada), essa suspensão foi diluída em solução salina até obter o grau de turbidez igual a 0,5 na escala McFarland que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL ou 10^5 esporos ou células de fungos por grama ou mL de formulação. Foram transferidos 0,5mL dessa suspensão para um recipiente contendo 20g da emulsão cosmética contendo o óleo essencial de tomilho, e realizou-se a homogeneização.

Em seguida, pesou-se 1,0 g dessa emulsão contaminada em um tubo de ensaio estéril e adicionou-se 9,0 ml de solução salina estéril, sob agitação manual constante, obtendo a primeira diluição (10^{-1}). A partir dessa diluição foram feitas diluições seriadas, obedecendo à mesma proporção (1,0 mL da suspensão 10^{-1} + 9mL de solução salina, dando sequência às diluições até obter a 10^{-3}). A partir da última diluição (10^{-3}) foram retiradas alíquotas de 0,5 mL com pipeta de Pasteur estéril, e foram adicionadas a placas de Petri contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo, esse procedimento foi realizado em triplicata. E as placas foram colocadas em estufa a temperatura de 37° C, para o crescimento. Em paralelo, foi realizado o controle, utilizando a mesma carga microbiana e mesmos procedimentos, porém utilizou-se a emulsão sem conservantes.

O ágar utilizado para o crescimento de *Escherichia coli* foi o MacConkey, por ser específico para enterobactérias. O ágar Cetrimide foi o escolhido para *Pseudomonas aeruginosa*, o ágar Manitol foi o escolhido para *Staphylococcus aureus* e o ágar Sabouraud dextrose foi o utilizado para *Candida albicans*.

Esse procedimento também foi realizado para as emulsões com conservante sintético, para um efeito de controle.

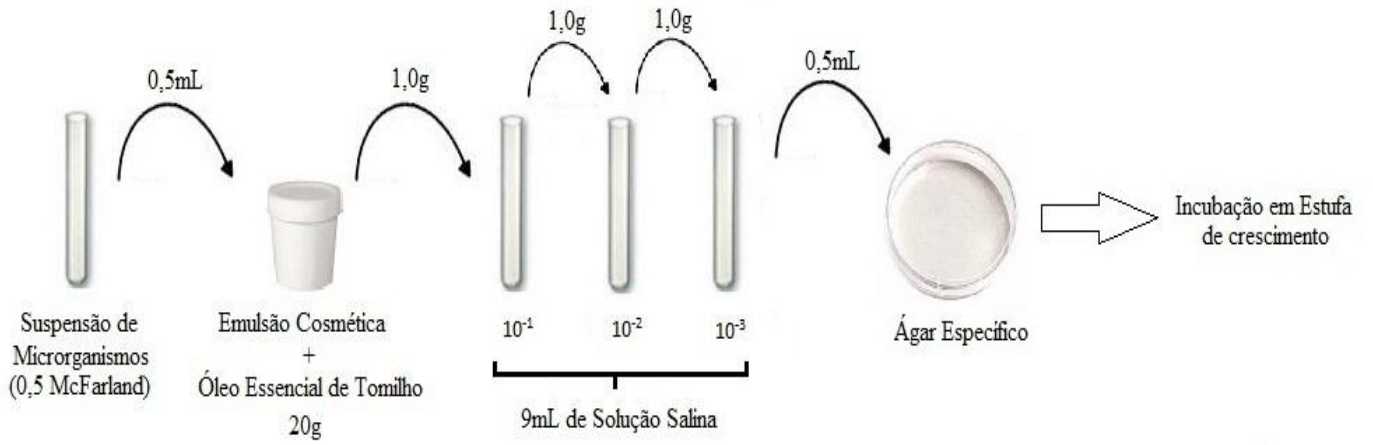


Fig. 18 – Método do Teste de Desafio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 ANTIBIOGRAMA .

O resultado desse teste foi colhido após um período de 48 horas, e foi bastante satisfatório.

O óleo essencial de tomilho se mostrou um eficaz antimicrobiano, quando aplicado diretamente sobre as colônias, inibindo a proliferação de fungos e bactérias simultaneamente.

Foi possível observar um halo de lise para todas as espécies testadas.

Legendas: **T** - Óleo essencial de Tomilho. **A** - Antibiótico ou Antifúngico.

4.1.1- *Staphylococcus aureus*.

Essa cepa bacteriana se mostrou resistente ao antibiótico utilizado (Lomefloxacina), não apresentando halo visível. Entretanto, mostrou-se vulnerável ao óleo essencial de Tomilho, apresentando um halo bem nítido de 2,0 centímetros em uma placa, e 3,0 centímetros em outra. Comprovando a eficácia dessa substância sobre essa espécie.

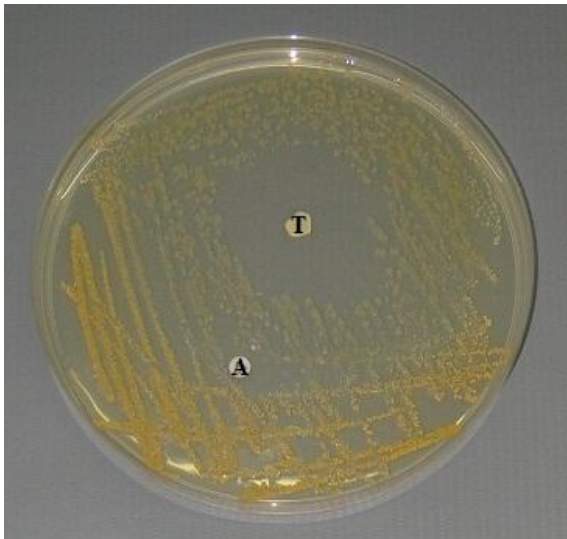


Fig. 19 – Antibiograma para *Staphylococcus aureus*. Placa 01.



Fig. 20 - Antibiograma para *Staphylococcus aureus*. Placa 02.

4.1.2- *Escherichia coli*.

Essa cepa bacteriana se mostrou susceptível ao Antibiótico e também ao óleo essencial, apresentando halos de lise bacteriana visível para os dois produtos. O antibiótico apresentou

um halo de 3,5 centímetros em uma placa, e 4,5 centímetros em outra, enquanto o tomilho apresentou 4,0 centímetros em uma placa e 2,0 centímetros na segunda, se mostrando eficaz contra essa espécie bacteriana.

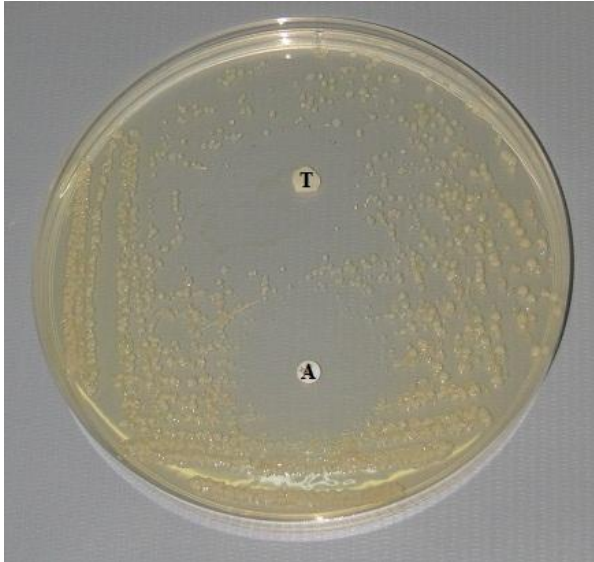


Fig. 21 - Antibiograma para *Escherichia coli*. Placa 01.



Fig. 22 - Antibiograma para *Escherichia coli*. Placa 02.

4.1.3 - *Pseudomonas aeruginosa*.

Essa espécie se mostrou mais susceptível ao antibiótico, apresentando halos maiores e mais nítidos, de 4,0 e 3,2 centímetros. Entretanto, o óleo essencial também demonstrou a sua eficácia contra essa espécie, menos nítida do que para as outras, porém suficiente, formando halo de 2,0 centímetros na primeira placa, e 2,3 centímetros na segunda.



Fig. 23 - Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*. Placa 01.



Fig. 24 - Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*. Placa 02.

4.1.4 - *Candida albicans*.

Essa levedura se mostrou susceptível ao antifúngico implantado ao meio (Nistatina), havendo formação de um halo de lise de 2,4 centímetros na primeira placa e 2,7 centímetros na segunda. O óleo essencial de tomilho também demonstrou eficácia contra essa espécie, havendo o surgimento de um halo de lise de 3,5 centímetros na primeira placa, e 3,0 centímetros na segunda.

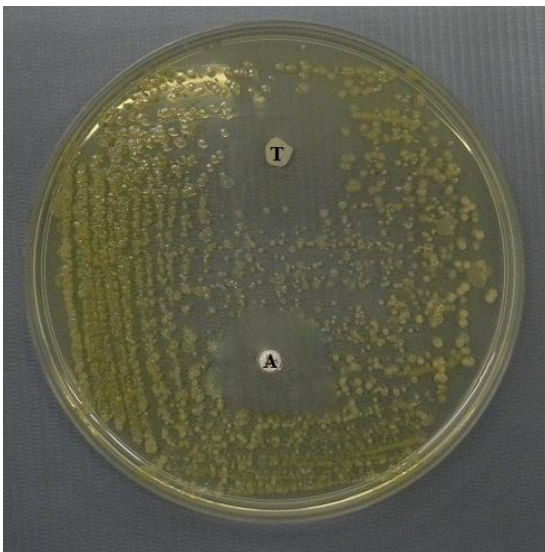


Fig. 25 - Antibiograma para *Candida albicans*. Placa 01.



Fig. 26 - Antibiograma para *Candida albicans*. Placa 02.

4.2 TESTE DE DESAFIO (CHALLENGE TEST)

Os resultados desse teste foram colhidos em duas etapas, no início (24 horas após a contaminação das amostras) e no final (30 dias após a contaminação das amostras), e os resultados foram muito semelhantes nessas duas fases.

4.2.1- *Staphylococcus aureus*.

Foram analisadas todas as placas preparadas com esse microrganismo, não houve crescimento dessa espécie nas placas que continham a emulsão com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., uma vez que não houve o surgimento da cor específica para esse microrganismo quando em ágar Manitol (que se torna amarelado na presença dessa

espécie), contudo houve o surgimento de colônias fúngicas em pequena proporção. Acredita-se que esporos desse microrganismo possam ter contaminado as amostras durante o processo de fabricação ou estavam presentes nas matérias primas usadas. A emulsão contendo o óleo essencial de tomilho submetida ao teste não apresentou alterações visuais ou sensitivas, tais quais coloração, odor e aspecto, se mantendo igual (durante todo o teste) à amostra não contaminada. O que possivelmente indica a eficácia do óleo como conservante para *Staphylococcus aureus*. Não houve crescimento algum nas placas dos conservantes sintéticos, bacteriano ou fúngico, comprovando ainda mais a eficácia dos mesmos. E na amostra sem conservantes houve crescimento de colônias incontáveis desse microrganismo, nitidamente visível pela mudança de coloração apresentada em todos os meios de cultura testados.

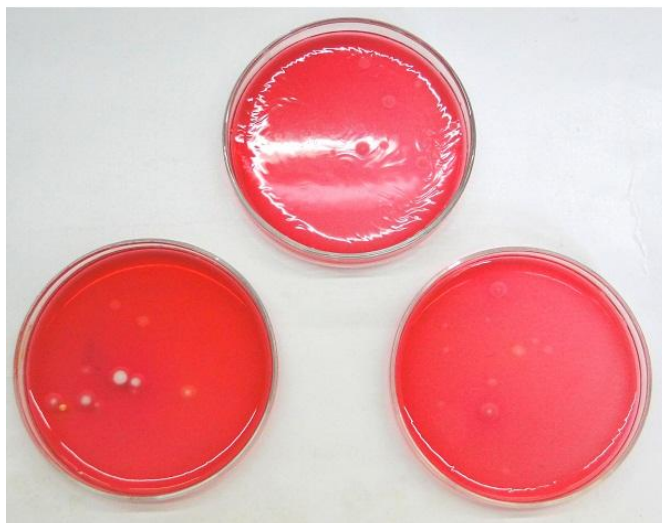


Fig. 27 – Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar manitol.

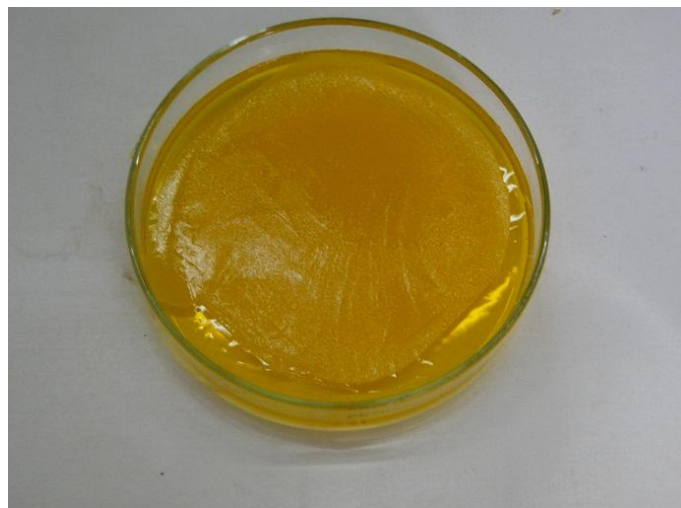


Fig. 28 - Emulsão sem conservante em ágar manitol.

4.2.2 - *Escherichia coli*.

Analisou-se todas as placas preparadas com esse microrganismo, o ágar escolhido para essa cultura foi o MacConkey, específico para enterobactérias, e quando em presença de *Escherichia coli* se torna violeta. Nas placas contendo a emulsão com o óleo essencial não houve crescimento dessa bactéria especificamente. Contudo houve contaminação por uma espécie fúngica, novamente, podem ter vindo da própria matéria prima ou de esporos fúngicos durante os procedimentos laboratoriais. Apesar de não conter o crescimento de leveduras, o óleo essencial de tomilho em emulsão se mostrou eficaz contra a bactéria *Escherichia coli*, pois não houve o surgimento da cor específica no ágar. A emulsão preservada com o óleo essencial não alterou coloração, odor e aspecto, se mantendo igual à amostra não submetida ao teste. As amostras testadas com os conservantes sintéticos foram suficientemente preservadas, não havendo crescimento nas placas utilizadas, e se mantendo inalteradas fisicamente, comprovando mais uma vez a eficácia dos mesmos. E nas placas sem conservante houve crescimento de colônias incontáveis e específicas dessa bactéria, facilmente observável pela aparição da tonalidade violeta nas placas.

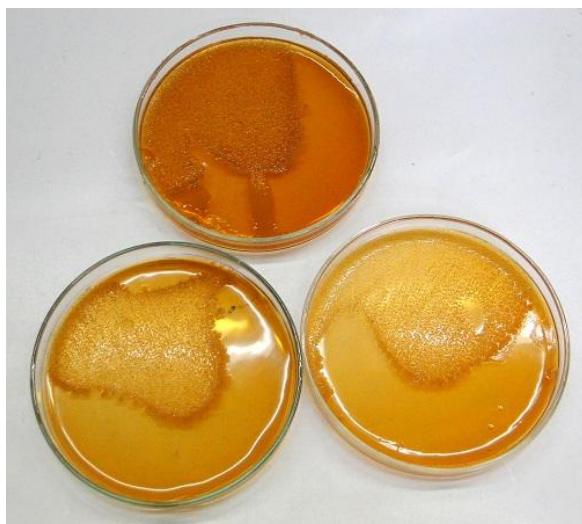


Fig. 29 - Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar MacConkey.



Fig. 30 - Emulsão sem conservante em ágar MacConkey.

4.2.3 - *Pseudomonas aeruginosa*.

Assim como os microrganismos anteriores, analisou-se todas as placas preparadas com essa bactéria, o ágar de escolha foi o Cetrimide, é específico, e em presença de

Pseudomonas aeruginosa se torna esverdeado. Não houve crescimento desse microrganismo nas placas contendo o óleo essencial de tomilho, contudo, novamente, houve o crescimento de outro microrganismo, provavelmente fungos, que já estavam presentes nas matérias primas ou seus esporos contaminaram as amostras durante os processos laboratoriais. A emulsão preservada com o óleo essencial não teve alterações visuais e organolépticas, se mantendo intacta. Não houve crescimento microbiológico nas placas em que se testaram as emulsões com os conservantes sintéticos, demonstrando novamente a ação dos mesmos. Nas placas usadas para testar a emulsão sem conservantes, houve crescimento dessa bactéria, novamente visível pela mudança de coloração do meio de cultura, que se tornou esverdeado pela presença dessa espécie.



Fig. 31 - Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar Cetrimide.



Fig. 32 - Emulsão sem conservante em ágar Cetrimide.

4.2.4 - *Candida albicans*.

Foram analisadas todas as placas com esse microrganismo, verificou-se que houve crescimento de poucas leveduras dessa espécie em duas placas de ágar Sabouraud Dextrose (meio de cultura de escolha para fungos e leveduras), com a emulsão acrescida de óleo de tomilho, indicando que o sistema conservante não foi suficiente para inibir a proliferação total da *Candida albicans*. Esse microrganismo foi suficientemente inibido quando em contato direto com o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L, o que nos leva a crer que a forma emulsionada possa ter de alguma maneira, interferido na ação antimicrobiana do óleo. Possivelmente pela formação de micelas com os tensoativos, havendo a diminuição do contato direto do óleo com as leveduras, e pela alta quantidade de água do meio, que deixam a fórmula mais susceptível a esse tipo de crescimento. Em outras palavras, o óleo não conseguiu inibir completamente o crescimento de leveduras de *Candida albicans*, porém reduziu significativamente a velocidade de crescimento e a quantidade de colônias viáveis, quando em comparação a emulsão sem sistema conservante. Nessa emulsão não protegida houve um crescimento maior e mais rápido desse microrganismo, em todas as placas testadas. Todos os conservantes sintéticos inibiram de maneira satisfatória essa espécie, não havendo crescimento em suas placas. Não houve alterações visuais e organolépticas na emulsão preservada com óleo de tomilho e pelos conservantes sintéticos. Contudo, houve a separação da fase aquosa da oleosa na emulsão sem preservantes testada com esse microrganismo, indicando uma alteração quanto ao aspecto, que não pode ocorrer em um produto que será comercializado. Nesse caso, mesmo não atingindo os critérios de conservante de maneira completamente satisfatória, a emulsão com óleo de tomilho se mostrou mais resistente à proliferação desse microrganismo, se mantendo inalterada fisicamente.

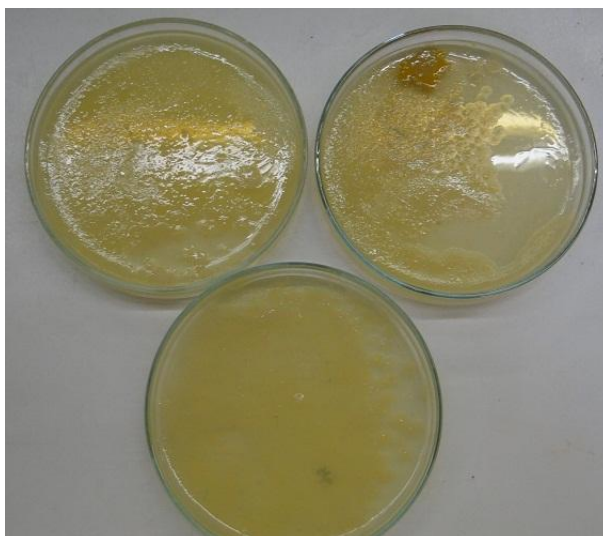


Fig. 33 – Emulsão contendo óleo essencial de tomilho em ágar Sabouraud Dextrose

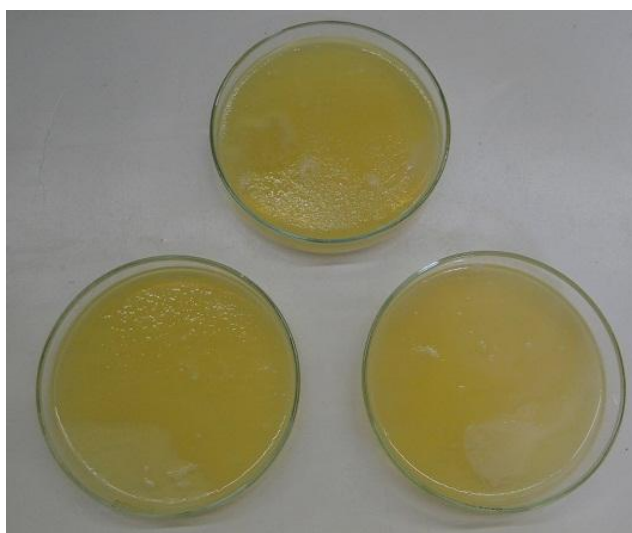


Fig. 34 – Emulsão sem conservante em ágar Sabouraud Dextrose.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de tomilho sucedeu em satisfazer os critérios de preservante contra cepas bacterianas, tanto em sua forma pura (aplicada diretamente sobre as colônias durante a realização do antibiograma), quanto em sua forma emulsionada, inibindo o crescimento das três espécies bacterianas testadas, em ambos os casos. O bom desempenho desse composto se deve principalmente a sua complexidade química, com a presença de compostos como o Timol e Carvacrol, que já são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. Entretanto, o óleo não sucedeu completamente em satisfazer esses critérios de preservante da emulsão quando se tratou das leveduras de *Candida albicans*, quando o óleo essencial foi testado diretamente sobre as colônias, durante o antibiograma, foi possível verificar o surgimento de um halo de lise bastante significativo para essa espécie, porém não houve uma completa preservação da emulsão acrescida do óleo quando submetida ao teste de desafio.

Esses resultados podem ser atribuídos a uma possível interferência da forma emulsionada na atividade do óleo, ou a uma inadequação das doses empregadas, sugerindo que em trabalhos futuros sejam usadas doses mais elevadas. A boa atividade antifúngica para *Candida albicans* do óleo essencial de tomilho, observada no antibiograma, pode ser mais estudada a fim de explorar esse potencial para tratamento de infecções cutâneas causadas por esse microrganismo.

O uso de óleos essenciais como conservantes em formulações cosméticas é frequentemente desencorajado, por causa de sua ação inferior quando em comparação aos conservantes sintéticos. Os óleos essenciais possuem odor e cor característicos, que podem interferir no produto final. E também, por se tratar de substâncias de origem natural, estão sujeitos a uma potencial perda de atividade antimicrobiana, devido principalmente a sua volatilidade. Todavia, com formulações mais sofisticadas, técnicas modernas de encapsulação, essas características podem ser utilizadas a favor do produto final, em termos de marketing e segurança do consumidor.

Apesar de não satisfazer todos os critérios de maneira 100% eficaz, os resultados obtidos para as bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e para as leveduras de *Candida albicans* indicam que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* possui uma potente atividade antimicrobiana, que pode, e deve ser mais bem estudada em trabalhos futuros.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1 Manou, I.; Bouillard, L.; Devleeschouwer, M.J. ; Barel, A.O. (1997) – *Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. Journal of Applied Microbiology, Brussels.*
- 2 Avelar, A.C.M; Souza, C.G (2005) - *Desenvolvimento de produtos na indústria nacional de cosméticos: um estudo de caso.* – CEFET, Rio de Janeiro.
- 3 Garcia, R.; Furtado, J. (2002) - *Estudo da competitividade de cadeias integradas no Brasil: impacto das zonas de livre comércio – cadeia:cosméticos*, Núcleo de Economia Industrial e da Tecnologia (UNICAMP-IENEIT).
- 4 Parcker. J. F; Luz. M. M. S. (2006) *Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural* – Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1): 102-107, Jan/Mar. 2007.
- 5 Lopes. R. H. (2011) *Demanda global e produção local de matéria-prima para a indústria de biocosméticos no Pólo Industrial de Manaus* – UFAN. Amazonia.
- 6 Chorilli, M.; Scarpa, M.V.; Leonardi, G.R.; Franco, Y.O.(2006) -*Toxicologia dos Cosméticos, Latin America Journal of Pharmacy.*
- 7 Shueller, R. & Romanowski, P. – *Beginning Cosmetic Chemistry*, 3. ed., Illinois, Alluredbooks, 2008.
- 8 Tavares A. T.; Pedriali C. A. (2011) *Relação de uso de parabeno em cosméticos e a sua ação estrogênica na indução no câncer no tecido mamário* – Revista Multidisciplinas da Saúde – Ano III – Nº06.
- 9 Viglioglia, P.A. & J. Rubin (1991) “*Cosmiatria II*”, AP Americana de Publicaciones, Buenos Aires.

10 Hernandez, M. & M.M. Mercier-Fresnel (1999) “*Manual de Cosmetologia*”, 3. ed., Revinter, Rio de Janeiro, págs. 133-7.

11 Shelef, L. A. *Antimicrobial effects os spices. Journal of Food Safety*, Westport, n. 6, p. 29-44, 1983.

12 Chao, S. C.; Young, D. G. (2000) - *Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. Journal Essentials Oil Research*, [S.l.], v. 12, p. 630-649.

13 Novacosk R.; Torres R. S. L. A. (2006) *Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca altenifolia*), Cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*)* – Revista Analytica – Ed. Nº 21 – Pg. 36-39 – 2006.

14 Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M.; Baliza, D.P. (2006) – *Não-preferência de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae) por óleos essenciais de Achillea millefolium L. e Thymus vulgaris L.* – Universidade federal de Lavras, Minas Gerais.

15 Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I. (1993) *Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. Journal of Ethnopharmacology* 39, p. 167-170.

16 Patri,G. and Silano, V. (1989) *Plant preparations used as ingredients of cosmetic products. Council of Europe*, 1st edn. Strasbourg.

17 Barel, A.O., Manou, I., Baudenelle, C., Lambrecht, R. and Clarys P. (1995) *Assessment of the potential skin irritation caused by the cosmetic use of essential oils from aromatic plants (Lamiaceae)*. Abstract presented at the *International Conference on the Prevention of Contact Dermatitis, Zurich, 4–7 October 1995. Allergologie* 18, 465–466.