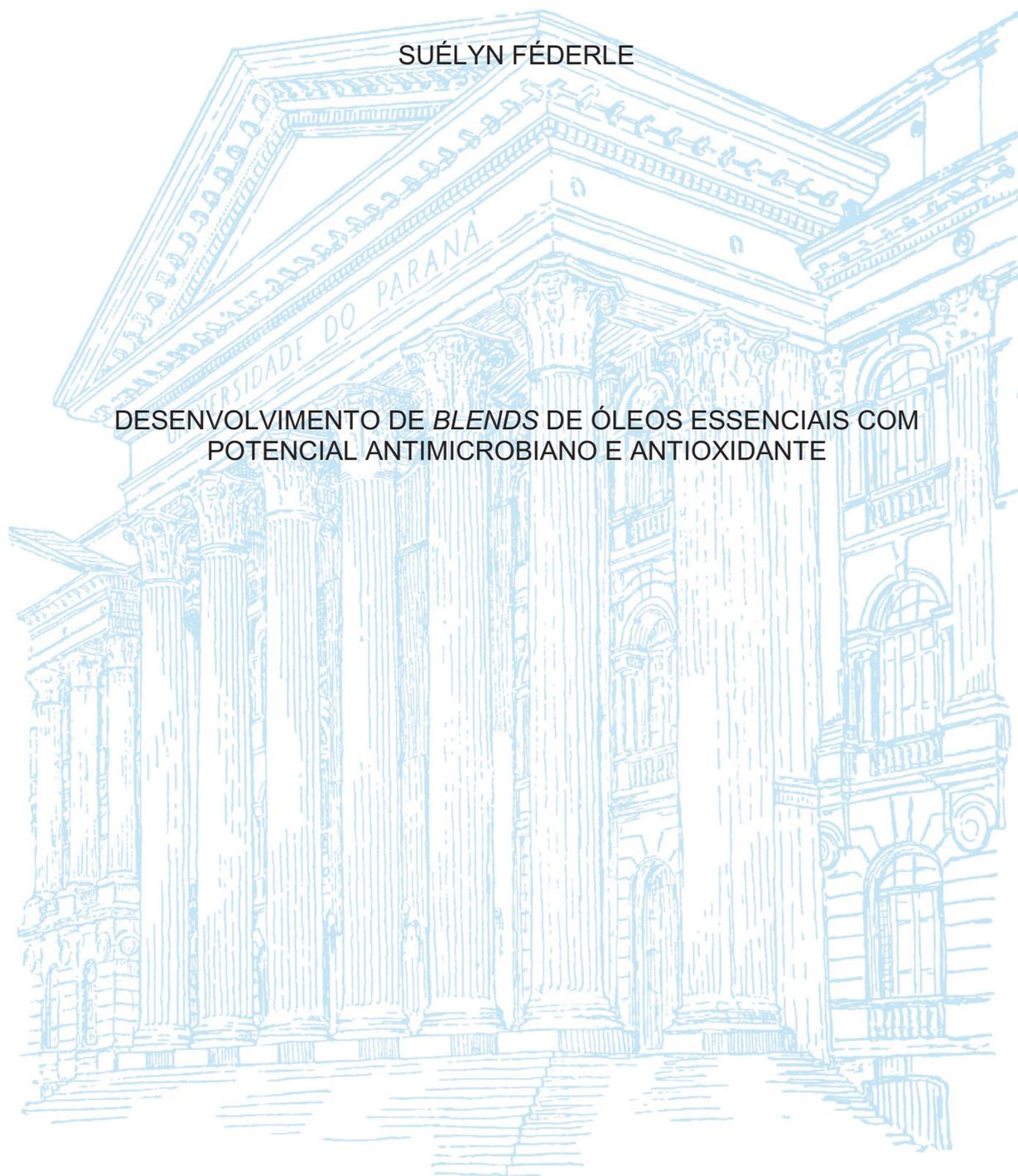


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUÉLYN FÉDERLE

DESENVOLVIMENTO DE *BLENDS* DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE



CURITBA
2018

SUÉLYN FÉDERLE

DESENVOLVIMENTO DE *BLENDS* DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami

CURITIBA
2018

Dedico este trabalho à minha família: minha mãe Sirlene, meu pai José, meu irmão Édipo e meu marido Leandro. Muito obrigada pelo incentivo e apoio nestes dois anos. Dedico também ao meu orientador, Professor Fabio Murakami, pela oportunidade e conhecimento transmitido, e à querida Professora Mayumi Sato, que me incentivou desde os primeiros semestres da graduação e que sempre acreditou no meu trabalho.

Féderle, Suélyn

Desenvolvimento de *blends* de óleos essenciais com potencial antimicrobiano e antioxidante / Suélyn

Féderle – Curitiba, 2018.

100 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

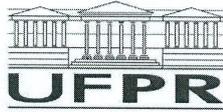
Orientador: Professor Dr. Fábio Seigi Murakami

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Óleos essenciais. 2. Fragrância. 3. Atividade biológica. 4. Cosmético natural. I. Murakami, Fábio Seigi. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 668.55



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SUÉLYN FÉDERLE** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2018.


FÁBIO SEIG MURAKAMI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LARISSA SAKIS BERNARDI

Avaliador Externo (UNICENTRO)


DANIELA FLORÊNCIO MALUF

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, à minha família. Aos meus pais, que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e me deram todo o suporte para chegar até aqui, sem medir esforços para tornar tudo possível. Agradeço também ao meu irmão Édipo que me inspirou com toda sua dedicação e força de vontade e que tem me apoiado em tantos momentos. Vocês são a razão de tudo.

Agradeço ao meu marido Leandro pelo apoio e compreensão nos tantos filmes e viagens que ficaram para depois. Tenha certeza que sem você por perto tudo teria sido muito mais difícil.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Professor Fábio, por ter aceitado a orientação e pela paciência nos momentos em que eu não conseguia me dedicar integralmente por conta do meu trabalho. Sem sua compreensão nada disso teria sido possível. Agradeço à Professora Mayumi, minha grande incentivadora desde o início da graduação. Muito obrigada por ter acreditado no meu trabalho e pela recomendação ao Professor Fábio. Também ao Professor Itamar pela recomendação e suporte no laboratório.

Agradeço às minhas colegas Laiane, Andressa e Maria da Graça pelas incontáveis ajudas e conhecimentos transmitidos. Agradeço às alunas de Iniciação Científica Thais, Bruna e Mariana pela colaboração nas etapas finais dos experimentos e às técnicas de laboratório Luciana e Inês pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Agradeço ao Grupo Boticário, na figura dos gestores, pelo suporte com algumas das ferramentas utilizadas neste trabalho, e em especial à Analista Vanesca pela ajuda com os ensaios de *Challenge Test*. Agradeço também à Casa de Fragrâncias Firmenich por gentilmente doar os óleos essenciais que foram utilizados neste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Farmácia pela oportunidade de uma formação gratuita e de qualidade.

Agradeço, enfim, a esta força maior que chamo Deus por colocar no meu caminho pessoas do bem e que só me fazem crescer como ser humano e profissional.

RESUMO

Existe uma tendência, no Brasil e no mundo, de consumo de cosméticos naturais e uma grande expectativa em relação ao crescimento deste mercado. Esta tendência surge da necessidade de produtos *chemical-free*, da mudança no estilo de vida das pessoas e na conscientização dos consumidores. Além disso, estudos recentes questionam a segurança toxicológica de ingredientes sintéticos comumente utilizados em cosméticos, como por exemplo o conservante metilparabeno (MP) e o antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT). Por outro lado, estudos mostram que óleos essenciais (OE), ingredientes naturais e constituintes frequentes de fragrância, apresentam importante atividade antimicrobiana e antioxidante. Dentro deste contexto, existe um grande potencial de unir atributos hedônicos (perfumação agradável) e funcionais (atividade antioxidante e antimicrobiana) em um único ingrediente composto somente de OEs e que atue, ao mesmo tempo, como fragrância e conservante de cosméticos, sendo este o principal objetivo deste trabalho. Para tanto, 9 OEs foram analisados quanto a sua atividade antioxidante, pelo método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), e antimicrobiana, pelo método de microdiluição em placa. Também foi avaliada a aceitabilidade olfativa de cada OE através de teste sensorial afetivo quantitativo. Os resultados destes três métodos guiaram a seleção de 6 dos 9 OEs para que, combinados em diferentes proporções, constituíssem 3 *blends* a serem empregados em uma base emulsionada. Para confirmação de sua eficácia, os *blends* foram testados pelos mesmos métodos empregados para os OEs isolados, além de serem submetidos ao teste desafio do conservante (*Challenge Test*). Os resultados levaram a seleção dos OEs de anis, canela, cravo, orégano, menta e tomilho para a construção dos *blends*, uma vez que estes apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana igual ou superior ao MP e BHT, respectivamente, além de serem melhor aceitos pelo consumidor. Os *blends* desenvolvidos (B1, B2 e B3) contêm iguais proporções de anis, cravo, canela e tomilho e se diferem nas proporções de orégano e menta, sendo que o B1 apresenta quantidades iguais dos dois OEs, o B2 apresenta maior proporção de menta e o B3 maior proporção de orégano. Todos os *blends* apresentaram atividade antioxidante superior ao BHT ($IC_{50}=0,35\pm 0,01\mu\text{L/mL}$), sendo que o B3 apresentou a maior atividade ($IC_{50}=0,16\pm 0,003\mu\text{L/mL}$). Em relação a atividade antimicrobiana, o B3 é o único que apresenta atividade estatisticamente igual ou superior ao MP para todos os microorganismos testados (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*). O único *blend* penalizado em relação ao MP foi o B2 que apresentou atividade antimicrobiana estatisticamente inferior ao MP para *E. coli* ($IC_{50}=0,31\pm 0,01\mu\text{L/mL}$ vs $IC_{50}=1,17\pm 0,37\mu\text{L/mL}$). No entanto, em termos de aceitação pelo consumidor, o B3 foi o menos aceito com somente 18% da preferência. Em relação ao *Challenge Test*, todos os *blends* apresentaram redução superior a 2 logs (10^6UFC/g para 10^1UFC/g) na contagem microbiana a partir do 7º dia e contagem <10 a partir do 14º dia, atendendo aos aspectos regulatórios brasileiros para ingrediente conservante. Portanto, para a combinação de melhor atividade biológica (conservante) e melhor aceitação pelo consumidor (fragrância) o B1 foi o que apresentou as melhores características, sendo, assim, um potencial candidato para um novo insumo ativo natural para cosméticos. Além disto, estes resultados comprovam que é possível substituir ingredientes sintéticos controversos por alternativas naturais.

Palavras-chave: óleo essencial, fragrância, atividade biológica, cosmético natural.

ABSTRACT

There is a tendency, in Brazil and in the world, for the consumption of natural cosmetics and a great expectation in relation to the growth of this market. This trend stems from the need for chemical-free products, changing people's lifestyles and consumer awareness. In addition, recent studies have questioned the toxicological safety of synthetic ingredients commonly used in cosmetics, for example the antimicrobial methylparaben (MP) and the antioxidant butylhydroxytoluene (BHT). On the other hand, studies show that essential oils (EO), natural ingredients and frequent constituents of fragrance, present important antimicrobial and antioxidant activity. Within this context, there is a great potential to combine hedonic (pleasant perfuming) and functional attributes (antioxidant and antimicrobial activity) in a single ingredient composed only of EOs and that act, at the same time, as fragrance and cosmetic preservative, being this the main objective of this work. For this purpose, 9 OEs were analyzed for their antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay and antimicrobial by the plate microdilution method. It was also evaluated the olfactory acceptability of each EO through quantitative affective sensorial test. The results of these three methods guided the selection of 6 of the 9 EOs that, combined in different proportions, constituted 3 blends to be applied in an emulsified base. To confirm their efficacy, the blends were tested by the same methods used for the isolated EOs, in addition to being tested by challenge test. The results led to the selection of the EOs of anise, cinnamon, clove, oregano, mint and thyme for the construction of the blends, since they presented antioxidant and antimicrobial activity equal to or higher than MP and BHT, respectively, besides being better accepted by consumer. The blends developed (B1, B2 and B3) contain equal proportions of anise, clove, cinnamon and thyme and differ in the proportions of oregano and mint, with B1 having equal amounts of both OEs, B2 having a higher proportion of mint and the B3 highest proportion of oregano. All the *blends* presented higher antioxidant activity than BHT ($IC_{50}=0.35 \pm 0.01\mu\text{L}/\text{mL}$), and B3 presented the highest activity ($IC_{50}=0.16 \pm 0.003\mu\text{L}/\text{mL}$). In relation to the antimicrobial activity, B3 is the only one that presents activity statistically equal to or greater than MP for all microorganisms tested (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*). The only blend penalized in relation to PM was B2, which showed statistically lower antimicrobial activity than MP for *E. coli* ($IC_{50}=0.31 \pm 0.01\mu\text{L}/\text{mL}$ vs $IC_{50}= 1.17 \pm 0.37\mu\text{L}/\text{mL}$). However, in terms of consumer acceptance, B3 was the less accepted with only 18% of preference. Regarding the challenge test, all blends presented a reduction of more than 2 logs ($10^6\text{UFC}/\text{g}$ to $10^1\text{UFC}/\text{g}$) in the microbial count from day 7 and counting <10 from day 14, taking into account Brazilian regulatory aspects for preservative ingredient. Therefore, for the combination of better biological activity (preservative) and better acceptance by the consumer (fragrance) B1 was the one that presented the best characteristics, thus being a potential candidate for a new natural active ingredient for cosmetics. Moreover, these results prove that it is possible to replace synthetic controversial ingredients by natural alternatives.

Keywords: essential oil, fragrance, biological activity, natural cosmetic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ÓLEOS ESSENCIAIS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E INDUSTRIAL	30
FIGURA 2. FÓRMULA ESTRUTURAL GERAL DOS PARABENOS.....	34
FIGURA 3. ESQUEMA MOSTRANDO AS ETAPAS DO PROCESSO OXIDATIVO	40
FIGURA 4. FÓRMULA ESTRUTURAL DO BHT	41
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PIRÂMIDE OLFATIVA	44
FIGURA 6. CLASSIFICAÇÃO MACRO DOS TIPOS DE TESTES SENSORIAL	50
FIGURA 7. ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA MIC	55
FIGURA 8. ESQUEMA QUE REPRESENTA A CONDUÇÃO DO <i>CHALLENGE TEST</i>	60
FIGURA 9. EXEMPLO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	67
FIGURA 10A A 10D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO <i>BLEND 1</i> MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	88
FIGURA 11A A 11D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO <i>BLEND 2</i> MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	88
FIGURA 12A A 12D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO <i>BLEND 3</i> MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	PRINCIPAIS ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM RELAÇÃO AOS QUATRO MAIS IMPORTANTES MICROORGANISMOS	31
TABELA 2.	OES COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES.....	32
TABELA 3.	CRITÉRIOS DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA PRECONIZADOS PELA FARMACOPEIA BRASILEIRA	38
TABELA 4.	LÍDERES NA INDÚSTRIA DE FRAGRÂNCIAS E AROMAS.....	43
TABELA 5.	EXEMPLOS DE INGREDIENTES RESTRITOS OU PROIBIDOS POR IFRA.....	47
TABELA 6.	ÓLEOS ESSENCIAS SELECIONADOS A PARTIR DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	52
TABELA 7.	CODIFICAÇÕES UTILIZADAS NAS FASES I E II DOS ESTUDOS SENSORIAIS.....	57
TABELA 8.	TRIAGEM PARA DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE TRABALHO DE CADA OE PARA AA	62
TABELA 9.	RESULTADOS DE AA(%) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CADA OE.....	63
TABELA 10.	EQUAÇÃO DA RETA MÉDIA E IC ₅₀ CALCULADA DE CADA OE PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR MÉTODO DE DDPH	65
TABELA 11.	CONCENTRAÇÃO DOS OES E MP A SEREM TRABALHADAS	68
TABELA 12.	IC ₅₀ DE CADA OE E METILPARABENO PARA <i>S. aureus</i>	72
TABELA 13.	IC ₅₀ DE CADA OE E MTILPARABENO PARA <i>E. coli</i>	73
TABELA 14.	IC ₅₀ DE CADA OE E MEILPARABENO PARA <i>P. aeruginosa</i>	73
TABELA 15.	IC ₅₀ CALCULADA DE CADA OE E METLPARABENO PARA <i>C. albicans</i>	73
TABELA 16.	PERGUNTAS E ESCALAS PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL FASE I.....	75
TABELA 17.	RESUMO DOS DADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E <i>LIKING</i> PARA CADA OE	78
TABELA 18.	CONCENTRAÇÃO (%) DAS MOLÉCULAS COM RESTRIÇÃO POR IFRA NOS OES ESTUDADOS	79
TABELA 19.	LIMITES PARA MOLÉCULAS SUJEITAS À RESTRIÇÃO IFRA	80
TABELA 20.	CONCENTRAÇÕES DE CADA OES NOS <i>BLENDS</i> FINAIS	81
TABELA 21.	CONCENTRAÇÃO DAS MOLÉCULA RESTRITA POR IFRA NO PRODUTO FINAL.....	81
TABELA 22.	FORMULAÇÕES PILOTADAS PARA EMULSÃO NATURAL.....	82

TABELA 23. RESULTADOS DE AA(%) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CADA <i>BLEND</i> E BHT	83
TABELA 24. IC ₅₀ DOS <i>BLENDS</i> PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	84
TABELA 25. IC ₅₀ DE CADA MICROORGANISMO DOS 3 <i>BLENDS</i> DESENVOLVIDOS	87
TABELA 26. PERGUNTAS E ESCALAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO SENSORIAL FASE II	89
TABELA 27. CONTAGEM DE (UFC/G) DE BACTÉRIAS <i>GRAM POSITIVAS</i> NO <i>CHALLENGE TEST</i> PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS <i>BLENDS</i> 1, 2 E 3	93
TABELA 28. CONTAGEM (UFC/G) DE BACTÉRIAS <i>GRAM NEGATIVAS</i> NO <i>CHALLENGE TEST</i> PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS <i>BLENDS</i> 1, 2 E 3	93
TABELA 29. CONTAGEM (UFC/G) DE FUNGOS NO <i>CHALLENGE TEST</i> PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS <i>BLENDS</i> 1, 2 E 3	93

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 2A A 2D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ALECRIM PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	69
GRÁFICO 3A E 3B. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ANIS PARA (A) <i>E. coli</i> E (B) <i>C. albicans</i>	69
GRÁFICO 4A A 4D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE CANELA PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	69
GRÁFICO 5A A 5D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE CRAVO PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	70
GRÁFICO 6A A 6D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE MANJERICÃO PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	70
GRÁFICO 7A A 7D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE MENTA PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	70
GRÁFICO 8A A 8D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ORÉGANO PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	71
GRÁFICO 9A A 9D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE SÁLVA PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	71
GRÁFICO 10A A 10D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE TOMILHO PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	71
GRÁFICO 11A A 11D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO METILPARABENO PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i>	72
GRÁFICO 12. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO SENSORIAL FASE I POR IDADE	75
GRÁFICO 13. ACEITAÇÃO DOS OES PELOS CONSUMIDORES	76
GRÁFICO 14. ACP REPRESENTANDO AS AFINIDADES EXISTENTES ENTRE OES E DESCRITORES E SUA CORRELAÇÃO COM O <i>LIKING</i>	77
GRÁFICO 15. DISTRIBUIÇÃO DE RESPOSTAS DE AGRADABILIDADE DO CREME NATURAL DESENVOLVIDO	83
GRÁFICO 16 E 17. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO (16) OE DE ALECRIM E (17) <i>BLEND 1</i> , MOSTRANDO QUE O COMPORTAMENTO DIFERE (RETA <i>VERSUS</i> EXPONENCIAL).....	84

GRÁFICO 18A A 18D. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO (A) BLEND 1, (B) BLEND 2, (C) BLEND 3 E (D) BHT	85
GRÁFICO 19A A 19L. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA DE MEDIDAS EM TRIPLICATA PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLEND 1 PARA (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>P. aeruginosa</i> E (D) <i>C. albicans</i> , DO BLEND 2 PARA (E) <i>S. aureus</i> , (F) <i>E. coli</i> , (G) <i>P. aeruginosa</i> E (H) <i>C. albicans</i> E DO BLEND 3 PARA (I) <i>S. aureus</i> , (J) <i>E. coli</i> , (K) <i>P. aeruginosa</i> E (L) <i>C. albicans</i>	86
GRÁFICO 21. REPRESENTAÇÃO DA ACEITAÇÃO DOS BLENDS PELOS CONSUMIDORES	90
GRÁFICO 22. ACP REPRESENTANDO AS AFINIDADES EXISTENTES ENTRE BLENDS E DESCRITORES E SUA CORRELAÇÃO COM O LIKING	91
GRÁFICO 23. PREFERÊNCIA GLOBAL PELO CONSUMIDOR DENTRE OS 3 BLENDS DESENVOLVIDOS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Atividade Antioxidante

A. brasiliensis: *Aspergillus brasiliensis*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT: Butil hidroxitolueno

C. albicans: *Candida albicans*

CATA: *Check all that Apply*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

IC₅₀: *Inhibitory Concentration* ou Concentração Inibitória de 50% contagem microbiana ou redução do DPPH

CN: Controle negativo

CP: Controle positivo

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

E. coli: *Escherichia coli*

FDA: *Food and Drug Administration*

IBD: Associação de Certificação Instituto Biodinâmico

MIC: *Minimum Inhibitory Concentration* ou Concentração Inibitória Mínima

MO: Microorganismo

MP: Metilparabeno

NT: Cloreto de neotetrazólio

OE: Óleo essencial

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

PCA: *Principal Component Analysis* ou Análise do Componente Principal

T°C: Temperatura em graus Celsius

TSA: *Tryptic soy agar* ou ágar triptona de soja

TSB: *Tryptic soy broth* ou caldo triptona de soja

TTC: Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazólio

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

USP: *United States Pharmacopea*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS.....	19
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1.	COSMÉTICOS NATURAIS.....	20
3.1.1.	Aspectos Mercadológicos do Setor Cosmético.....	20
3.1.2.	Os Cosméticos Naturais.....	20
3.1.3.	O Mercado e o Consumidor de Cosméticos Naturais.....	22
3.1.4.	Desenvolvimento de Cosméticos Naturais.....	24
3.1.5.	Regulamentações e Certificações.....	25
3.2.	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
3.2.1.	Composição de Óleos Essenciais.....	27
3.2.2.	Propriedades Biológicas dos Óleos Essenciais.....	29
3.3.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
3.3.1.	Contaminação Microbiana.....	33
3.3.2.	Sistemas Antimicrobianos.....	33
3.3.3.	Antimicrobianos Naturais.....	35
3.3.4.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	36
3.4.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.4.1.	O Processo Oxidativo.....	38
3.4.2.	Sistemas Antioxidantes.....	40
3.4.3.	Antioxidantes Naturais.....	42
3.4.4.	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	42
3.5.	FRAGRÂNCIAS.....	42
3.5.1.	Estrutura de uma fragrância.....	44
3.5.2.	Fragrâncias Naturais.....	45
3.5.3.	Segurança de Fragrâncias.....	46
3.6.	ANÁLISE SENSORIAL.....	48
3.6.1.	Testes Afetivos.....	50
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1.	SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS.....	52
4.2.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.3.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	53
4.4.	AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	56
4.5.	DESENVOLVIMENTO DOS BLENDS.....	58
4.6.	DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO NATURAL.....	58
4.7.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONSERVANTE.....	58
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1.	AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAS.....	61
5.2.	AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	66
5.3.	AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	74
5.4.	DESENVOLVIMENTO DOS BLENDS.....	77
5.5.	DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO NATURAL.....	82
5.6.	AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DOS BLENDS.....	83
5.7.	AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS BLENDS.....	85
5.8.	AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS BLENDS.....	89
5.9.	TESTE DESAFIO DO CONSERVANTE.....	92

5.10.	DISCUSSÃO GERAL	93
6.	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SENSORIAL	102
	ANEXO 2 – PARECER CEP	104
	ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.	111

1. INTRODUÇÃO

O setor cosmético no Brasil vem crescendo em média 9,2% nos últimos anos, bem acima da indústria em geral, e representa o terceiro mercado consumidor mundial. No Brasil e no mundo, os cosméticos tradicionais representam a grande fatia do mercado, mas existe uma tendência, assim como em outros segmentos da indústria (principalmente a alimentícia), ao consumo de cosméticos produzidos a partir de componentes naturais, buscando-se a redução ou até mesmo a eliminação de ingredientes de síntese química. Estes produtos são chamados *naturais*, quando contêm pelo menos 95% de matérias-primas naturais, ou *orgânicos*, quando além da composição natural existe também uma preocupação com a produção sustentável das matérias-primas (EUROMONITOR, 2014).

Os dados para o Brasil ainda são escassos, mas estima-se que na Europa este mercado represente 3% do *market share* de cosméticos (SURFACTANTS, 2015) e é esperado que o mercado global de cosméticos orgânicos cresça a uma taxa anual média de 10% até 2021, atingindo 16 bilhões de dólares (TECHSCI RESEARCH, 2016). Este número relaciona-se com a necessidade de produtos *chemical-free*, com a mudança no estilo de vida das pessoas e com a conscientização dos consumidores (TECHSCI RESEARCH, 2016).

Dentro do segmento cosmético, a categoria de maior foco para esta tendência é a de Cuidados com a Pele, seguida de Cuidados com os Cabelos (COSMETICS&TOILETRIES, 2016).

Os parabenos, moléculas amplamente utilizadas para este fim, vêm sendo questionados quanto à sua segurança desde que estudos sugeriram possíveis relações entre parabenos, disfunções endócrinas e câncer de mama (SONI, 2005). Apesar de estudos toxicológicos mais profundos acerca da segurança dos parabenos serem necessários (SONI, 2005), já está estabelecida nos consumidores uma rejeição em relação a estas moléculas. Diversos cosméticos, principalmente aqueles produzidos fora do Brasil, já apresentam o apelo *paraben free* (livre de parabenos) em sua rotulagem e muitos deles também se classificam como naturais ou orgânicos.

O mesmo ocorre com moléculas antioxidantes, como o BHT (butil hidroxitolueno). Segundo diversos autores, esta molécula é responsável por toxicidade pulmonar, promoção de tumores hepáticos, hepatotoxicidade,

nefrotoxicidade e alteração de metabolismo efeitos adversos relacionados a sua biotransformação em intermediário de metide quinonas (FAINE et al., 2006; REED; FUJIWARA; THOMPSON, 2001; YEHYE et al., 2015) .

Paralelo a isto, um dos componentes mais importantes do ponto de vista do consumidor em um creme ou loção é sua fragrância. Para que um cosmético seja bem aceito pelo consumidor, não basta ter sua funcionalidade assegurada (hidratação, *anti-age*, proteção solar...), é preciso também apresentar sensorialidade agradável relacionada a sua textura e especialmente à sua fragrância. Os atributos de perfumação propriamente ditos (impacto, explosão, perfumação ao longo do dia, mascaramento do cheiro da base...) são a principal justificativa para a presença de uma fragrância na formulação. Mas, uma vez que muitos ingredientes utilizados em sua construção são naturais, principalmente óleos essenciais (OEs), e possuem atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, é possível a construção de uma fragrância que também atue como sistema conservante da formulação.

Dentro deste contexto, existe um grande potencial de unir atributos hedônicos (perfumação agradável) e funcionais (propriedade antimicrobiana e antioxidante) no componente "fragrância", buscando assim a redução ou até mesmo a eliminação de conservantes sintéticos. Mas para que estes OEs atuem ao mesmo tempo como fragrância e como conservante, é preciso que estejam harmonicamente combinados em *blends* que, além de favorecer a sinergia destas propriedades, também sejam hedonicamente aceitos pelo consumidor deste tipo de produto (SACCHETTI et al., 2005).

Uma vez que são escassas as publicações neste segmento, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de combinações de OEs (*blends*), buscando unir perfumação e funcionalidade em um único ingrediente: a fragrância.

Para produtos cosméticos em que OEs já fazem parte da composição através da fragrância, o maior entendimento das propriedades biológicas, em especial antimicrobiana e antioxidante, traz a possibilidade de substituição de sistemas conservantes controversos por fragrâncias previamente construídas para cumprirem também este papel.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver *blends* de óleos essenciais com potencial antimicrobiano e antioxidante para atuarem simultaneamente como fragrância e sistema conservante de emulsões cosméticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar uma revisão bibliográfica acerca do tema cosméticos naturais e das propriedades hedônicas (fragrância) e funcionais (antimicrobiana e antioxidante) de OEs.
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos OEs, além de sua aceitação pelo consumidor.
- c) Desenvolver *blends* de OEs em função do potencial antimicrobiano e antioxidante observado, levando em consideração as premissas de IFRA (*International Fragrance Association*).
- d) Desenvolver uma base emulsionada natural contendo os *blends* e avaliar a aceitação do produto final pelo consumidor.
- e) Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos *blends* desenvolvidos, além de sua eficácia conservante na base emulsionada natural.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. COSMÉTICOS NATURAIS

3.1.1. Aspectos Mercadológicos do Setor Cosmético

O setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) no Brasil apresentou um crescimento médio anual de 9,2% nos últimos 19 anos (enquanto o da indústria em geral foi de apenas 1,9%), tendo passado de um faturamento líquido de imposto sobre vendas de R\$4,9 bilhões em 1996 para R\$43,2 bilhões em 2014. Além disso, entre 2004 e 2014, o setor brasileiro de cosméticos teve um crescimento anual médio de 7,5% nas exportações e de 19,5% nas importações. São 2.540 empresas no setor de HPPC no Brasil e 80% delas se localizam nas regiões sul e sudeste, sendo 20 de grande porte e representando 73% do faturamento total (acima dos R\$100 milhões). No cenário mundial, segundo dados do Euromonitor, o Brasil ocupa o terceiro lugar em relação ao mercado de cosméticos (atrás de EUA e China), representando 9,4% do mercado mundial (ABIHPEC, 2015).

Os fatos relacionados ao importante crescimento do setor de HPPC no Brasil são: acesso das classes D e E, consumo de produtos de maior valor agregado pela classe C, crescente participação da mulher no mercado de trabalho, tecnologia de ponta e aumento da produtividade que favoreceram os preços, lançamentos que atendem as necessidades do mercado e aumento da expectativa de vida, “o que traz a necessidade de conservar uma impressão de juventude” (ABIHPEC, 2015).

Apesar da situação econômica no Brasil, a procura por cosméticos ainda é forte. Uma vez que os brasileiros entraram neste mercado de consumo, não estão mais dispostos a sair, mas escolhas precisarão ser feitas para um consumo mais racional (EUROMONITOR, 2014).

3.1.2. Os Cosméticos Naturais

Apesar da crescente tendência de consumo de produtos naturais, o conceito em torno do atributo ainda é controverso. Termos como natural, orgânico, verde, entre outros, ainda não são claros para os consumidores que parecem não diferenciar os apelos “natural” e “orgânico, consequência da falta de unificação da regulamentação (APAOLAZA et al., 2014; YAMAMOTO, 2008).

Produtos verdes tem a mesma funcionalidade que os regulares, mas causam menos dano ao meio ambiente devido a cuidados como: redução de matérias-primas e embalagens, característica de multiuso, emprego de materiais recicláveis, uso de recursos naturais, produtos seguros e saudáveis, menor toxicidade para o meio ambiente, aumento de prazo de validade, etc. Já produtos orgânicos e naturais não podem conter matérias-primas sintéticas (com raras exceções) (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Quando falamos de alimentos, os produtos naturais podem ser preferidos em função de alguns fatores que o tornariam vantajosos: eles são considerados mais saudáveis, mais adaptáveis aos sentidos, mais amigáveis com o meio ambiente ou simplesmente é considerado inerente que um produto natural seja melhor (mais ético ou mais correto) (ROZIN et al., 2004). Já consumidores norte-americanos de cosméticos acreditam que um cosmético é orgânico ou natural quando é seguro e livre de certos ingredientes ditos “negativos”, como parabenos e corantes (SCHAEFER, 2010).

A composição natural é obviamente o ponto de maior atenção neste tipo de produto. No entanto a forma de processamento dos ingredientes naturais também é levada em conta pelo consumidor. ROZIN (2016) avaliou o atributo “natural” de alimentos em estudantes universitários e adultos da Filadélfia (EUA) e constatou que o processamento de determinado ingrediente natural influencia mais no julgamento acerca de sua naturalidade que a própria natureza do ingrediente. Também verificou que tratamentos físicos influenciam menos que tratamentos químicos.

Também foi observado que mesmo depois de saber que espécies químicas e naturais podem ser quimicamente idênticas os consumidores continuam preferindo a versão natural, indicando que as motivações podem ser mais ideacionais que em função de segurança, superioridade sensorial ou por serem mais saudáveis. Isto seria consequência do respeito à natureza estar cada vez mais inserido nos preceitos morais da sociedade e foi observado em estudo que envolvia itens alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ROZIN et al., 2004).

Um ponto importante a ser observado quanto à presença de apelos relacionados a “natural” é o quanto ele pode influenciar na aceitação do produto. APAOLAZA et al. (2014) avaliou se o conhecimento prévio sobre a composição natural (sem matérias-primas sintéticas, somente com OEs) de fragrâncias influenciava na avaliação de 4 atributos em 3 diferentes perfumes,

caracterizando o que é chamado “efeito halo”. Para tanto, foram formados dois grupos com 56 participantes cada: um teve acesso à informação sobre a composição natural e outro não teve (controle). O estudo revelou que a intenção de compra aumenta quando existe exposição prévia ao apelo “natural” dos ingredientes, confirmando a existência do efeito halo e afetando a percepção do produto. No entanto, o efeito foi observado somente com o consumidor comum e não teve efeito sobre aqueles consumidores identificados como pró-ambientalistas. Outro estudo conduzido por LEE et al. (2013) também observou o efeito halo do apelo “orgânico” em alimentos. Duas amostras idênticas de alimentos organicamente produzidos foram apresentadas com diferentes rótulos: “regular” e “orgânico”. Foi observado que os consumidores consideraram o produto rotulado como “orgânico” menos calórico, além de estarem dispostos a pagar mais e avalia-los como nutricionalmente superiores. Assim como no estudo de APAOLAZA et al. (2014), o público considerado pró-ambientalista foi menos afetado ao estimar as calorias dos alimentos.

Levando em conta ações de Marketing, o uso de apelos como “natural” e “orgânico” pode ser uma importante ferramenta para atrair o consumidor (APAOLAZA et al., 2014; LEE et al., 2013).

3.1.3. O Mercado e o Consumidor de Cosméticos Naturais

O interesse por produtos naturais tem crescido nas últimas décadas e um novo mercado consumidor tem surgido. Na Europa, este consumidor tem sido nomeado como *green consumer*, ou consumidor verde, e se caracteriza por buscar produtos formulados com ingredientes naturais (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Os consumidores de produtos de cuidados pessoais estão cada vez mais interessados em ingredientes que lhes são familiares e saudáveis, como OEs. Uma pesquisa realizada nos EUA mostra que 39% dos consumidores deste tipo de produto já ouviu falar em OEs e busca por estes ingredientes na hora da compra. A mesma pesquisa mostra que 45% dos consumidores já ouviram falar e buscam por antioxidantes naturais e que 19% ouviu falar de parabens e busca produtos que não o contenham (MINTEL, 2016).

Apesar do interesse que os consumidores vêm demonstrando por cosméticos naturais, produtos ditos sustentáveis ainda apresentam baixo *market*

share: 3% dos produtos de Cuidados Pessoais vendidos na Europa. Uma das justificativas para este comportamento é que este tipo do produto não é focado no mercado de massa e, por consequência, ainda é normalmente vendido em lojas especializadas (FOCUS ON SURFACTANTS, 2015). Além disso, os consumidores tradicionais de cosméticos ainda dão maior importância para a performance do produto que para sua segurança (SCHAEFER, 2010).

De acordo com o *Global Organic Cosmetics Market Forecast & Opportunities, 2021: TechSci Research Report*, é esperado que o mercado global de cosméticos orgânicos cresça a uma taxa anual média de 10% até 2021, atingindo 16 bilhões de dólares. Segundo o relatório, a necessidade de produtos *chemical-free* está relacionada, entre outros, com a mudança no estilo de vida e conscientização dos consumidores. Além disso, a necessidade constante de inovação juntamente com algumas facilidades de regulamentação por órgãos de certificação públicos e privados em alguns países também tem impulsionado este segmento. O setor mais importante e promissor para o segmento é o de Cuidados com a Pele, seguido de Cuidados com os Cabelos (COSMETICS&TOILETRIES, 2016; TECHSCI RESEARCH, 2016). Um estudo conduzido nos EUA mostrou que os consumidores querem mais informações sobre a eficácia e os *claims* (ou apelos) de produtos orgânicos e naturais para justificar pagar um preço mais elevado (SCHAEFER, 2010).

Apesar de todo o potencial que o mercado de produtos naturais e orgânicos apresenta, alguns fatores ainda limitam seu crescimento. Questões como a curta vida de prateleira dos produtos e o limitado fornecimento de matérias-primas precisam ser melhor trabalhadas, além do maior esclarecimento das políticas regulatórias, ainda consideradas rigorosas. O maior custo dos produtos orgânicos frente aos tradicionais (com ingredientes sintéticos em sua composição) também é um limitante na adoção dos cosméticos orgânicos pelos consumidores, especialmente quando o preço do petróleo está em baixa favorecendo os componentes sintéticos (COSMETICS&TOILETRIES, 2016; FOCUS ON SURFACTANTS, 2015).

Ainda segundo o relatório da TECHSCI RESEARCH (2016), o maior mercado para cosméticos orgânicos é o da América do Norte, seguido de Europa e da região Asia-Pacífico, sendo que países como China e Índia terão um crescimento significativo alavancados pelas preocupações com envelhecimento e proteção UV, entre outros. A América Latina (Brasil e Argentina) figura apenas

como um mercado promissor em função do aumento da renda e do lançamento contínuo de novos produtos.

Atualmente, as principais marcas operando no segmento de cosméticos orgânicos, embora nem sempre o apelo “orgânico” esteja presente, são: The Body Shop, Burt’s Bee, Estee Lauder, The Hain Celestial Group, Yves Rocher, Amway, Aveda Corp., Arbonne International, Kiehl’s, Natura Cosméticos S.A. e L’Occitane en Provence (TECHSCI RESEARCH, 2016). No entanto, em uma busca rápida na internet, podemos encontrar uma variedade de pequenas empresas utilizando o apelo “orgânico” ou “natural” em seus produtos.

Um estudo conduzido pelo órgão *Organic Monitor*, analisou a composição de mais de 50 marcas internacionais de cosméticos ditos naturais em termos de sua “naturalidade”. As marcas Intelligent Nutrients, Green People e Living Nature receberam os maiores escores, mas marcas importantes de grandes multinacionais Garnier Bio Active (L’Oréal), Diadermine Bio Expertise (Henkel) e Johnson’s Natural (Johnson & Johnson) também obtiveram escores elevados. No entanto, o estudo mostrou que muitos produtos que se diziam “livre de químicos”, por exemplo, possuíam ingredientes sintéticos em sua composição, sendo na verdade semi-naturais ou inspirados em naturais. Também foram encontrados produtos certificados como orgânicos com ingredientes sintéticos em sua composição (SCHAEFER, 2011).

O setor cosmético no Brasil já vem trazendo ingredientes locais e recursos naturais para os produtos de exportação, mas os consumidores locais também estão procurando cosméticos feitos a base destes ingredientes, desde que estes produtos tenham iguais ou melhores benefícios em comparação com os produtos à base de ingredientes sintéticos. Esta tendência pode ser considerada um benefício para o mercado, mas ainda não é o principal fator de decisão sobre os produtos (EUROMONITOR, 2014).

3.1.4. Desenvolvimento de Cosméticos Naturais

Um dos maiores desafios durante o desenvolvimento de cosméticos naturais é garantir a qualidade e assegurar a estabilidade físico-química e microbiológica da formulação. No entanto, é possível garantir a conservação sem adição de conservantes, antioxidantes e agentes quelantes (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Matérias primas naturais possuem as mais diversas moléculas com propriedades biológicas que podem cumprir diferentes funções em cosméticos, desde tratar a pele até conservar o produto (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Segundo FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI (2015), a Associação de Certificação Instituto Biodinâmico (IBD) e a Cosmos descrevem matérias-primas e processos permitidos para produtos orgânicos e naturais. Dentre os processos permitidos estão aqueles que utilizem frio, pressão, água ou destilação a vapor, percolação ou concentração por mecanismos físicos ou mecânicos, solventes de origem vegetal como álcool e glicerina (desde que obtidos de forma orgânica), fermentações e processos que causam mudanças no componente como hidrólise, esterificação, saponificação entre outros, etc. Dentre as matérias-primas permitidas estão manteigas, óleos, corantes, óleos essenciais, extratos de plantas e alguns polímeros. Os processos como etoxilação, sulfonação e polimerização não são permitidos, bem como o uso das seguintes matérias primas: corantes, conservantes e fragrâncias sintéticas, polietilenglicóis, silicones, amônio quaternário e derivados de petróleo.

3.1.5. Regulamentações e Certificações

O órgão regulamentador para medicamentos, alimentos e cosméticos no Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), e maior referência mundial para estes temas, não apresenta uma legislação específica para Cosméticos Orgânicos. Em sua página na internet o órgão apenas apresenta uma série de perguntas e respostas que visam esclarecer consumidores e fabricantes. Segundo o FDA, cosméticos são regulamentados por duas leis (*Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* e *Fair Packaging and Labeling Act*) e em nenhuma delas o termo “orgânico” é descrito. No entanto, outro órgão americano é responsável pela regulamentação do termo, o *Agricultural Marketing Service of the U.S. Department of Agriculture* (USDA), através do *National Organic Program* (NOP). A regulamentação do produto pelo USDA como orgânico não o isenta das regulamentações tradicionais para cosméticos do FDA sobre rotulagem e segurança (FDA, 2010).

O USDA é responsável pelo desenvolvimento de padrões nacionais para produtos agrícolas “organicamente produzidos” e seu principal foco são os

alimentos. Dentre outras atividades desenvolvidas pelo órgão estão: manutenção de listas (operações orgânicas, substâncias proibidas...), desenvolvimento de certificações e *guidelines*, acreditação de agências certificadores, controle de políticas de importação e exportação e treinamentos, Em 2008, O USDA publicou um documento intitulado *Cosmetics, Body Care Products, and Personal Care Products*, em que ressalta que um cosmético pode ser considerado “orgânico” quando atender à regulamentação 7 CFR *Part* 205. Um produto é elegível para certificação quando contém ou é produzido a partir de ingredientes agrícolas e atende aos padrões de produção, manejo, processamento e rotulagem da USDA/NOP (NOP, 2016; USDA, 2008).

Uma vez certificados, os cosméticos orgânicos são elegíveis para 4 categorias de rotulagem resumidas a seguir: 100% Orgânico, deve conter somente ingredientes de produção orgânica (exceto água e sal); Orgânico, deve conter pelo menos 95% dos ingredientes devem ser de produção orgânica (exceto água e sal) e os 5% não orgânicos devem ser ingredientes não disponíveis na forma orgânica; Feito com ingredientes orgânicos, deve conter pelo menos 70% dos ingredientes devem ser de produção orgânica (exceto água e sal) e a rotulagem pode listar até 3 destes ingredientes; Menos de 70% dos ingredientes orgânicos: o produto não pode usar o termo “orgânico” no *display* principal da rotulagem, apenas identificar na declaração de ingredientes o ingrediente específico certificado como organicamente produzido. Nos dois últimos casos citados acima, o produto não pode exibir o selo de certificação da USDA. O documento ainda diz que cosméticos podem exibir outros tipos de selos de padronização privados, mas que nestes casos a USDA não é responsável (USDA, 2008).

As principais certificadoras de produtos naturais e orgânicos na Europa são: BDIH (Alemanha), BIOFORUM (Bélgica), COSMEBIO e ECOCERT (França), ICEA (Itália) e SOIL ASSOCIATION (Inglaterra). Recentemente estes órgãos se associaram para a publicação do COSMOS-Standard, uma regulamentação única para os padrões de certificação de ingredientes e cosméticos naturais e orgânicos baseada também em consultas públicas. No geral, para ser considerado orgânico o produto deve conter pelo menos 95% de ingredientes orgânicos e para ser considerado somente natural não há necessidade de um nível mínimo de ingredientes orgânicos (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015)

Diferente de Estados Unidos e Europa, no Brasil não existe regulamentação oficial para cosméticos naturais e orgânicos uma vez que a Anvisa não se posiciona ou reconhece este tipo de produto (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015). O mesmo não ocorre para alimentos orgânicos, que são respaldados pela Lei 10.831/03. A opção para o mercado nacional de cosméticos é a certificação privada por empresas como IBD (Instituto Biodinâmico de Certificações) e Ecocert. A IBD é uma empresa brasileira e a maior certificadora de produtos orgânicos na América Latina e a Ecocert é registrada no Ministério da Indústria e Comércio da França e reconhecida por mais de 80 países, principalmente na Europa e Estados Unidos (BIGHETTI, 2014; HIGUCHI, 2012).

Para ser certificado pela Ecocert como natural um produto precisa ter no mínimo 95% dos ingredientes naturais ou de origem vegetal sobre o total de ingredientes. Já para ser certificado como orgânico precisa conter no mínimo 95% dos ingredientes vegetais certificados como orgânicos sobre o total de ingredientes vegetais. O IBD define cosmético orgânico como aquele contendo pelo menos 95% de ingredientes orgânicos. Cosmético produzido com ingredientes ou matérias-primas orgânicas são aqueles com pelo menos 70% de ingredientes orgânicos e o cosmético natural apresenta entre 5% a 70% de ingredientes naturais. Sempre são excetuados água e sal destes cálculos (BIGHETTI, 2014).

3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

3.2.1. Composição de Óleos Essenciais

Existem pelo menos 2000 plantas capazes de produzir em torno de 3000 óleos essenciais (OEs), sendo que aproximadamente 300 deles tem importância comercial (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

OEs são misturas complexas de várias dezenas a várias centenas de compostos voláteis de baixo peso molecular e constituem-se metabólitos secundários das mais diversas classes químicas de plantas aromáticas geralmente de regiões temperadas a tropicais (FERNANDEZ et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Principalmente em função de suas características antimicrobiana e antifúngica, os OEs são utilizados desde a antiguidade na preservação de alimentos, no embalsamento e como antibióticos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, entre outros. Além disso sempre tiveram a função de perfumar ambientes, objetos e pessoas (BARILLÉ; LAROZE, 1995). Nas plantas os OEs são responsáveis pela proteção em função de suas características antissépticas e também podem atrair insetos que atuam na polinização e no transporte de sementes ou afastar outros que possam ser danosos (BAKKALI et al., 2008).

Em relação às suas características físico-químicas, os OEs são líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, solúveis em lipídios e solventes orgânicos e com densidade geralmente inferior à da água. Praticamente todas as partes da planta podem produzir OEs e são armazenados em células secretórias, cavidades, canais, células epidérmicas e tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs são normalmente obtidos por destilação com vapor (hidrodestilação) ou solventes orgânicos (extração), podendo ser empregada baixa ou alta pressão no processo, dióxido de carbono líquido ou microondas. A hidrodestilação e a expressão (processo mecânico para obtenção de óleo essencial da casca de cítricos) são normalmente utilizadas para OEs com fins alimentícios e farmacêuticos. Para uso em perfumaria são preferidos os métodos de extração com solventes lipofílicos ou CO₂ supercrítico (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

O método de extração utilizado influencia diretamente no perfil químico do OE obtido, uma vez que diferentes moléculas e proporções de moléculas são coletadas. Além disso os OEs podem variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com variedade genética, nutrição, fertilizantes, localização geográfica da plantação, clima, variações sazonais, estresse durante crescimento e maturação, períodos de seca, armazenagem e parte da planta da qual é obtido. Portanto, padronizar estes fatores é fundamental para manter a composição constante do OE e esta composição pode ser atestada por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Atualmente são conhecidos mais de 3.000 OEs, sendo que em torno de 300 deles são comercialmente importantes para a indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, sanitária e agrônômica. Seus principais empregos são

como componentes de fragrâncias, conservantes de alimentos e medicamentos naturais. Também podem ser empregados em aromaterapia e procedimentos estéticos, como massagens (BAKKALI et al., 2008).

OEs são considerados misturas complexas de 20 a 60 moléculas em diferentes proporções, sendo que duas ou três delas normalmente aparecem em maior concentração (20 a 70%) permitindo sua caracterização e, normalmente, determinando suas atividades biológicas. Terpenos e compostos aromáticos são os principais grupos de moléculas presentes em OEs e são caracterizadas por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são combinações de bases de 5 carbonos chamadas isoprenos. Sua síntese consiste em adições repetidas de isopentenil difosfato (IDP) em um IDP precursor, formando um precursor prenidilfosfato que sofre modificações para formar o esqueleto dos terpenos. Modificações enzimáticas secundárias neste esqueleto são responsáveis por atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos que podem ter de 10 (monoterpenos) a 40 (tetraterpenos) carbonos. Os monoterpenos constituem 90% dos óleos essenciais e contemplam uma grande variedade de estruturas e funções (carbures, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos e fenóis). Podem estar presentes as diferentes formas enantiômeras em diferentes plantas ou, o mais comum, a mistura racêmica. Já os compostos aromáticos são derivados do fenilpropano e ocorrem com menor frequência que os terpenos. Compreendem aldeídos, álcoois, fenóis derivados metoxilados e dióxidos de metileno. As principais fontes destes compostos são anis, cravo, canela, funcho, entre outros (BAKKALI et al., 2008).

3.2.2. Propriedades Biológicas dos Óleos Essenciais

Apesar de os OEs serem mais conhecidos pela sua aplicação em fragrâncias, cada vez mais vem se adquirindo mais conhecimentos sobre suas ações biológicas para aplicações em produtos, saúde, agricultura e meio-ambiente, especialmente no que diz respeito a substituição de aditivos sintéticos controversos (BAKKALI et al., 2008). Os segmentos de alimentos, cosméticos e farmacêuticos tem aumentado o número de produtos derivados de óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Segundo RAUT; KARUPPAYIL (2014), algumas famílias de plantas, como Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae e Rutaceae,

são bem conhecidas pelas sua capacidade de produzir OEs com valor médico e industrial.

OEs podem atuar como agentes antimicrobianos, antifúngicos, anticancerígenos, antivirais, antimutagênicos, antioxidantes, antidiabéticos, anti-inflamatório e antiprotzoários. A FIGURA 1, mostra alguns importantes OEs, suas respectivas famílias e atividades biológicas já relatadas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

FIGURA 1. ÓLEOS ESSENCIAIS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E INDUSTRIAL

Sr. no.	Plant family	Essential oil	Medicinal properties
1	Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Carum nigrum</i> (Black caraway); <i>Anethum graveolens</i> (Dill); <i>Apium graveolens</i> (Celery); <i>Foeniculum vulgare</i> (Fennel); <i>Pimpinella anisum</i> (Anise); <i>Cuminum cyminum</i> (Cumin); <i>Coriandrum sativum</i> (Coriander)	Antibacterial; Antifungal; Anticancer; Antiviral; Anti-diabetic
2	Asteraceae (Compositae)	<i>Artemisia judaica</i> ; <i>A. annua</i> ; <i>A. absinthium</i> (Wormwood); <i>A. dracunculoides</i> (Tarragon)	Antifungal; Anticancer; Antiviral
3	Geraniaceae	<i>Pelargonium graveolens</i> (Rose Geranium);	Antibacterial
4	Lamiaceae/Labiatae	<i>Origanum vulgare</i> (Origano); <i>Melissa officinalis</i> (Lemon balm); <i>Salvia officinalis</i> (Sage); <i>Mentha sp.</i> ; <i>Mentha longifolia</i> (Wild Mint); <i>M. piperita</i> (Peppermint); <i>M. spicata</i> (Spearmint); <i>Ocimum basilicum</i> (Sweet Basil); <i>O. sanctum</i> ; <i>Rosmarinus officinalis</i> (Rosemary); <i>Lavandula officinalis</i> (Lavender); <i>Lavandula sp.</i> ; <i>Salvia sclarea</i> (Sage Clary)	Antibacterial; Antifungal; Anticancer; Antiviral; Antidiabetic; Antimutagenic, Antiprotzoal; Anti-inflammatory; Antioxidant
5	Lauraceae	<i>Cinnamomum sp.</i> (Cinnamon)	Antimicrobial; Anti-inflammatory; Antimutagenic
6	Liliaceae	<i>Allium sativum</i> (Garlic); <i>Allium cepa</i> (onion)	Antifungal; Antiviral; Antiprotzoal
7	Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i> (Clove); <i>Thymus vulgaris</i> (Thyme); <i>Thymus sp.</i> ; <i>Melaleuca alternifolia</i> (Tea tree); <i>Eucalyptus globulus</i> (Blue gum); <i>Myristica fragrans</i> (Nutmeg)	Antibacterial; Antifungal; Anticancer; Antiviral; Antimutagenic Anti-inflammatory Antiprotzoal
8	Oleaceae	<i>Jasminum sp.</i> ; <i>Olea europaea</i> (Olive)	Antibacterial, Anticancer
9	Piperaceae	<i>Piper nigrum</i> (Black pepper)	Antibacterial; Antifungal; Anticancer; Antiprotzoal
10	Pinaceae	<i>Cedrus libani</i> (Cedar wood oil)	Antifungal
11	Poaceae	<i>Cymbopogon martini</i> (Palmarosa); <i>Cymbopogon citrates</i> (Lemon grass); <i>Cymbopogon nardus</i> (Citronella grass);	Antifungal; Anticancer
12	Rutaceae	<i>Citrus sp.</i> (Lemon); <i>C. paradisi</i> (Grape fruit)	Antibacterial; Antifungal; Anticancer
13	Rosaceae	<i>Rosa sp.</i> ;	Antifungal
14	Santalaceae	<i>Santalum sp.</i> ; <i>Santalum album</i> (Sandalwood)	Antiviral
15	Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i> (Ginger); <i>Zingiber montanum</i> ; <i>Curcuma longa</i> (Turmeric); <i>Elettaria cardamomum</i> (Cardamom)	Antifungal; Anticancer; Antioxidant; Antimutagenic

FONTE: RAUT; KARUPPAYIL (2014).

A atividade antimicrobiana dos OEs se deve a citotoxicidade de compostos fenólicos, aldeídicos e álcoois e está relacionada a danos e desestabilização na membrana e parede celular (permeabilização por perda de íons, redução do potencial de membrana, colapso da bomba de próton, depleção do *pool* de ATP, vazamento de macromoléculas e lise celular), coagulação do citoplasma e dano a proteínas e lipídeos. Já a atividade antifúngica está relacionada à inibição do ergosterol na membrana, inibição da sinalização das vias envolvidas na morfogênese levedura-hifa, bloqueio da fase S do ciclo celular, perda de íons e desestabilização de membrana com perda do conteúdo citoplasmático (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A eficiência antimicrobiana dos OEs é geralmente medida pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Mínima Letal (CML),

sendo que MIC₅₀ e CML₅₀ são valores usados para comparação da bioatividade. Em geral, OEs de tomilho, orégano, canela, capim-limão, louro, murta-limão e cravo estão entre os mais efetivos (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A TABELA 1, construída a partir de RAUT; KARUPPAYIL (2014), mostra resumidamente a CIM dos principais OEs com atividade antibacteriana e antifúngica em relação aos quatro mais importantes microorganismos a partir de diversos autores.

TABELA 1. PRINCIPAIS ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM RELAÇÃO AOS QUATRO MAIS IMPORTANTES MICROORGANISMOS

MO	Tomilho	Orégano	Alecrim	Canela	Eucalipto	Manjeriçã	Capim-limão	Louro	Cravo	Menta	Coentro	Funcho	Gengibre
<i>S. aureus</i>	<0,05%	-	<0,05%	-	1%	1%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	-	-	-
<i>E. coli</i>	0,05%	0,05%	-	-	-	-	0,06%	0,02%	0,04%	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	<1,0%	<1,0%	-	<1, %0	-	-	<1,0%	<1,0%	<1,0%	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	0,15%	-	-	0,15%	-	0,15%	-	0,25%	1,0%	0,15%

FONTE: adaptada de RAUT; KARUPPAYIL (2014).

A atividade antioxidante dos OEs está relacionada principalmente à presença de flavonóides, terpenóides e fenólicos que atuam no balanceamento dos radicais livres. Dentro os OEs com importante atividade antioxidante estão cravo, canela, noz-moscada, manjeriçã, orégano e tomilho (BAKKALI et al., 2008; PRAKASH et al., 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Os OEs listados na TABELA 2 também possuem atividade antioxidante e/ou antimicrobiana relatada em literatura.

TABELA 2. OES COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES

Nome Popular	Espécie	Autor (es)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	(SACCHETTI et al., 2005) (BAKKALI et al., 2008) (GACHKAR et al., 2007) (LV et al., 2011)
Anis Estrelado	<i>Illicium verum</i>	(WANG et al., 2011b)
Artemísia	<i>Artemisia biennis</i> <i>Artemisia annua</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Artemisia vulgaris</i>	(LOPES-LUTZ et al., 2008) (JUTEAU et al., 2002) (LV et al., 2011)
Bergamota	<i>Citrus bergamia</i>	(CALO et al., 2015) (LV et al., 2011)
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>	(CALO et al., 2015)
Capim Limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	(SACCHETTI et al., 2005)
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	(CALO et al., 2015)
Cominho	<i>Cuminum cyminum</i>	(AKRAMI et al., 2015) (CHEN et al., 2014) (GACHKAR et al., 2007) (HAJLAOUI et al., 2010)
Coriandro	<i>Coriandrum sativum</i>	(CALO et al., 2015)
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	(CALO et al., 2015)
Erva-doce	<i>Pimpinella anisum</i>	(AL-BAYATI, 2008) (GÜLÇİN et al., 2003)
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	(SACCHETTI et al., 2005)
Lavanda	<i>Lavandula officinalis</i>	(MARTUCCI et al., 2015)
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>	(LV et al., 2011)
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	(HUSSAIN et al., 2008) (POLITEO; JUKIC; MILOS, 2007) (LEE et al., 2005)
Menta	<i>Mentha spicata</i>	(LV et al., 2011)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	(MARTUCCI et al., 2015) (LV et al., 2011)
Pimenta preta	<i>Piper nigrum</i>	(CALO et al., 2015)
Sálvia	<i>Salvia sclarea</i>	(LV et al., 2011)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	(SACCHETTI et al., 2005) (BAKKALI et al., 2008) (ROTA et al., 2008) (LEE et al., 2005)
Ylang Ylang	<i>Cananga odorata</i>	(SACCHETTI et al., 2005) (PRAKASH et al., 2012)

Além das propriedades isoladas dos OEs, existem evidências que a combinação destes favorece sinergicamente as ações biológicas (BAKKALI et al., 2008; CALO et al., 2015; LV et al., 2011).

3.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.3.1. Contaminação Microbiana

Fungos, bactérias e bolores são responsáveis pela contaminação microbiológica de produtos cosméticos, sendo tolerados em pequenas quantidades, mas caracterizando uma contaminação quando em altas concentrações (CORRÊA, 2012). Esta contaminação ocorre mesmo em condições normais de fabricação de uso devido à diversas fontes: matérias-primas, embalagem, processo fabril (pessoas, equipamentos e ambiente contaminado). A exposição dos produtos a altas temperaturas durante o transporte, nos pontos de venda e na casa do consumidor podem aumentar a taxa de crescimento microbiano no caso de um produto previamente contaminado. Além disso, uma vez que o cosmético é aberto esta altamente susceptível a novas contaminações durante o uso. Microorganismos podem facilmente se multiplicar e causar odor e cor desagradáveis ao produto, além de degradar princípios ativos (KERDUDO et al., 2016).

Desta forma, é esperado que cosméticos e produtos de higiene pessoal resistam à contaminações microbiológicas durante o período de uso e os conservantes são necessários para cumprir esta função (KERDUDO et al., 2016)

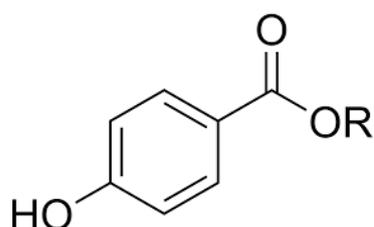
3.3.2. Sistemas Antimicrobianos

Conservantes são definidos como substâncias que são adicionadas como ingrediente aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade de inibir o crescimento de microorganismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso (BRASIL, 2012).

Os parabenos (ésteres de ácido p-hidroxibenzóico) são largamente utilizados em cosméticos e por muito tempo (seu primeiro uso foi nos anos 1920) foram considerados conservantes seguros. Podem ser utilizados isoladamente (até 0,4%) ou em combinações (até 0,8%) (BRASIL, 2012; SONI, 2005), sendo o metilparabeno e o propilparabeno os mais utilizados em função de sua maior solubilidade (menor cadeia carbônica) na fase aquosa dos produtos, onde a atividade microbiana se desenvolve (SONI, 2005; ANDERSEN, 2008).

A FIGURA 2 apresenta a fórmula estrutural geral dos parabenos. O radical "R" pode ser substituído pelos grupos metil (CH₃), etil (C₂H₅), propil (C₃H₇) e butil (C₄H₉) (SONI, 2005). São sintetizados através da esterificação do ácido hidroxibenzoico com o álcool correspondente e ocorrem naturalmente em algumas frutas e vinhos e também na baunilha.

FIGURA 2. FÓRMULA ESTRUTURAL GERAL DOS PARABENOS



As principais razões para seu uso disseminado em cosméticos incluem: possuem largo espectro antimicrobiano, possuem estabilidade em uma ampla faixa de pH e altas temperaturas, não possuem odor, não coloram a formulação, são biodegradáveis, são de baixo custo e possuem suficiente solubilidade em água para produzir atividade antimicrobiana (SONI, 2005).

Sua propriedade conservante se dá pela atividade antimicrobiana ao afetar o transporte de membranas e a atividade mitocondrial de bactérias e fungos. A atividade é mais importante em fungos que em bactérias e em Gram-positivas que em Gram-negativas (SONI, 2005).

Diversos estudos publicados abordam os possíveis efeitos adversos relacionados aos parabenos. Para o uso em cosméticos, em que a via de contato é a pele, são de maior interesse aqueles que tratam de sua absorção cutânea. Os parabenos penetram no estrato córneo quando aplicados sobre a pele e são hidrolisados por carboxilesterases, mas não se há evidências de acúmulo no organismo (ANDERSEN, 2008; SONI, 2005).

SONI (2005) em sua revisão acerca da possível toxicidade dos parabenos mostra que parabenos praticamente não irritam e não sensibilizam indivíduos com pele normal, embora sejam contraindicados para indivíduos com pele não intacta. ANDERSEN (2008) também reuniu diversos estudos em uma revisão e concluiu que a possibilidade de existência de efeitos adversos em parabenos é conservadora e superestimada.

Apesar do considerável número de trabalhos indicando sua segurança, estudos recentes relacionaram parabenos com modulação e disfunção do sistema endócrino. Estes estudos relatam uma fraca atividade estrogênica e efeitos adversos reprodutivos dos parabenos (OISHI, 2002; SONI, 2005). Além disso, o fato de parabenos terem sido encontrados em tecido mamário sugeriram uma possível relação com câncer de mama atrelada ao uso de cosméticos com aplicação axilar (DARBRE et al., 2004; SONI, 2005). Neste último caso, SONI (2005) acrescenta que a relação precisa ser analisada com cuidado, uma vez que encontrar uma substância largamente utilizada no tecido mamário poder não ter relação direta com câncer de mama (como ocorre com outras moléculas), além de haver limitações no desenho do estudo e não haver estudos que comprovem diretamente esta relação.

Apesar de estudos toxicológicos mais profundos acerca da segurança dos parabenos serem necessários (SONI, 2005), já está estabelecida nos consumidores uma rejeição em relação aos parabenos e muitos produtos já apresentam o apelo “*paraben free*” ou “livre de parabenos” em sua rotulagem.

Órgãos regulamentares não proíbem o uso de parabenos, mas o limitam em algumas situações. Em 2014 a Comissão Europeia, seguindo a avaliação do *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), limitou o uso de butilparabeno e propilparabeno à 0,14% (individualmente ou em conjunto) em cremes infantis para a área das fraldas (EUROPIAN COMMISSION, 2014).

O fenoxietanol também é usado em cosméticos como conservante e, apesar de sua aplicação tópica raramente causar irritação dérmica, algumas publicações o associam com dermatites. Alguns estudos relataram irritação ocular severa e efeito hemolítico em experimentos com animais, mas não há evidências de efeitos mutagênicos, teratogênicos e reprodutivos. Sendo assim, fenoxietanol é considerado seguro para uso tópico (PARK et al., 2014). No Brasil, a concentração máxima de fenoxietanol em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes é de 1,0% (BRASIL, 2012).

3.3.3. Antimicrobianos Naturais

Seja em função de comprovações científicas acerca dos riscos inerentes ao uso de compostos sintéticos ou simplesmente pela tendência “verde” de o consumidor buscar produtos feitos com ingredientes naturais, um número cada

vez maior de formulações livre de conservantes estão surgindo. Algumas matérias-primas de origem vegetal tem sido utilizadas como conservantes naturais em alimentos e cosméticos e se, cumpridas as exigências quanto à sua produção e processamento, podem ser utilizadas em formulações naturais. No entanto, existe uma preocupação quanto a efetividade e estabilidade destes sistemas conservantes alternativos (ROZIN et al., 2004).

Alguns fornecedores têm publicado o desenvolvimento de sistemas conservantes alternativos aos de origem sintética tradicionalmente utilizados. A empresa *World Natural Care* oferece o CNP, um sistema conservante 100% natural obtido através de extrato de planta (não há detalhamento sobre as espécies utilizadas), toxicologicamente testado, solúvel em água (mas podendo ser adaptado à fase oleosa e anfifílica) e que pode substituir conservantes sintéticos como parabenos e fenoxietanol. Segundo o fabricante, o conservante é compatível com ingredientes orgânicos/naturais e permite que o produto final seja certificado como orgânico. O CNP elimina bactérias Gram positivas e Gram negativas, mofo e leveduras (SURFACTANTS, 2015). A *World Natural Care* é uma empresa belga com sede Bruxelas que busca oferecer soluções “verdes” para a indústria cosmética e farmacêutica.

3.3.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os testes mais utilizados para a determinação de sensibilidade e resistência a microorganismos são (a) os testes de diluição em caldo e (b) os métodos de difusão em ágar. Estes métodos são utilizados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de potenciais agentes antimicrobianos, conservantes ou desinfetantes (JORGENSEN; FERRARO, 2009; OSTROSKY et al., 2008; VEIGA, 2016).

O método de diluição em caldo consiste em um meio de crescimento líquido inoculado com o microrganismo teste onde são testadas diferentes concentrações de um antimicrobiano. O teste pode ser realizado em tubos de ensaio (macrodiluição) ou em placas com 96 poços (microdiluição). A avaliação se dá pela medida visual ou de absorvância da turbidez do meio, sendo que a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano é considerada sua MIC. A microdiluição é a técnica mais prática e utilizada, sendo a geração de um resultado quantitativo e reprodutível é a principal vantagem do método, bem como a praticidade gerada pelo uso de placas comerciais, economia de

espaço e reagentes e a possibilidade de leitura automatizada (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Já o método de difusão em ágar é uma maneira rápida, prática e bem padronizada, em que o microrganismo é inoculado na superfície de uma placa contendo meio de cultura apropriado ao seu crescimento. Nesta superfície são depositadas preparações contendo a substância potencialmente ativa contra o microrganismo (usualmente na forma de pequenos discos). As placas são incubadas por 16 a 24 horas a 35°C e a atividade antimicrobiana é determinada em função do halo formado (em milímetros) em torno do disco (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Apesar de a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de um antimicrobiano já ser um bom indicativo de atividade antimicrobiana de um sistema conservante, a eficácia do sistema só pode ser garantida através do Teste Desafio do Conservante, ou *Challenge Test*, que consiste na inoculação do produto com microorganismos conhecidos e monitoramento da carga sobrevivente (BRASIL, 2010; CONSERVANTES, 2015).

O Teste Desafio do Sistema Conservante ou *Challenge Test* consiste na contaminação proposital do produto com microorganismos específicos e avaliação da amostra em intervalos de tempo definidos, o qual deve ser efetuado no mínimo em duas fases do desenvolvimento: a primeira, após a definição da fórmula do produto; e a segunda, após o término do teste de estabilidade e ou compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

Para a determinação da eficácia do conservante, há diversos métodos descritos em compêndios oficiais e guias de orientação para análise microbiológica de cosméticos os quais se destaca a Farmacopeia Brasileira, *United States Pharmacopeia* (USP), Guia ABC de Microbiologia e o *Cosmetics, Toiletries, and Fragrance Association* (CTFA) *Microbiology Guideline*.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), os cremes corporais são classificadas como produtos pertencente à Categoria 2 quanto aos critérios de eficácia antimicrobiana frente ao *Challenge Test* (produto de uso tópico constituído de base ou veículo aquoso) os quais estão descritos na TABELA 3 (BRASIL, 2010).

TABELA 3. CRITÉRIOS DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA PRECONIZADOS PELA FARMACOPEIA BRASILEIRA

Tipo de produto	Microrganismo	14º dia	28º dia
Categoria 2: Produto de uso tópico constituído de base ou veículo aquoso, produtos nasais não estéreis e emulsões, incluindo aqueles aplicados em membranas mucosas	Bactérias	Deve haver redução de 2 logs do nº de UFC's inicialmente inoculados	Não deve haver aumento da contagem em relação ao 14º dia
	Bolores e leveduras	Não deve haver aumento do nº de UFC's inicialmente inoculado	Não deve haver aumento do nº de UFC's inicialmente inoculado

FONTE: adaptado de (BRASIL, 2010).

LEGENDA: UFC – Unidades Formadoras de Colônia.

3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.4.1. O Processo Oxidativo

Radicais livres de oxigênio, mais amplamente chamados de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species – ROS*), são espécies químicas intermediárias e altamente reativas formadas pela presença de oxigênio, devido ao metabolismo celular aeróbico ou por fontes externas (cigarro, poluição, luz ultravioleta e radiação ionizante), e que possuem alto potencial de dano aos componentes intracelulares lipídicos, nucléicos e protéicos (MANTLE et al., 1998; YEHYE et al., 2015). As ROS se formam quando elétrons são transferidos de um átomo a outro, sendo que a molécula que perde o elétron é oxidada. Embora os radicais livres atuem benéficamente em processos biológicos, algumas destas moléculas podem causar oxidação de biomoléculas o que pode levar à injúrias e morte celular (WANG et al., 2008; YEHYE et al., 2015).

Produtos industrializados contendo óleos, gorduras, plásticos, borrachas e medicamentos também são altamente afetados por ROS em aquecimentos e longos períodos de estocagem. Processos de oxidação podem comprometer o valor nutricional (no caso de alimentos) ou funcional (no caso de cosméticos) de produtos, além de alterar suas características sensoriais. Por esta razão é essencial o uso de mecanismos que previnam e retardem o processo oxidativo (YEHYE et al., 2015).

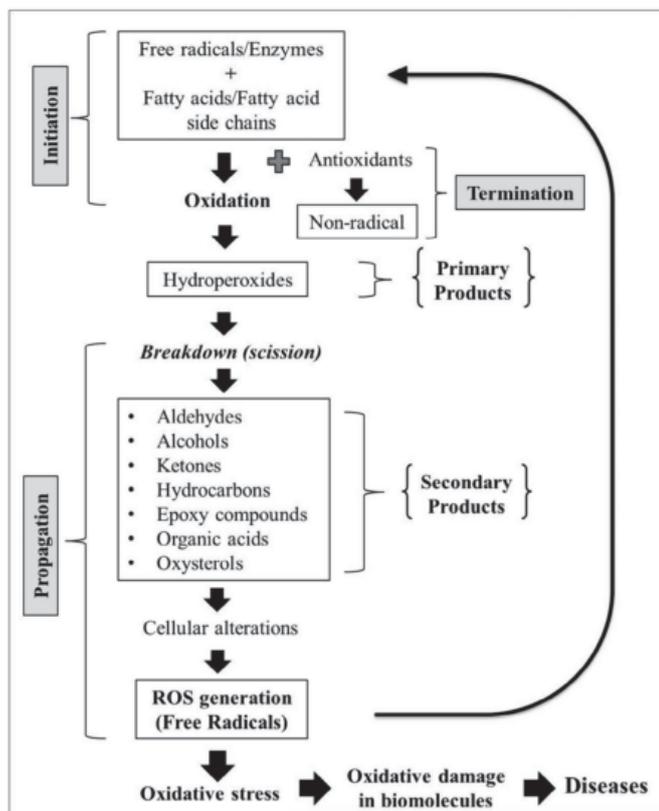
Existem diferentes tipos de ROS: hidroxil ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), peróxido ($\text{ROO}\bullet$), alcóxido ($\text{RO}\bullet$) e óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), sendo que os de maior relevância fisiológica são o hidroxil e o superóxido (MANTLE et al., 1998; YEHYE et al., 2015).

Em alimentos, a oxidação lipídica leva ao desenvolvimento de rancificação tornando o produto rejeitado devido a menor palatabilidade, redução da qualidade aparente (mudanças de cor, textura e odor), perda de valor nutricional e até mesmo formação de compostos tóxicos (EMBUSCADO, 2015). O mesmo ocorre em formulações cosméticas a base de lipídeos e óleos, que são suscetíveis a degradação por peroxidação lipídica resultando em um problema de estabilidade e comprometendo sua funcionalidade, prazo de validade características sensoriais e segurança. Sistemas emulsionados podem sofrer oxidação pela característica de seus ingredientes, método de formulação e condições de armazenamento (KHANUM; THEVANAYAGAM, 2016).

A peroxidação lipídica de lipídios emulsionados é um processo auto-oxidativo que ocorre em três etapas (iniciação, propagação e terminação, conforme mostra a FIGURA 3) e por diferentes mecanismos, como quando um ácido graxo ou um radical graxo de qualquer molécula é atacado por um radical livre que possui alta reatividade e é capaz de subtrair um átomo de hidrogênio de um metileno da cadeia graxa (KHANUM; THEVANAYAGAM, 2016).

Hidroperoxidases são os primeiros subprodutos da oxidação de gorduras e óleos e são caracterizadas pela instabilidade e susceptibilidade a decomposição. Produtos secundários e finais consistem de complexas misturas de produtos voláteis, não voláteis e poliméricos (como aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos orgânicos e compostos epóxi) e são ditos produtos de decaimento das hidroperoxidases. No processo de peroxidação, também são produzidos melonaldeídos e óxidos de colesterol reportados como tóxicos (KHANUM; THEVANAYAGAM, 2016).

FIGURA 3. ESQUEMA MOSTRANDO AS ETAPAS DO PROCESSO OXIDATIVO



FONTE: KHANUM; THEVANAYAGAM (2016).

3.4.2. Sistemas Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que previnem a oxidação de outros compostos (EMBUSCADO, 2015). Dentre os métodos que podem ser utilizados para inibir a oxidação estão: prevenção do acesso de oxigênio, uso de baixas temperaturas, inativação de enzimas catalíticas, redução de pressão de oxigênio, uso de embalagem adequada e uso de aditivos específicos que inibam ou retardem as reações. Estes últimos são chamados antioxidantes e podem ser definidos como compostos ou sistema de compostos capazes de inibir ou retardar o processo oxidativo pela inibição da formação de radicais livres ou por interromper a propagação do radical livre (YEHYE et al., 2015).

Os antioxidantes são largamente utilizados em medicamentos, cosméticos e alimentos para evitar a degradação dos produtos pela ação de radicais livres. Em cosméticos, além de compor o sistema conservante, juntamente com antimicrobianos, os antioxidantes podem atuar como ativos que ajudam a prevenir o envelhecimento cutâneo (JORGENSEN; FERRARO, 2009; POUILLOT et al., 2011).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao escolher o sistema antioxidante de uma formulação, como: concentração efetiva, estabilidade térmica e sinergia (YEHYE et al., 2015).

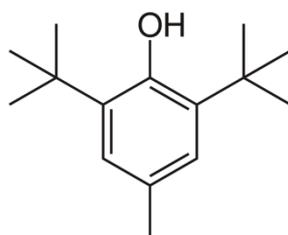
Antioxidantes sintéticos são classificados em dois grandes grupos de acordo com suas propriedades funcionais: primários e secundários (YEHYE et al., 2015).

Os antioxidantes podem atuar por diferentes mecanismos: sequestro de espécies que iniciam a peroxidação (1), quelando íons metálicos que catalisam as reações de oxidação, como Fe^{2+} (2), eliminando $O_2\bullet$ e prevenindo a formação de peróxido (3), reduzindo a concentração localizada de oxigênio (4) e/ou quebrando a cadeia auto-oxidativa (5). Este último é o mecanismo mais efetivo e as moléculas que agem por este mecanismo normalmente contem anéis aromáticos ou fenólicos e doam hidrogênio para os radicais livres tornando-se eles mesmos radicais livres (YEHYE et al., 2015).

Antioxidantes sintéticos, diferente dos naturais (ervas e especiarias), vem sendo largamente utilizados pela indústria nos últimos 60 anos. No entanto, muitos estudos vem relatando seus efeitos tóxicos, como carcinogênicos, levando à busca de alternativas mais seguras, como óleos essenciais (WANG et al., 2008; YEHYE et al., 2015).

O BHT (butil hidroxitolueno), com fórmula estrutural apresentada na FIGURA 4, é um antioxidante amplamente utilizado pela indústria cosmética e de alimentos (REED; FUJIWARA; THOMPSON, 2001). No entanto, segundo diversos autores, esta molécula é responsável por toxicidade pulmonar, promoção de tumores hepáticos, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e alteração de metabolismo efeitos adversos relacionados a sua biotransformação em intermediário de metide quinonas (FAINE et al., 2006; REED; FUJIWARA; THOMPSON, 2001; YEHYE et al., 2015).

FIGURA 4. FÓRMULA ESTRUTURAL DO BHT



3.4.3. Antioxidantes Naturais

Flavonóides são compostos aromáticos polihidroxilados amplamente presentes em frutas, vegetais, ervas e especiarias e possuem a habilidade de sequestrar radicais livres e formar complexos com íons metálicos tornando-os inativos. Os flavonóides também podem inibir enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, responsáveis pelo processo de rancificação. Dentre as espécies ricas em flavonóides e outros compostos fenólicos antioxidantes, as ervas e especiarias se destacam, sendo usadas desde o antigo Egito como excelentes fontes de antioxidantes (EMBUSCADO, 2015).

Existe uma demanda por antioxidantes naturais devido à controversas na segurança dos antioxidantes sintéticos e também ao aumento da preferência por produtos naturais. Além disso podem contribuir como flavorizantes (em alimentos) e fragrâncias (em cosméticos) naturais (EMBUSCADO, 2015).

3.4.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

A avaliação da propriedade antioxidante de OEs é complexa em função da diversidade de grupos funcionais das moléculas que os compõe e consequente variedade de comportamento químico. Por isso, diferentes métodos de avaliação precisam ser avaliados em paralelo para que os resultados combinados levem a uma conclusão mais assertiva. Desta forma, diversos métodos foram desenvolvidos e estão disponíveis; são eles: TEAC, TRAP, LDL, DMPD, FRAP, ORAC, DPPH, PCL, e β -caroteno *bleaching*. Dentre eles, TEAC, DPPH, PCL são os mais recomendáveis por determinarem a atividade tanto de moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas (característico da composição de OEs), o que assegura uma melhor comparação de resultados e também cobre uma diversidade maior de moléculas (LEE et al., 2005).

3.5. FRAGRÂNCIAS

A grande maioria dos cosméticos possui em sua formulação uma fragrância, elemento que tem função sensorial importante, pois além de agregar prazer e emoção ao momento de uso do produto, também precisa cobrir o cheiro por vezes desagradável de algumas matérias-primas, especialmente em semissólidos.

Conforme pode ser observado na TABELA 4, a indústria de fragrâncias representou 24,1 milhões de dólares em vendas em 2016, sendo que as 5 maiores (Givaudan, Firmenich, IFF, Symrise e Takasago, nesta ordem) são responsáveis por 62,2% deste volume (LEFFINGWELL & ASSOCIATES, 2016).

TABELA 4. LÍDERES NA INDÚSTRIA DE FRAGRÂNCIAS E AROMAS

Companhia	País	Vendas em milhões de dólares	Market Share
Givaudan	Suíça	\$4576	19,0%
Firmenich	Suíça	\$3331	13,8%
IFF	Estados Unidos	\$3023	12,5%
Symrise	Alemanha	\$2887	12,0%
Takasago	Japão	\$1171	4,9%
Outras	-	\$9112	37,8%
Total	-	\$24100	100%

FONTE: Adaptado de LEFFINGWELL & ASSOCIATES (2016).

A palavra perfume (do latim *per fumum*, através da fumaça) é uma referência à mais primitiva forma de perfumação, a queima de gomas e resinas (mirra, incenso, etc). (FERNANDEZ et al., 2008). Atualmente, o perfume pode ser definido como o produto obtido da diluição de uma fragrância em álcool 90°.

“O universo do perfume é um mundo fascinante que associa técnica, ciência e arte. (FERNANDEZ et al., 2008)”

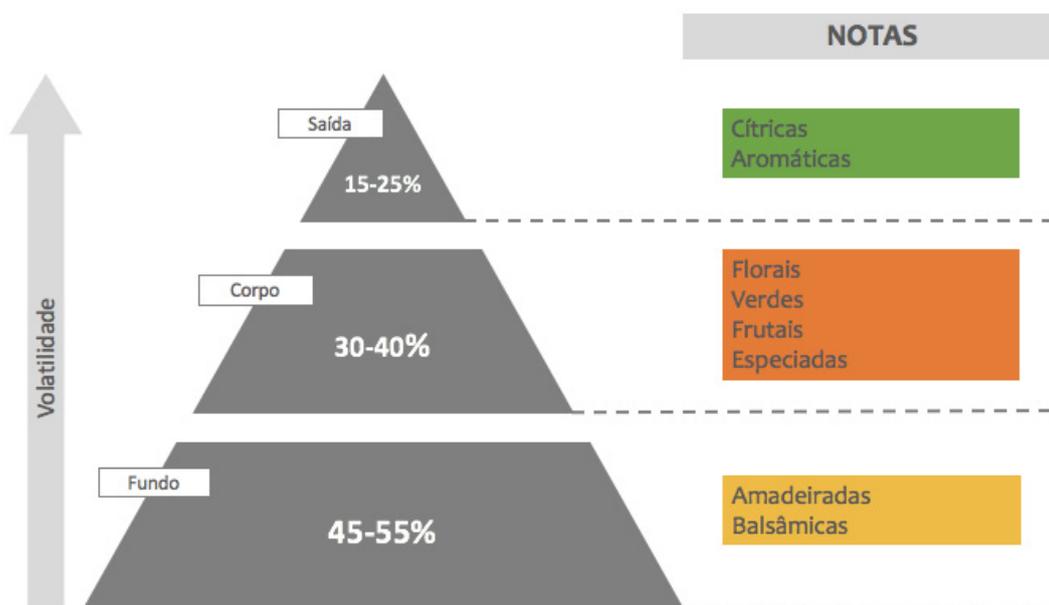
As fragrâncias por sua vez, são definidas como uma mistura harmoniosa de matérias primas naturais e/ou sintéticas, sendo utilizadas em uma ampla gama de produtos cosméticos e sanitários (DAVIES, 2009; FERNANDEZ et al., 2008). As fragrâncias tem a função de transmitir prazer, mascarar o cheiro desagradável e inerente a alguns ingredientes e melhorar a experiência de uso do produto (“Fragrances”, 2016).

Pesquisas com consumidores mostram que a fragrância é um dos fatores chave na preferência por determinado cosmético e produto de cuidado pessoal. O sentido do olfato é diretamente conectado com o sistema límbico, centro cerebral para o processamento e armazenamento de memória e emoções. Inúmeros estudos demonstram que fragrâncias melhoram o estado de bem-estar e tem um impacto positivo na psique (“Fragrances”, 2016).

3.5.1. Estrutura de uma fragrância

Uma fragrância pode conter entre 40 e 80 MPs que são representadas através da Pirâmide Olfativa. A criação desta estrutura é creditada a Jean Carles, perfumista e criador da primeira escola de perfumistas, e visou organizar as matérias-primas de acordo com sua volatilidade. Nesta representação (FIGURA 5), as matérias-primas são divididas em notas de saída, corpo e fundo que representam, respectivamente, 15-25%, 30-40% e 45-55% da fragrância (FERNANDEZ et al., 2008).

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PIRÂMIDE OLFATIVA



FONTE: a autora.

As notas de saída são as mais voláteis, responsáveis pelo impacto da fragrância e representadas, em sua maioria, por notas frutais cítricas e aromáticas. Já o corpo tem uma volatilidade intermediária e geralmente é constituído por notas verdes, flores, frutais e especiadas. O fundo é responsável pela tenacidade ou durabilidade da fragrância, uma vez que os principais constituintes, madeiras e notas balsâmicas, possuem baixa volatilidade (FERNANDEZ et al., 2008).

O alto custo de produção das matérias-primas naturais restringiu o uso de perfumes às altas camadas da sociedade até o século XIX. A popularização do perfume foi possível, dentre outros fatores, pelo desenvolvimento da síntese orgânica, que permitiu a construção de perfumes com moléculas sintéticas mais

baratas, de fácil abastecimento e mais estáveis em diferentes bases (SELL, 2006).

As matérias-primas naturais são, em sua maioria, OEs (obtidos por hidrodestilação) ou absolutos (obtidos por extração com solventes orgânicos). Já as matérias-primas sintéticas podem ser moléculas já existentes na natureza, mas isoladas e produzidas quimicamente (por exemplo, mentol presente no óleo essencial de menta) ou moléculas que ocorrem naturalmente (como o metil nonil acetaldeído). As moléculas sintéticas são particularmente importantes para a perfumaria uma vez que trazem inovação e substituem componentes de origem animal. Um exemplo são os musks naturais, importantes por serem moléculas de alta fixação, hoje substituídos por moléculas sintéticas como nitro musks e musks poli ou macrocíclicos (DAVIES, 2009; FERNANDEZ et al., 2008).

3.5.2. Fragrâncias Naturais

Uma vez que a composição da fragrância se restrinja aos OEs naturais, abre-se a possibilidade de explorá-la em um cosmético natural não somente com a função de ingrediente de perfumação, mas também como um ingrediente funcional: agente antimicrobiano e antioxidante, propriedades inerentes destas substâncias. Tanto alimentos quanto cosméticos possuem substratos orgânicos potencialmente perecíveis por oxidação a ação microbiana, e a relativa segurança dos óleos essenciais associado a sua aceitação pelo consumidor pode suportar sua multifuncionalidade (SACCHETTI et al., 2005).

A união das propriedades hedônicas e funcionais de fragrâncias naturais vai ao encontro da crescente preocupação com ingredientes sintéticos, como já discutido nos tópicos anteriores, e o aproveitamento da potencialidade dos óleos essenciais já vem sendo observada não só em cosméticos, mas também em alimentos e bebidas (SACCHETTI et al., 2005).

No entanto, construir fragrâncias potencialmente agradáveis sem o uso de substâncias sintéticas pode limitar o processo de criação e impactar a aceitação do consumidor atual, que é exigente quanto à diversidade e inovação dos cheiros. Além disso, uma vez que os ingredientes de fragrância naturais podem ser tão ou até mais críticos que os sintéticos em termos de segurança, é preciso uma análise cuidadosa dos riscos toxicológicos envolvidos.

3.5.3. Segurança de Fragrâncias

As fragrâncias precisam cumprir alguns requisitos de segurança assim como qualquer ingrediente cosmético: ser seguros para consumidores quando utilizados de acordo com o modo de uso ou como as pessoas costumam utilizá-lo. O órgão internacional IFRA (*International Fragrance Association*), em operação desde 1973, fornece recomendações para boas práticas de fabricação e guidelines para a avaliação da segurança de ingredientes de fragrâncias, incluindo padrões de segurança que limitam ou proíbem o uso de determinadas matérias-primas. Revisões científicas sobre ingredientes de fragrâncias são conduzidas pelo RIFM (*Research Institute for Fragrance Materials*), fundado em 1966 com o objetivo de gerar e avaliar a segurança de ingredientes de fragrâncias de perfumes, cosméticos, shampoos, cremes, detergentes, aromatizadores de ambiente, velas e outros produtos pessoais e para a casa (SELL, 2006).

O órgão IFRA representa a expertise tecnológica e científica de aproximadamente 100 fabricantes de fragrâncias em 15 países, sendo responsável pela emissão e atualização do Código de Práticas (*Code of Practice*) no qual toda prática regulatória de fragrâncias é baseada. É responsabilidade da IFRA publicar e implantar as decisões tomadas pelo RIFM.

O Código de Práticas não só protege o consumidor, mas também protege a saúde e bem-estar dos colaboradores na indústria, que estão expostos a uma quantidade muito maior de químicos que o consumidor. Os testes conduzidos pelo RIFM incluem toxicidade oral cutânea e oral, irritação cutânea, sensibilização e fototoxicidade. Se necessários, testes mais aprofundados são conduzidos, como estudos sub-crônicos, metabólicos e de absorção dérmica. Além disso, são coletados dados sobre exposição de consumidores diretamente da indústria cosmética. Todos estes dados garantem a relevância das informações utilizadas na regulamentação de fragrâncias (SELL, 2006).

Por óbvio, a indústria de fragrâncias não utiliza ingredientes tóxicos, carcinogênicos ou corrosivos. A razão mais comum para haver restrição em ingredientes é a possibilidade de causar sensibilização cutânea. Diferente da irritação cutânea, onde normalmente os sintomas desaparecem após a remoção do agente irritante, a sensibilização cutânea envolve a ativação do sistema imune e os sintomas podem permanecer por um período maior após a exposição

inicial, além de ter consequências mais severas numa segunda exposição (SELL, 2006).

Deste modo, o protocolo atualmente utilizado consiste na avaliação dos resultados de *patch tests* e em caso positivo os estudos são aprofundados para verificar a possibilidade de identificação de um nível seguro de exposição. Se este nível é detectado, é definido um valor máximo de uso no produto final dez vezes inferior ao nível detectado. Se este nível não pode ser identificado ou o ingrediente só tem aplicação em concentrações iguais ou superiores ao nível seguro, então o ingrediente é banido. O trans-2-hexenal, por exemplo, que possui um intenso odor verde, frutal e vegetal, se mostrou sensibilizante a 0,2% mas não a 0,02%. Então, seu nível de uso é de no máximo 0,002% no produto final, concentração em que o ingrediente ainda tem forte influência na fragrância (SELL, 2006).

No geral, a rota de exposição considerada para fragrâncias é a pele, uma vez que esta é o alvo de aplicação na condição normal de uso dos cosméticos, deve ser avaliado se o ingrediente causa irritação e se é absorvido pela barreira cutânea. No entanto, o Código de Práticas IFRA leva em consideração as particularidades de cada produto, sua região de aplicação, se existe enxague, composição da base e público-alvo (como infantil) para determinar os níveis seguros de uso. Também pode haver toxicidade do ingrediente na exposição solar, o que deve ser considerado em produtos de proteção ou exposição solar (SELL, 2006).

A TABELA 5 apresenta exemplos de ingredientes restritos pelo Código de Prática IFRA.

TABELA 5. EXEMPLOS DE INGREDIENTES RESTRITOS OU PROIBIDOS POR IFRA

Ingrediente	Restrição	Razão	% permitida na pele
Óleo de bergamota (expressão)	Restrito	Fototoxicidade	0,4
Isoeugenol	Restrito	Sensibilização	0,2
Óleo de Limão (expressão a frio)	Restrito	Fototoxicidade	2.0
Absoluto de folhas de figo	Proibido	Fotosensibilização	0,0
Safrole, Isosafrole e dihidrosafrole	Proibido (com algumas exceções)	Toxicidade Crônica	0,60

FONTE: IFRA, 2015

Além das restrições gerais exemplificadas na TABELA 5, os ingredientes identificados como potencialmente alérgenos por apresentarem permeação cutânea e desencadarem uma resposta imune levando a alergias do tipo dermatite de contato ou sensibilidade cutânea, devem também ser listados na rotulagem do produto, juntamente com os demais ingredientes do produto, sempre que ultrapassarem 10ppm em produtos não enxaguáveis e 100ppm em produtos enxaguáveis. Alguns exemplos comuns de alérgenos são: aldeído cinâmico, citral, citronelol, eugenol, d-limoneno e linalol (SELL, 2006).

A Código de Práticas IFRA considera em sua regulamentação tanto matérias-primas naturais quanto sintéticas, sejam estas últimas existentes naturalmente ou não. A análise de um ingrediente deve considerar sua concentração no produto final considerando todas as fontes, seja sua presença como ingrediente isolado, seja como parte de uma matéria-prima natural. Neste último caso, a IFRA determina as quantidades comumente encontradas de cada molécula nos ingredientes naturais (em sua maioria óleos essenciais) para referência de cálculo (IFRA, 2015).

Embora exista um censo comum que ingredientes naturais sejam mais seguros que sintéticos, os dados publicados pela IFRA mostram que a maioria dos ingredientes restritos ou banidos são naturais ou presentes em matérias-primas naturais (como OEs). Isso de forma alguma inviabiliza o uso de ingredientes naturais em fragrâncias, mas não os isenta da análise de segurança inerente a qualquer ingrediente cosmético (SELL, 2006).

3.6. ANÁLISE SENSORIAL

O aspecto sensorial de um produto de consumo é considerado um dos fatores fundamentais de sua qualidade (além dos aspectos físico-químico e microbiológico), seja este um cosmético, um alimento ou um medicamento. Se analisarmos do ponto de vista de qualidade percebida pelo consumidor, o aspecto sensorial torna-se o mais importante na escolha dos produtos (DUTCOSKY, 2013; MEILGAAARD; VANCE CIVILLE; THOMAS CARR, 2006).

Análise sensorial pode ser definida com a ciência que busca evocar, medir e interpretar respostas humanas às propriedades de produtos percebidas pelos sentidos (CIVILLE; OFTEDAL, 2012). Ao tratar-se de cosméticos, os atributos sensoriais de estudo estão normalmente associados com tato e olfato.

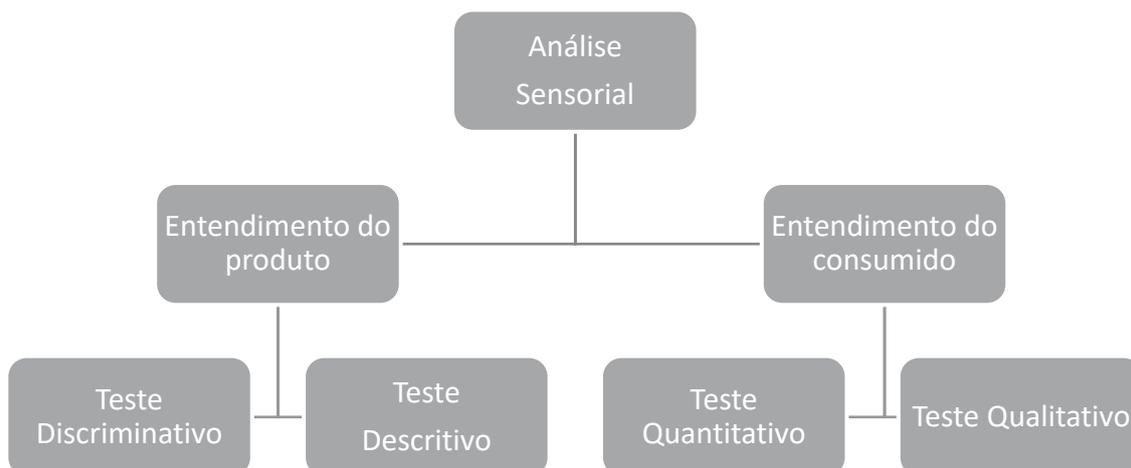
Cada atributo presente em um produto, seja uma fragrância ou uma textura, é considerado um estímulo ao nosso sistema sensorial e o processo para sua percepção pode ser resumido em 3 etapas: (a) o estímulo atinge o nariz ou a pele e através dos receptores olfativos ou táteis é gerado um fluxo de informações para o cérebro; (b) o cérebro organiza, analisa e interpreta a sensação transformando-a em uma percepção; e (c) é formulada uma resposta que pode ser objetiva (“é pegajoso”), afetiva (“gostei”) ou emocional (“lembra minha infância”). A análise sensorial é capaz de medir objetivamente as propriedades sensoriais para entender os produtos e também medir as respostas subjetivas dos indivíduos para entender os consumidores, além de estabelecer uma conexão entre estas duas medidas (CIVILLE; OFTEDAL, 2012).

As técnicas utilizadas para entender os produtos são divididas em discriminativas e descritivas. As primeiras são utilizadas quando objetiva-se saber se dois produtos são significativamente diferentes e é empregada na substituição de matérias-primas de produtos onde deseja-se manter a similaridade entre os produtos. Dentre os métodos mais utilizados são o triangular e duo-trio. Já os métodos descritivos buscam descrever quali e quantitativamente as propriedades sensoriais de um produto. Para uma fragrância, por exemplo, é possível listar as notas olfativas que melhor a descrevem (cítrica, floral, amadeirada, etc) e em que intensidade podem ser percebidas. Tanto para os métodos discriminativos, quanto os descritivos, é necessário um painel de indivíduos treinados e capacitados (normalmente em torno de 12) para realizar as medições utilizando escalas lineares (CIVILLE; OFTEDAL, 2012).

Já as técnicas utilizadas para entender os consumidores, objetivam captar as reações subjetivas ao uso dos produtos, como agradabilidade e preferência. Também podem acessar a percepção de performance e benefícios proporcionados pelo produto. Os testes de consumidor podem ser quantitativos ou qualitativos. Os primeiros requerem um alto número de participantes (pelo menos 75), devido a variabilidade em termos de preferência e sensibilidade fisiológica e são utilizadas escalas categóricas. Os testes qualitativos são mais utilizados em pesquisas de mercado para avaliação conceitual de produtos e entender os potenciais motivos pelos quais eles são gostados ou desgostados (CIVILLE; OFTEDAL, 2012).

A FIGURA 6 resume, de uma maneira macro, as técnicas sensoriais.

FIGURA 6. CLASSIFICAÇÃO MACRO DOS TIPOS DE TESTES SENSORIAL



FONTE: CIVILLE; OFTEDAL (2012).

3.6.1. Testes Afetivos

As técnicas de entendimento de consumidor são também chamadas de testes afetivos ou subjetivos e estas normalmente buscam entender a aceitabilidade e preferência de um ou mais produtos. Segundo (DUTCOSKY, 2013), a ISO 11136:2013 define como teste de aceitabilidade aquele que mede a intensidade de prazer no consumo ou grau de gostar do produto por meio de escalas. O teste de preferência é utilizado para medir a ordem de gostar de diferentes produtos e a informação obtida é de natureza relativa uma vez que existe comparação entre os produtos em teste.

A avaliação da agradabilidade através de escalas hedônicas de 7 a 9 pontos estão entre as técnicas mais estabelecidas para entendimento de aceitação ou rejeição. Para entender este dado é importante coletar informações descritivas das amostras. O método de CATA (*Check all that Apply*) é comumente utilizado para este fim, e consiste de uma lista de palavras (descritores) dentre as quais o consumidor pode selecionar as mais apropriadas para descrever a amostra (DUTCOSKY, 2013; MEILGAAARD; VANCE CIVILLE; THOMAS CARR, 2006).

Uma das maiores dificuldades em avaliação sensorial são as muitas fontes de variabilidade nos estudos, tornando extremamente importante um desenho de estudo que torne controlável o maior número possível de variáveis. Em testes com consumidor é importante selecionar uma amostra de população que represente o público-alvo do produto em análise e em testes com painel treinado

é preciso selecionar indivíduos com alta sensibilidade para a percepção dos estímulos em análise. O local de teste também deve ser avaliado, sendo a estrutura de laboratório com cabines sensoriais (ambiente controlado) mais adequado para testes com painel treinado e a própria residência do voluntário é o local mais apropriado para teste de consumidor. Os produtos em análise, ou amostras, possuem diversas fontes de variáveis e, por consequência, pontos de controle. Devem ser padronizados modo de preparo, forma de apresentação, e qualquer outra variável que não esteja em análise. Também é importante apresentar as amostras de forma randomizada para cada respondente para que efeitos de ordem não influenciem a resposta (CIVILLE; OFTEDAL, 2012).

Assim como em outras disciplinas científicas, os dados sensoriais coletados precisam passar para tratamento estatístico. As técnicas univariadas, como análise de variância e teste qui-quadrado, são normalmente suficientes para determinar diferenças e possibilitar recomendações. Quando muitas variáveis ou amostras estão envolvidas, técnicas multivariadas mais complexas podem ser necessárias, como análise de correspondência e análise de componentes principais (CIVILLE; OFTEDAL, 2012).

A Análise dos Componentes Principais (ACP) é um método de análise multivariada semelhante à análise de correspondência e utilizada em diversas áreas para a análise de grandes quantidades de dados qualitativos categóricos (aqueles que identificam qualidade, categoria ou característica, levando a classificações e não à medidas). Esta técnica permite a visualização gráfica das categorias de variáveis em uma tabela de contingência com o objetivo de determinar o grau de associação global entre elas e indicando como as variáveis estão relacionadas (FERNANDO et al., 2014). Através dos gráficos resultantes, é possível avaliar visualmente se as variáveis se afastam do pressuposto de independência, o que demonstra possíveis associações, e ainda perceber como se dá esta associação. As variáveis assumem posições nos gráficos de acordo com a associação ou similaridade entre elas (SOUZA; ROCHA; VIEIRA, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS

A seleção dos OEs foi realizada em função da análise bibliométrica das publicações discutidas na revisão bibliográfica deste documento, sendo que foram selecionados aqueles que demonstraram potencial de atividade antioxidante e antimicrobiana por um ou mais autores e/ou que possuíam odor agradável.

Os OEs foram gentilmente fornecidos pela Casa de Fragrâncias Firmenich® e foram obtidos através de destilação a vapor (processo permitido para cumprir o requisito de natural). Por questões de sigilo industrial, não é possível descrever aqui o local de origem de cada OE. Os OEs foram armazenados em frascos de vidro âmbar em geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e protegidos de luz).

A TABELA 6 apresenta os OEs selecionados, bem como a nota olfativa que representam na construção do *blend*.

TABELA 6. ÓLEOS ESSENCIAS SELECIONADOS A PARTIR DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nome Popular	Espécie	Parte da planta	Família Olfativa	Pirâmide Olfativa
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folhas	Herbal	Saída
Anis	<i>Illicium verum</i>	Semente	Especiaria	Corpo
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>	Caule	Especiaria	Corpo
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Flores	Especiaria	Corpo
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	Folhas	Herbal	Saída
Menta	<i>Mentha spicata</i>	Folhas	Herbal	Saída
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Folhas	Especiaria	Corpo
Sálvia	<i>Salvia sclarea</i>	Folhas	Herbal	Saída
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Folhas	Herbal	Saída

A grande maioria dos OEs que demonstraram potencial antioxidante e antimicrobiano representam notas herbais e especiadas, o que está de acordo com o publicado por EMBUSCADO (2015). Portanto, os *blends* construídos estão limitados a notas de saída e corpo conferindo alta explosão de perfumação no momento da aplicação, mas não necessariamente longa durabilidade.

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do potencial antioxidante foi realizado pelo método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com MENSOR (2001).

Para tanto, 1,0mL de solução 0,3mM de DPPH foi adicionada a 2,5mL de solução etanólica de cada OE em diferentes concentrações, sendo realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 a 518nm após 30 minutos de reação. Uma solução de mesma concentração dos OEs mais 1,0mL de etanol foi tomada como branco e uma solução de 2,5mL de etanol mais 1,0mL solução de 0,3mM de DPPH foi tomada como controle. O BHT foi utilizado como referência por ser largamente utilizado pela indústria cosmética e estar sendo questionado quanto a sua segurança (REED; FUJIWARA; THOMPSON, 2001).

Foi realizada uma triagem prévia de todos os OEs na concentração de 12,5µL/mL para direcionar as faixas de concentrações a serem testadas para cada óleo. Todas os ensaios foram realizadas em triplicata.

Foram calculadas tanto a atividade antioxidante (AA%) quanto concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH (IC₅₀) de cada OE e *blend* desenvolvido.

A AA% foi calculada através da fórmula:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{100 - [(Abs amostra - Abs branco) \times 100]}{[Abs do controle]}$$

Para o cálculo do IC₅₀ foram utilizadas as equações das retas obtidas a partir da plotagem das concentrações de OE ou *blends versus* a AA% obtida. (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008).

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos *blends* foi determinada através do método de microdiluição em caldo validado por VEIGA (2016) e descrito a seguir. Este método é comumente utilizado para a avaliação do potencial antimicrobiano de OEs (PRAKASH et al., 2012; SACCHETTI et al., 2005).

As diluições dos OEs foram preparadas no dia do estudo. O caldo utilizado no estudo (caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras) foi também usado como diluente do OE. Uma vez que os OEs apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, a solução foi fortemente homogeneizada em agitador do tipo vortex imediatamente antes da pipetagem a fim de garantir a concentração correta no primeiro poço. O metilparabeno foi utilizado com referência, uma vez que é largamente aplicado na indústria cosmética e também é alvo de substituição (SONI, 2005). Para facilitar sua diluição, o metilparabeno foi primeiramente diluído com 1,0mL de metanol e posteriormente o volume foi completado com água purificada.

Os microrganismos que foram utilizados neste estudo são os indicados pela Farmacopéia Brasileira 5ª Edição para o teste de eficácia antimicrobiana: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (BRASIL, 2010).

Bactérias e levedura foram armazenadas em ágar TSB e repicados em ágar triptona de soja (TSA) e em ágar Sabouraud e foram incubados a 35°C/24h e 25°C/48h, respectivamente.

A partir do crescimento em ágar dos microrganismos após incubação a 35°C±0,5°C por um período entre 20 e 23 horas, foram realizadas suspensões, transferindo-se parte de uma colônia isolada com o auxílio de alça bacteriológica estéril para solução salina 0,9%. As suspensões foram padronizadas através da comparação visual da turbidez com tubo equivalente à escala 0,5 de McFarland. O inóculo preparado foi utilizado por no máximo 3 dias e armazenado sob refrigeração de 2 à 8°C.

O cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TCC) a 0,125% é o indicador de crescimento utilizado no método e foi preparado adicionando-se 125mg em balão volumétrico de 100mL e diluindo-se com água destilada estéril até completar o volume total do balão. A solução obtida foi filtrada por membrana esterilizante (0,20µm) e armazenada em frascos estéreis recobertos com papel alumínio sob refrigeração (2 a 8°C). As soluções foram utilizadas por no máximo 7 dias após o preparo.

Os testes foram realizados em placas de plástico estéreis de 96 poços com fundo redondo (em "U"), conforme mostra o esquema da FIGURA 7. Com auxílio de uma pipeta de microvolumes multicanal foram adicionados em todos os poços

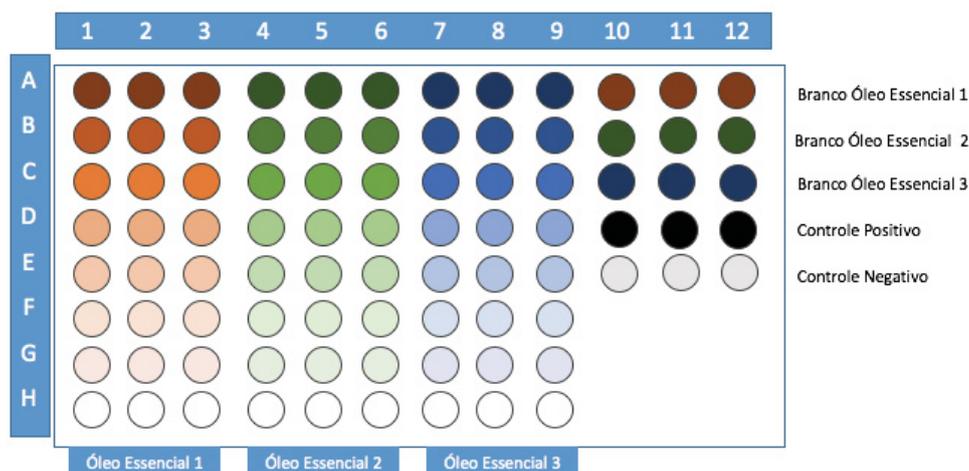
100µL do caldo específico para cada microrganismo (caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras). No primeiro poço de cada fileira foram adicionados 100µL dos OEs ou *blends* na concentração de 500µL/mL nas triagens ou 2,0µL/mL quando o OE mostrou-se muito potente inibindo o crescimento até o último poço (concentração próxima a concentração do OE no último poço quando a concentração do OEs é 500µL/mL).

Em seguida, após homogeneização, uma alíquota de 100µL do conteúdo de cada orifício foi transferida para os orifícios subsequentes da coluna obtendo-se, assim, as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. No caso de uma amostra com concentração de 500µL/mL, obtiveram-se as seguintes concentrações do primeiro para o último poço: 250 µL/mL, 125 µL/mL, 62,5 µL/mL, 31,25 µL/mL, 15,63 µL/mL, 7,81 µL/mL, 3,90 µg/mL e 1,95 µL/mL.

Na sequência 10µL do inóculo padronizado foram depositados em todos os orifícios, exceto nos poços brancos, nos quais foram adicionados 10µL de solução salina (0,9%). Para o controle negativo, foi utilizado somente o caldo, o mesmo volume de água (veículo no qual o antimicrobiano foi diluído) e o inóculo. Para o controle positivo foram utilizados cloranfenicol 200µg/mL para bactérias e cetoconazol 500µg/mL para levedura.

Após incubação a 35°C por 22 horas foram adicionados em cada orifício 20µL da solução de TTC 0,125 % e as microplacas foram novamente incubadas por mais duas horas com posterior leitura em espectrofotômetro Multiscan FC a 540nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

FIGURA 7. ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA MIC



FONTE: (VEIGA, 2016).

Para o cálculo da concentração de microorganismo em UFC/mL foram utilizadas as equações da reta validadas por VEIGA (2016):

- *S. aureus*: $y=1 \times 10^{-8}x+0,0097$

- *E. coli*: $y=3 \times 10^{-9}x+0,0223$

- *P. aeruginosa*: $y=1 \times 10^{-8}x+0,024$

- *C. albicans*: $y=5 \times 10^{-7}x+0,1264$

4.4. AVALIAÇÃO SENSORIAL

Foram utilizadas técnicas sensoriais afetivas para avaliação olfativa dos OEs isoladamente (Fase I) e dos *blends* desenvolvidos (Fase II).

A avaliação sensorial dos OEs objetivou identificar aqueles com maior aceitação a fim de evitar incluir nos *blends* OEs que causassem rejeição ao consumidor. Já a avaliação sensorial dos *blends* buscou entender sua aceitabilidade olfativa, uma vez que também atuam como fragrância no produto final.

Os OEs foram avaliados a partir de 75 consumidores (CIVILLE; OFTEDAL, 2012) utilizando fita olfativa comercial (Orlandi Inc.). As fitas foram apresentadas de forma randomizada para cada respondente 5 minutos após serem molhadas até marca padrão no OE. Os voluntários(as) responderam a perguntas referentes à aceitabilidade e descrição olfativa pelo método CATA (DUTCOSKY, 2013) em um formulário *online* o qual foi acessado utilizando celular (<https://pt.surveymonkey.com/r/YWVMTWH>).

Os *blends* desenvolvidos foram avaliados em uma formulação semissólida de composição natural (creme corporal natural) por 79 consumidores (CIVILLE; OFTEDAL, 2012). Foram aplicados 200 μ L de cada creme em 3 sítios de aproximadamente 8,0cm na parte interna dos antebraços (dois no antebraço esquerdo e um no antebraço direito) de forma randomizada. Os voluntários(as) responderam à perguntas referentes à aceitabilidade, descrição olfativa pelo método CATA e preferência (DUTCOSKY, 2013) em um formulário *online* acessado pelo celular (<https://pt.surveymonkey.com/r/53HTS5K>).

O ANEXO 1 deste documento apresenta um questionário físico com as mesmas perguntas e formas de apresentação utilizadas nos formulários *online*.

Os descritores utilizados no CATA foram selecionados através de um *brainstorming* com 5 consumidoras de cosméticos com fragrâncias que

avaliaram os 9 OEs e levantaram o máximo de descritores que poderiam ser utilizados para aquele conjunto de odores.

Os respondentes das duas fases da pesquisa foram recrutados entre alunos e funcionários do Departamento de Farmácia de UFPR e os testes foram aplicados no laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Os critérios de inclusão foram: homens e mulheres, de 18 a 60 anos, consumidoras de cosméticos. Já os critérios de exclusão foram: histórico de alergia a cosméticos e/ou fragrâncias, grávidas ou lactantes, menores de 18 anos ou maiores de 60 anos, não usuários de cosméticos.

Tanto OEs quanto *blends* foram avaliados de forma codificada, conforme demonstrado na TABELA 7, a e ordem de apresentação das amostras foi randomizada entre os voluntários (DUTCOSKY, 2013; MEILGAAARD; VANCE CIVILLE; THOMAS CARR, 2006).

TABELA 7. CODIFICAÇÕES UTILIZADAS NAS FASES I E II DOS ESTUDOS SENSORIAIS

Fase	Amostra	Código
Fase I	Alecrim	593
	Anis	231
	Canela	798
	Cravo	654
	Manjeriçã	412
	Menta	903
	Orégano	115
	Sálvia	882
	Tomilho	310
Fase II	Blend 1	698
	Blend 2	567
	Blend 3	413

O estudo sensorial como um todo (Fase I e II), com número de CAAE 68312817.0.0000.0102, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPR através da Plataforma Brasil em 15/05/2017 obtendo o número de comprovante 048390/2017 (ANEXO 2). O projeto foi aprovado em 24/07/2017 sob o número de parecer 2.183.999. Os consumidores que aceitaram participar do estudo, concordaram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP no qual declaravam participar voluntariamente e entender os riscos e benefícios do estudo (ANEXO 3).

4.5. DESENVOLVIMENTO DOS *BLENDS*

Os OEs apresentados na TABELA 6 que apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana equivalente ou superior às referências (BHT e metilparabeno, respectivamente), além de aceitação pelo consumidor superior à 40% em Top 2 Box, foram utilizados para a construção dos *blends*.

Foram desenvolvidos 3 *blends*, chamados de B1, B2 e B3, os quais foram testados para atividade antioxidante e antimicrobiana pelos mesmos métodos utilizados para os OEs isolados, além de serem submetidos ao teste desafio do conservante (*Challenge Test*) na emulsão natural desenvolvida.

As dosagens máximas de cada OE nos *blends* respeitou o preconizado pelo Código de Práticas IFRA (IFRA, 2015), não ultrapassando a concentração máxima permitida de seus componentes controlados.

4.6. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO NATURAL

Para a condução das avaliações sensoriais Fase II e *Challenge Test* foi desenvolvida uma base emulsionada contendo somente ingredientes naturais, podendo ser chamada de natural de acordo com o preconizado pela Ecocert: produto contendo no mínimo 95% dos ingredientes naturais ou de origem vegetal sobre o total de ingredientes (BIGHETTI, 2014; HIGUCHI, 2012).

Neste trabalho a emulsão se caracteriza como um creme (semissólida) e foi desenvolvida com os seguintes ingredientes: óleo de semente de uva como emoliente, álcool cetílico vegetal com tensoativo, olivato de sorbitano como emulsionante, glicerina vegetal como umectante e água como veículo. Os 3 primeiros ingredientes constituíram a fase oleosa da formulação e os dois últimos a fase aquosa. As duas fases foram aquecidas em banho-maria a 70°C, sendo a fase aquosa dispersa na fase oleosa sob constante agitação. Quando a temperatura da mistura já emulsionada atingiu 40°C o *blend* foi adicionado e homogeneizado, evitando assim a perda dos componentes mais voláteis.

4.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONSERVANTE

A avaliação do potencial conservante (*Chellange Test*) foi realizada de acordo com os parâmetros preconizados na Farmacopéia Brasileira (BRASIL,

2010) e também estudo realizado por KERDUDO et al. (2016). A metodologia levou em consideração os seguintes microorganismos:

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) – Gram Negativa
- *Escherichia coli* (ATCC 8739) - Gram Negativa
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) – Gram Positiva
- *Candida albicans* (ATCC 10231) - Fungo
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) - Fungo

Para as bactérias Gram negativas e os fungos foram preparados *pools* a fim de otimizar as análises. Sendo assim, foram considerados 3 inóculos: Gram positivas, Gram negativas e fungos. Os inóculos foram preparados na concentração celular de 10^6 utilizando o equipamento densitômetro (*Densimat Biomérieux Biotechnology*).

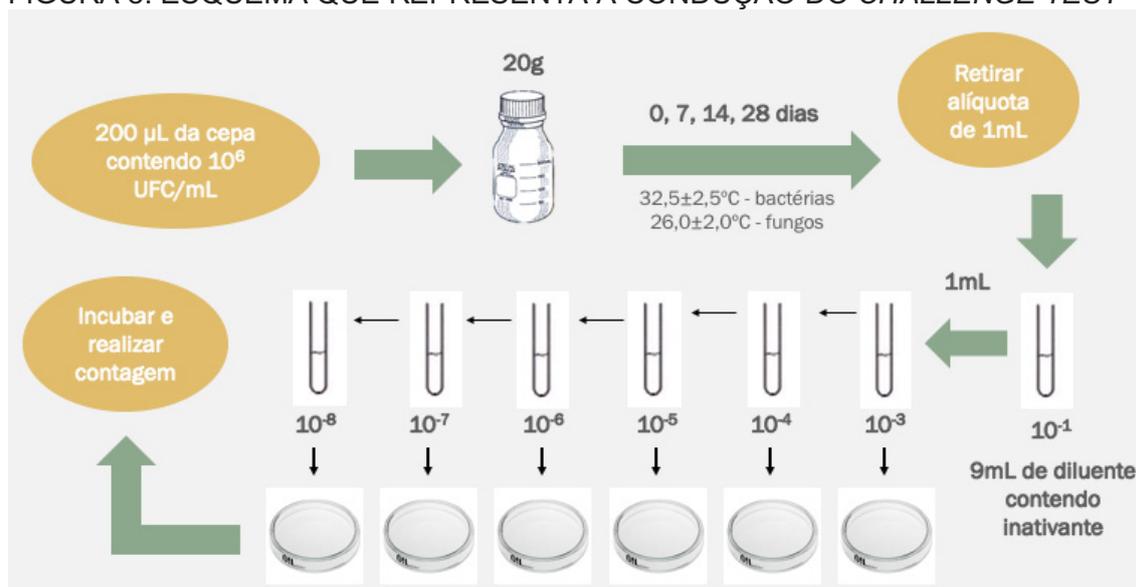
Inicialmente, 20g de creme de cada formulação contendo os *Blends* 1, 2 e 3 separadamente, foram colocados em cinco frascos plásticos estéreis e contaminados com 200 μ L de inóculo de cada microrganismo ou *pool* (1% do peso), sendo então homogeneizados e incubados em estufa a $22,5\pm 2,5^\circ\text{C}$.

Nos tempos zero (imediatamente após inoculação dos frascos), 7, 14 e 28 dias, 1g do produto contaminado foi amostrado em tubo de ensaio estéril contendo 9mL de caldo neutralizante, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Em seguida, 1 mL da diluição 10^{-1} foi amostrada e adicionada a um novo tubo contendo 9 mL de salina, obtendo-se a diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até obtenção da diluição 10^{-6} .

Posteriormente, 1 mL de cada diluição foi transferida para placa de Petri previamente esterilizada e foram adicionado 20,0mL de ágar TSA para os inóculos de bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para o inóculo de fungos. As placas foram homogeneizadas lentamente com movimentos em “S” ou “8”, sendo então incubadas a $32,5\pm 2,5^\circ\text{C}$ para TSA e a $26\pm 2,0^\circ\text{C}$ para Sabouraud. A metodologia pode ser observada na FIGURA 8.

Os resultados foram expressos através da média + desvio padrão das contagens em triplicata de UFC/g do produto.

FIGURA 8. ESQUEMA QUE REPRESENTA A CONDUÇÃO DO CHALLENGE TEST



FONTE: a autora.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises experimentais de DPPH e MIC foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram reportados como média + desvio padrão e comparados utilizando análise de variância (*one-way* ANOVA), sendo as diferenças entre médias determinadas por Teste Tukey.

Os testes sensoriais foram analisados por ANOVA com teste de probabilidade de Fisher para médias e teste qui-quadrado para proporções (CIVILLE; OFTEDAL, 2012), sendo os resultados expressos como média mais desvio padrão e proporção de respostas + intervalo de confiança, respectivamente. Os dados de CATA foram analisados pela técnica exploratória de Análise de Componente Principal.

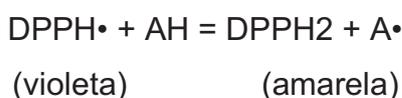
Para todas as análises realizadas foi utilizado o software XLSTAT 2009.1.02 e foi considerado um nível de significância de 95% ($p < 0,05$ para diferença significativa).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAS

De acordo com EMBUSCADO (2015), extratos de ervas e especiarias, em sua grande maioria, atuam por sequestro de radicais livres, ou seja, bloqueando os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio. Além disso, DPPH é capaz de determinar a atividade tanto de moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas assegurando uma melhor comparação de resultados e cobrindo uma diversidade maior de moléculas (LEE et al., 2005). Por isso, o método de DPPH foi o método de escolha neste trabalho que envolve avaliação de OEs derivados de ervas e especiarias.

O radical estável DPPH• sofre redução na presença de moléculas antioxidantes (AH) com mudança de coloração violeta para amarela proporcional à concentração da substância redutora da amostra (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008), conforme mostra a reação abaixo:



Este método é o mais utilizado para a determinação da atividade antioxidante em OEs por diferentes autores (CHOI et al., 2000; PRAKASH et al., 2012; SACCHETTI et al., 2005), visto sua simplicidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012). Uma vez que objetiva-se utilizar a IC₅₀ como parâmetro de comparação para o ensaio de DPPH, foram construídas curvas de calibração para obtenção das equações das retas de cada OE e BHT. Inicialmente, todos os OEs foram testados na concentração de 12,5µL/mL para determinação da faixa de concentração a ser trabalhada. Os resultados obtidos na TABELA 8 determinaram as faixas apresentadas na TABELA 9 juntamente com as AA% correspondentes à cada concentração.

TABELA 8. TRIAGEM PARA DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE TRABALHO DE CADA OE PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Óleo Essencial	AA% + DP referente à concentração de 12,5µL/mL
Alecrim	7,99 ± 1,20
Anis	1,36 ± 0,21
Canela	95,76 ± 0,06
Cravo	95,06 ± 0,06
Manjeriçã	6,30 ± 0,66
Menta	28,25 ± 1,44
Orégano	91,18 ± 0,21
Sálvia	2,69 ± 0,69
Tomilho	90,42 ± 0,70
BHT	0,35 ± 0,01

LEGENDA: AA: Atividade Antioxidante.

NOTA: Os resultados consistem de média + desvio padrão (DP) de medidas em triplicata.

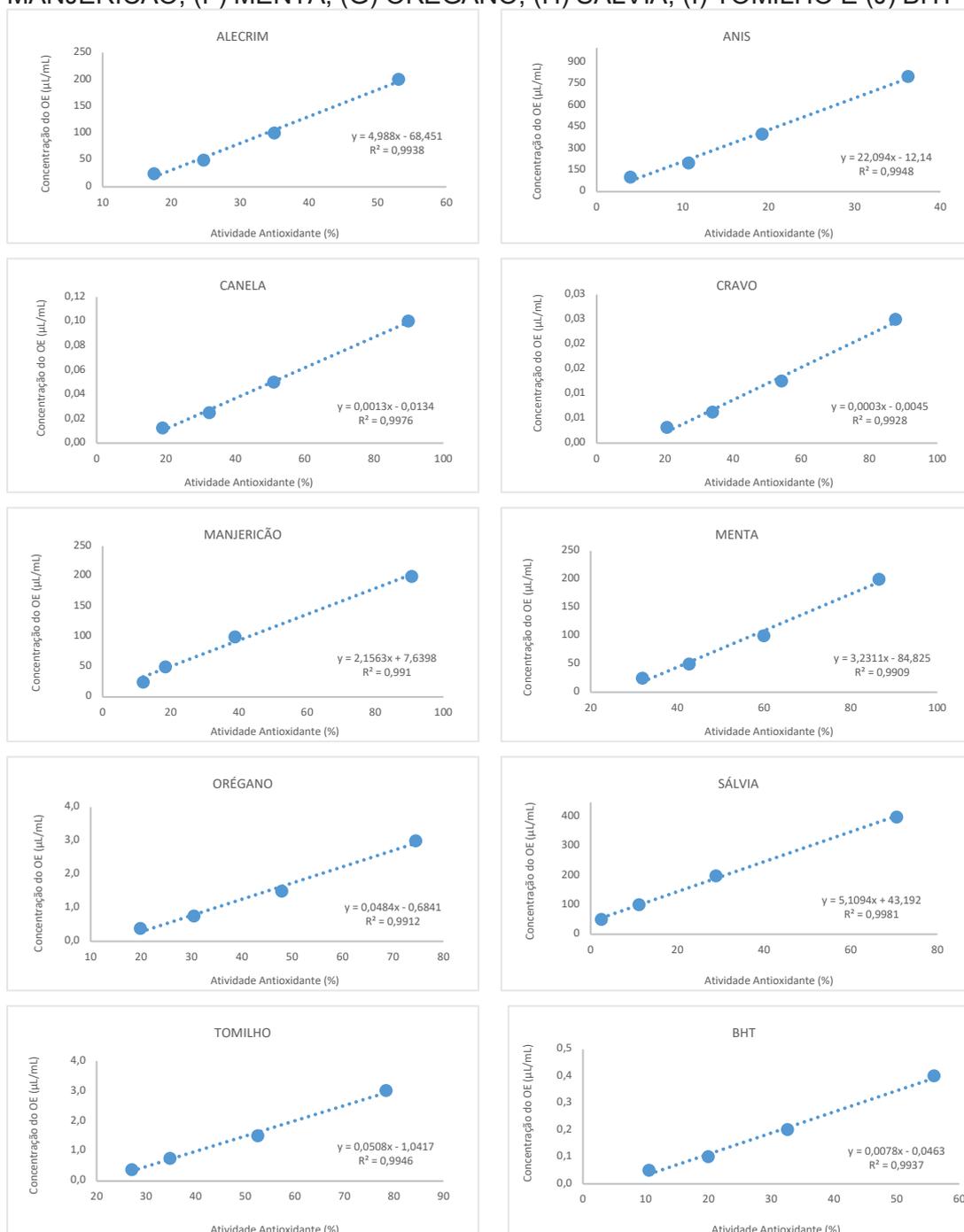
TABELA 9. RESULTADOS DE AA(%) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CADA OE

ÓLEO ESSENCIAL	CONCENTRAÇÃO (µL/mL)	AA% + DP
Alecrim	200,00	53,06 ± 0,39
	100,00	34,95 ± 0,95
	50,00	24,65 ± 0,07
	25,00	17,42 ± 0,21
Anis	800,00	36,26 ± 0,21
	400,00	19,25 ± 0,33
	200,00	10,66 ± 0,56
	100,00	3,92 ± 0,79
Canela	0,100	89,86 ± 0,10
	0,050	51,00 ± 0,53
	0,025	32,44 ± 0,47
	0,013	18,93 ± 0,52
Cravo	0,025	87,75 ± 0,22
	0,013	54,22 ± 0,26
	0,006	33,95 ± 0,42
	0,003	20,55 ± 0,54
Manjeriçao	200,000	90,68 ± 0,22
	100,000	38,84 ± 0,63
	50,000	18,32 ± 0,59
	25,000	11,89 ± 0,28
Menta	200,000	86,54 ± 0,32
	100,000	59,97 ± 0,33
	50,000	42,70 ± 0,33
	25,000	31,87 ± 0,15
Orégano	3,000	74,48 ± 0,65
	1,500	47,91 ± 0,34
	0,750	30,43 ± 0,26
	0,375	19,85 ± 0,48
Sálvia	400,000	70,55 ± 0,14
	200,000	28,86 ± 0,39
	100,000	11,08 ± 0,40
	50,000	2,49 ± 0,33
Tomilho	3,000	78,40 ± 0,49
	1,500	52,52 ± 0,49
	0,750	34,79 ± 0,89
	0,375	27,04 ± 0,20
BHT	0,400	55,95 ± 0,64
	0,200	32,68 ± 0,07
	0,100	20,01 ± 0,14
	0,050	10,53 ± 0,29

NOTA: Os resultados representados média + desvio padrão (DP) de medidas em triplicata.

Para o cálculo das IC₅₀ (concentração capaz de inibir o DPPH em 50%), foram utilizadas as curvas de calibração construídas a partir dos dados de concentração de OE ou BHT *versus* AA% apresentadas na TABELA 9. Foram construídas curvas de calibração para cada replicata realizada, sendo obtidos valores de IC₅₀ para cada uma delas a partir da equação da reta obtidas. Os GRÁFICOS 1A a 1J apresentam as curvas de calibração médias obtidas e a TABELA 11 apresenta as IC₅₀ obtidas.

GRÁFICO 1A A 1J . CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA DE MEDIDAS EM TRIPLICATA PARA OE DE (A) ALECRIM, (B) ANIS, (C) CANELA, (D) CRAVO, (E) MANJERICÃO, (F) MENTA, (G) ORÉGANO, (H) SÁLVIA, (I) TOMILHO E (J) BHT



A partir dos resultados apresentados na TABELA 10, pode ser evidenciado que OEs de cravo e canela apresentam as maiores IC₅₀ dentre os OEs estudados, equivalentes ao BHT. Os OEs de tomilho e orégano também apresentam alta atividade antioxidante e estatisticamente equivalentes ao BHT. Menta, manjeriço, alecrim e sálvia apresentam IC₅₀ estatisticamente inferiores ao BHT.

TABELA 10. EQUAÇÃO DA RETA MÉDIA E IC₅₀ CALCULADA DE CADA OE PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR MÉTODO DE DDPH

AMOSTRA	Equações da reta média	R ² Médio	IC ₅₀ (µL/mL)
Cravo	$y = 0,0003x - 0,0045$	0,9928	0,01 ± 0,00 (a)
Canela	$y = 0,0010x - 0,0134$	0,9976	0,05 ± 0,00 (a)
BHT	$y = 0,0078x - 0,0463$	0,9937	0,35 ± 0,01 (a)
Tomilho	$y = 0,0508x - 1,0417$	0,9946	1,49 ± 0,01 (a)
Orégano	$y = 0,0484x - 0,6841$	0,9912	1,74 ± 0,00 (a)
Menta	$y = 3,2311x - 84,825$	0,9909	75,71 ± 1,78 (b)
Manjeriço	$y = 2,1563x + 7,6398$	0,9910	115,42 ± 0,11 (c)
Alecrim	$y = 4,9880x - 68,451$	0,9938	180,52 ± 2,29 (d)
Sálvia	$y = 5,1094x + 43,192$	0,9981	296,92 ± 1,63 (e)
Anis	$y = 22,0940x - 12,14$	0,9948	>800,00 (f)

NOTA: Resultados a média + desvio padrão de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA e teste de probabilidade Tukey (p<0,0001).

Estes resultados confirmam os dados apresentados por EMBUSCADO (2015) que relata a importância de ervas e especiarias como uma das melhores fontes de antioxidantes naturais. Os compostos presentes em ervas e especiarias que conferem poder antioxidante atuam, em sua grande maioria, sequestrando os radicais livres formados no início do processo de oxidação e compreendem compostos fenólicos, em sua maioria flavonóides.

O alto poder antioxidante do cravo descrito por GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN (2012) foi confirmado, bem como o descrito por TEIXEIRA et al. (2013), que coloca o cravo um dos mais potentes antioxidantes, em paridade com antioxidantes sintéticos como BHT. A IC₅₀ encontrada por TEIXEIRA et al. para o cravo (0,04µL/mL) é próxima a encontrada neste estudo (0,01µL/mL). O poder antioxidante do cravo deve-se a grande presença de eugenol em sua composição. TEIXEIRA et al. (2013), assim com o presente estudo, também identificou os OEs de orégano e o tomilho como excelentes antioxidantes.

O OE de canela também demonstrou um alto poder antioxidante ($IC_{50} = 0,05 \pm 0,00 \mu\text{L/mL}$), assim como o demonstrado por (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017) que encontrou um IC_{50} de $0,14 \pm 0,00 \text{ mg/mL}$ para o *Cinnamomum zeylanicum*. Já para o alecrim, o mesmo autor encontrou um IC_{50} de $38,5 \pm 0,51 \text{ mg/mL}$ enquanto, substancialmente inferior ao encontrado neste trabalho. O OE de manjeriço também apresentou IC_{50} divergente do encontrado na literatura: $115,42 \pm 0,11 \mu\text{L/mL}$, enquanto que para HUSSAIN et al. (2008) este valor foi de $6,7 \pm 0,1 \text{ mg/mL}$ no verão. Estas diferenças podem ser justificadas em função das prováveis diferentes origens dos OEs, uma vez que diversos estudos abordam variações nas propriedades biológicas de OEs em função de região de cultivo (clima, solo, etc...).

O OE de menta apresentou atividade baixa quando comparada aos melhores OEs avaliados neste trabalho e está em linha com o observado por BRAHMI et al. (2016) quando classificou sua atividade como moderada.

WANG et al. (2011a) avaliou extrato de anis em etil acetado e pode observar atividade antioxidante comparável ao BHT, mas somente em concentrações comparativamente maiores. Neste trabalho, a IC_{50} do OE de anis não pode ser determinada uma vez que, mesmo em altas concentrações ($800 \mu\text{L/mL}$), a AA% é baixa ($36,26\% \pm 0,21$). Não foram encontradas outras referências para medições de AA em OE de anis.

O BHT, por ser o antioxidante de escolha em fármacos, cosméticos e alimentos, é comumente utilizado como referência em ensaios de atividade antioxidante. Foi observado que o valor de IC_{50} obtidos no presente estudo ($0,35 \pm 0,01 \mu\text{L/mL}$), estão de acordo com o obtido por diversos autores em mg/mL : $0,71 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$ (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017), $0,39 \pm 0,04 \text{ mg/mL}$ (CHEN et al., 2014) e $0,9 \pm 0,04 \text{ g/L}$ (POLITEO; JUKIC; MILOS, 2007).

5.2. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Assim como na avaliação de DPPH, a atividade antimicrobiana também foi avaliada através da IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em 50%). Para tanto, foi utilizando o método de microdiluição em caldo descrito anteriormente e exemplificado na FIGURA 9 por uma das análises realizadas.

FIGURA 9. EXEMPLO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

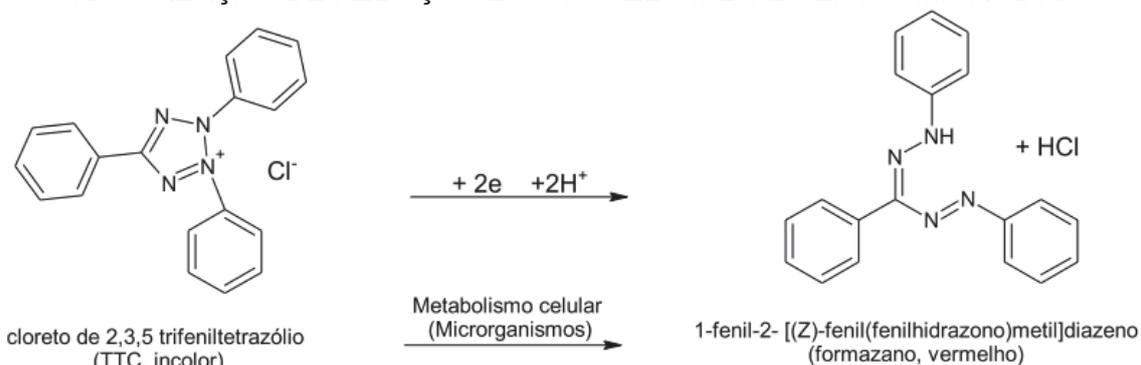


LEGENDA: B1: branco anis; B2: branco canela; B3: branco cravo; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

NOTA: A placa apresenta os ensaios de microdiluição em placa dos OEs de anis, canela e cravo para *Escherichia coli* em triplicata, sendo que as concentrações iniciais (primeiro poço) são, respectivamente, 250,0µL/mL, 1,0µL/mL e 1,0µL/mL. A presença de coloração avermelhada indica presença de crescimento microbiano e que a concentração anterior é a mínima a apresentar atividade antimicrobiana.

O método de microdiluição em caldo é comumente utilizado para a avaliação do potencial antimicrobiano de OEs pois é capaz de determinar sua concentração mínima inibitória (MIC), ou seja, a concentração mínima capaz de inibir o crescimento microbiano (PRAKASH et al., 2012; SACCHETTI et al., 2005). O cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) foi utilizado como indicador da viabilidade celular, pois ao ser reduzido pelo metabolismo dos microrganismos, torna-se um formazano com coloração rósea a avermelhado, conforme reação abaixo, sendo possível (VEIGA, 2016).

FIGURA 9. REAÇÃO DE REDUÇÃO DO TTC PELO METABOLISMO MICROBIANO



FONTE: VEIGA (2016).

As faixas de concentração ideais a serem trabalhadas foram determinadas através de uma triagem em que todos os OEs foram analisados na concentração de 500,0µL/mL. Para os OEs que não apresentaram crescimento em nenhuma das concentrações da diluição seriada, foram realizadas novas análises com concentração de 2,0µL/mL. Para o OE de anis, que apresentou crescimento em todas as concentrações da diluição seriada, foram realizadas novas análises com o OE puro. Para o metilparabeno a concentração ideal a ser trabalhada foi determinada em função da literatura. Foi considerada uma solução a 4,0µL/mL para que a concentração no primeiro poço fosse de 2,0µL/mL, ou seja, a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de todos os microorganismos em estudo (CLARIANT, 2017).

A TABELA 11 apresenta as concentrações de trabalho determinados pelos ensaios de triagem.

TABELA 11. CONCENTRAÇÃO DOS OES E MP A SEREM TRABALHADAS

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Alecrim	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL
Anis	Puro	Puro	Puro	Puro
Cravo	2,0µL/mL	2,0µL/mL	2,0µL/mL	4,0µL/mL
Canela	2,0µL/mL	2,0µL/mL	2,0µL/mL	4,0µL/mL
Manjeriçao	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL
Menta	2,0µL/mL	2,0µL/mL	500,0µL/mL	4,0µL/mL
Orégano	1,0µL/mL	1,0µL/mL	1,0µL/mL	2,0µL/mL
Sálvia	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL	500,0µL/mL
Tomilho	2,0µL/mL	2,0µL/mL	2,0µL/mL	4,0µL/mL
Metilparabeno	4,0µL/mL	4,0µL/mL	4,0µL/mL	4,0µL/mL

NOTA: determinadas a partir da triagem para cada microorganismo nos ensaios de microdiluição em caldo para determinação da atividade antimicrobiana.

A partir dos resultados de concentração de OE (e metilparabeno) *versus* LogUFC/mL encontrados no método de microdiluição em caldo, foram construídas curvas de calibração para cada replicata realizada, sendo calculados valores de IC₅₀ para cada uma delas a partir da equação da reta obtida. Os GRÁFICOS 2 a 11 a seguir apresentam as curvas de calibração médias resultantes para cada OE (e metilparabeno) e microorganismo.

GRÁFICO 2A A 2D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ALECRIM PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

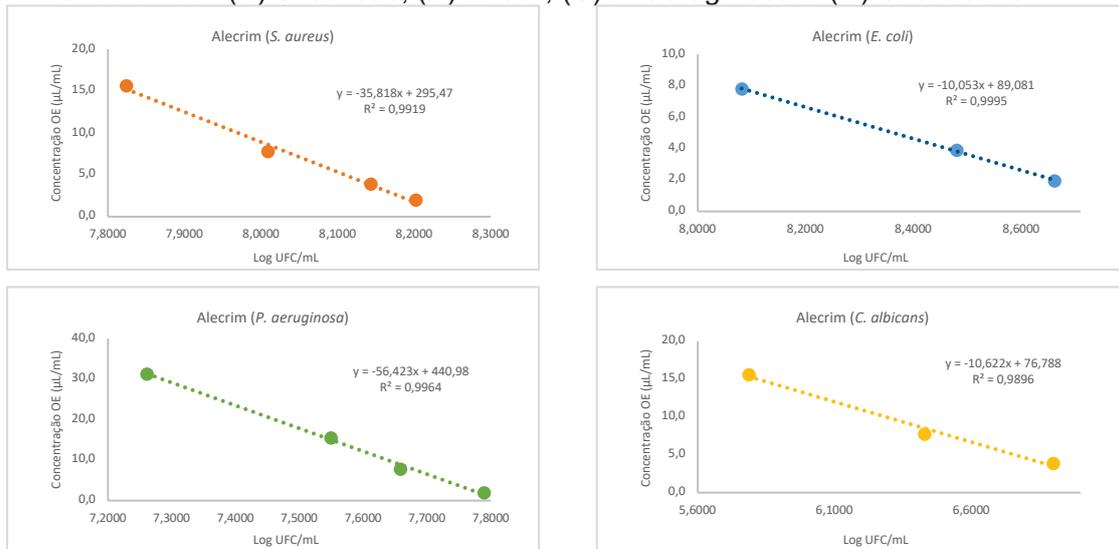
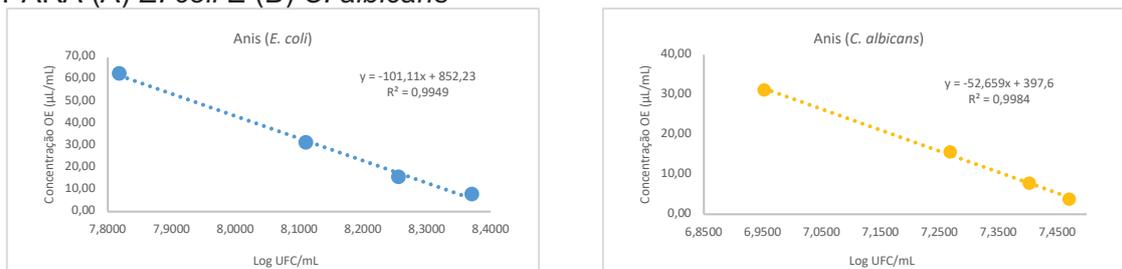


GRÁFICO 3A E 3B. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ANIS PARA (A) *E. coli* E (B) *C. albicans*



NOTA: para *S. aureus* e *P. aeruginosa* não foi possível construir curva de calibração pois houve crescimento microbiano em todos os pontos

GRÁFICO 4A A 4D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE CANELA PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

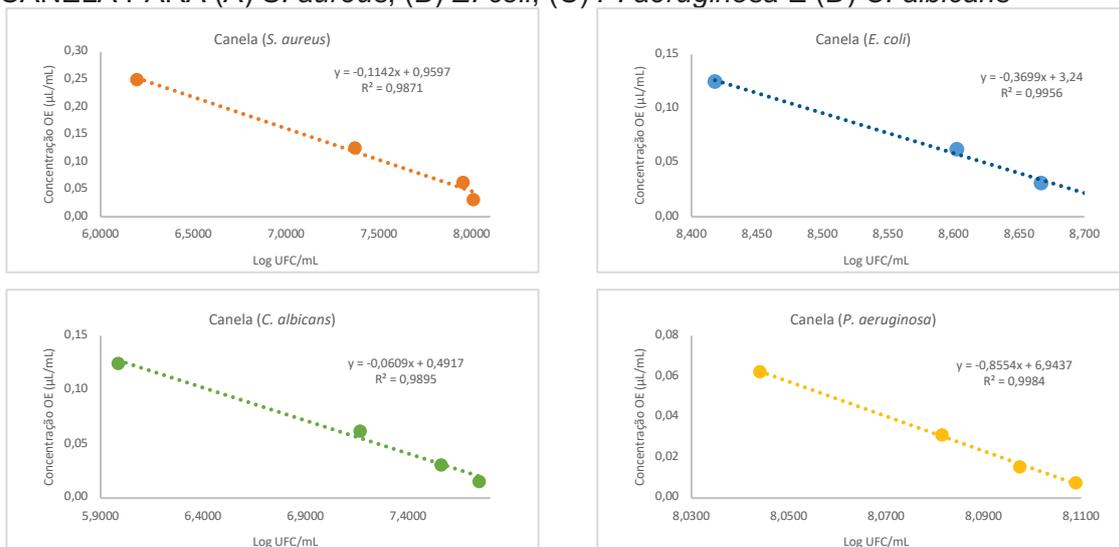


GRÁFICO 5A A 5D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE CRAVO PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

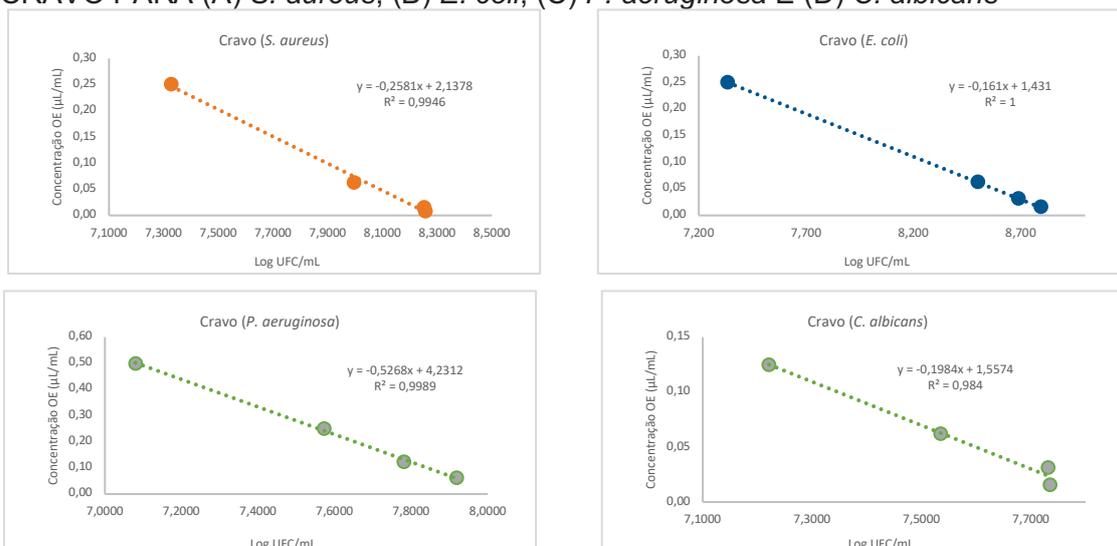


GRÁFICO 6A A 6D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE MANJERICÃO PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

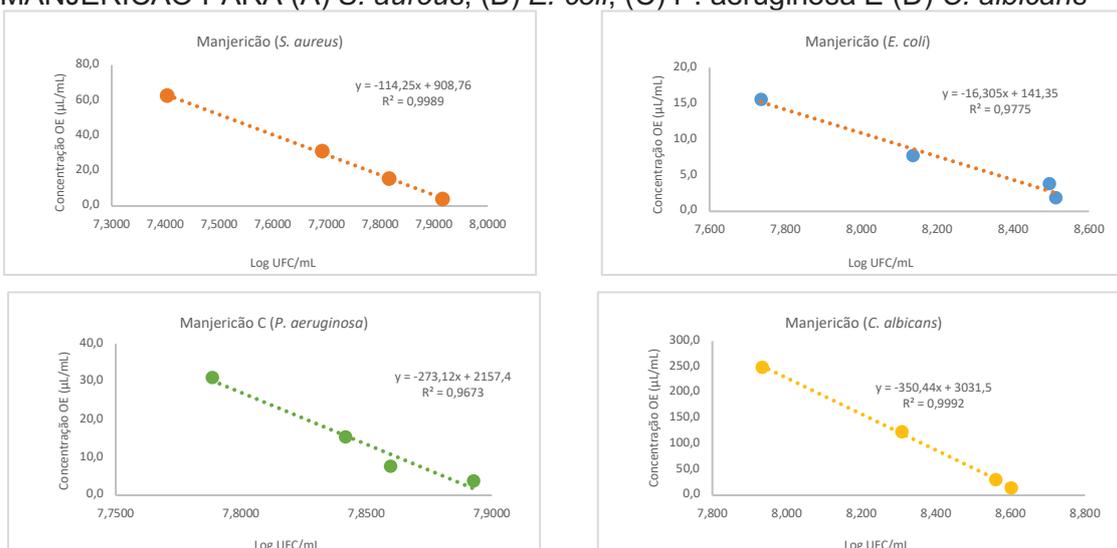


GRÁFICO 7A A 7D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE MENTA PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

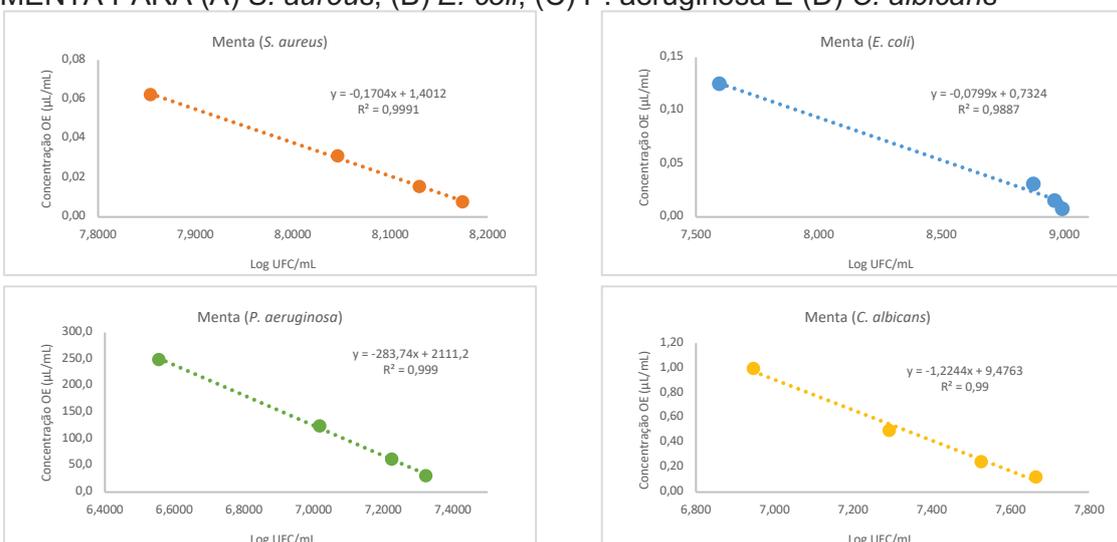


GRÁFICO 8A A 8D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE ORÉGANO PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

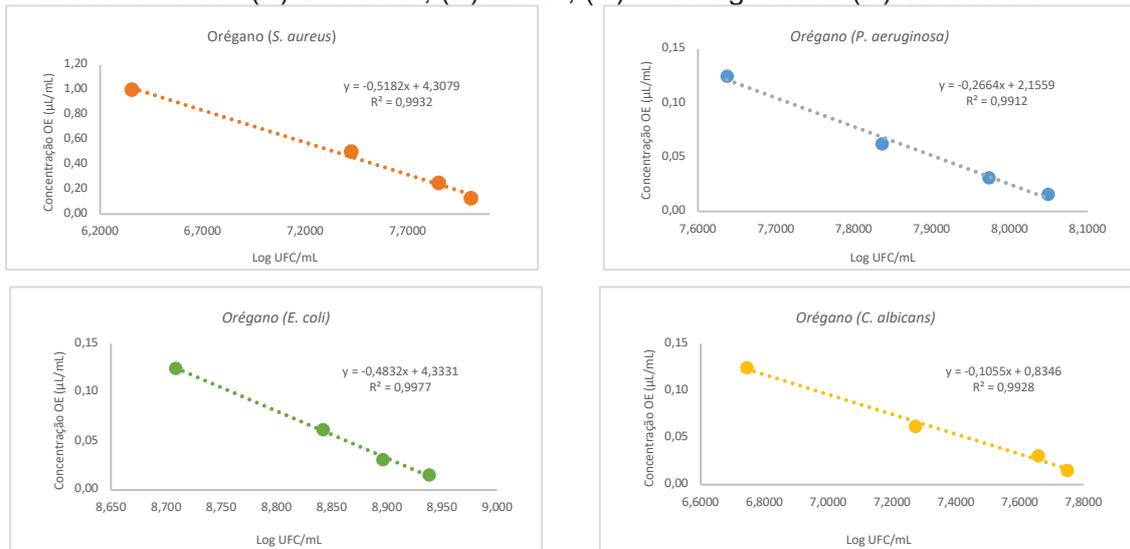


GRÁFICO 9A A 9D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE SÁLVIA PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

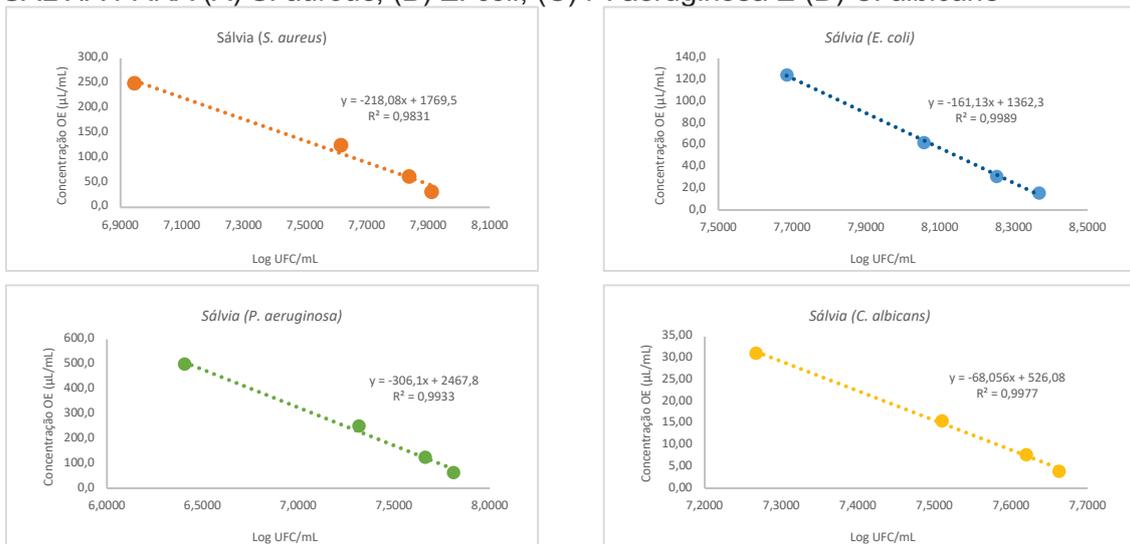


GRÁFICO 10A A 10D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO OE DE TOMILHO PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

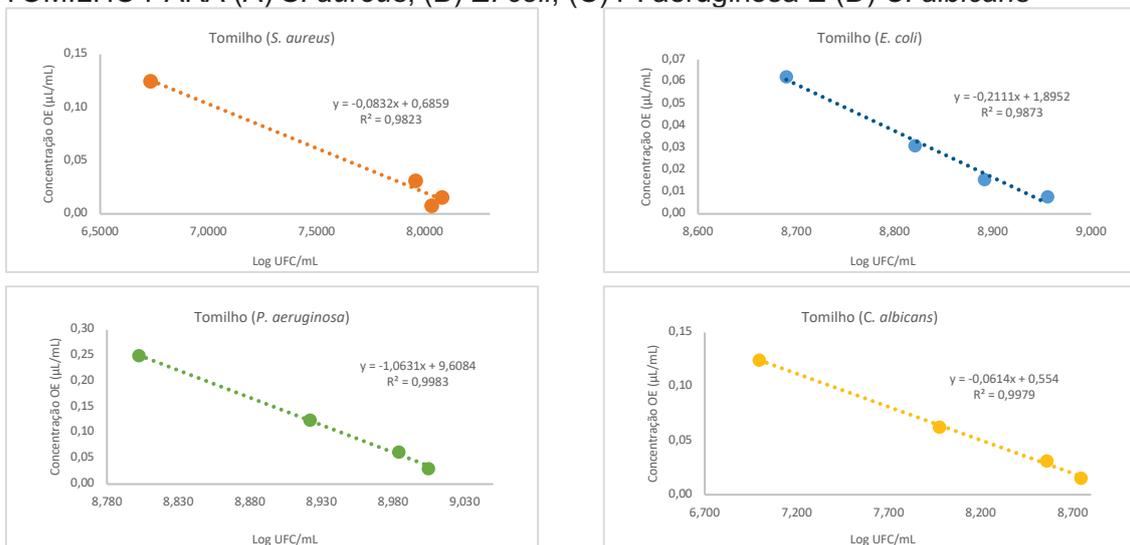
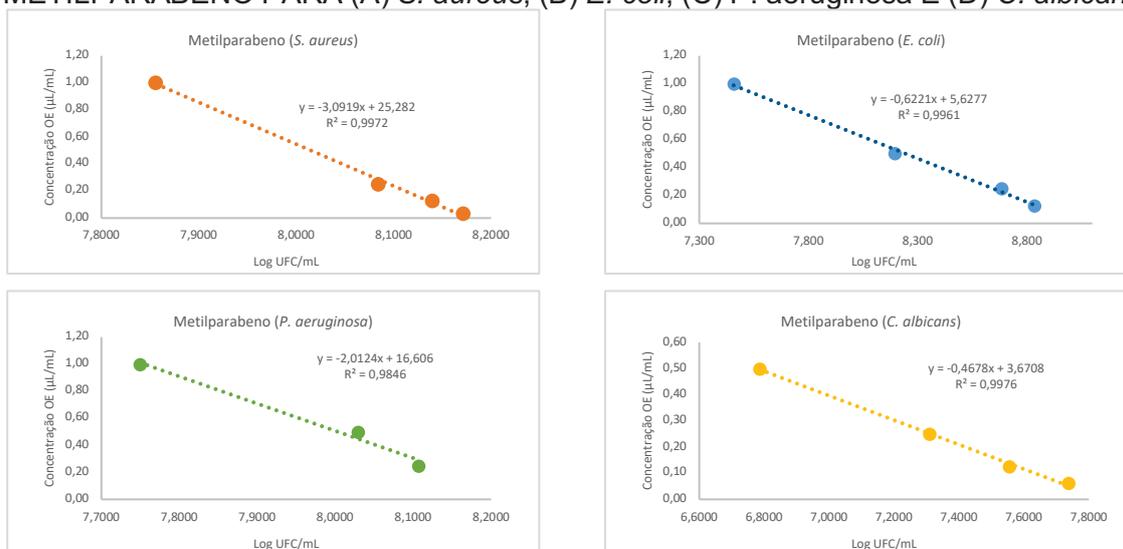


GRÁFICO 11A A 11D. CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DO METILPARABENO PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*



As TABELAS 12, 13, 14 e 15 apresentam as IC₅₀ de cada OE para os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, respectivamente, bem como as respectivas equações da reta média.

Podemos observar que para o microorganismo *S. aureus* os OEs de tomilho, canela, menta, cravo e orégano apresentam atividade antimicrobiana equivalentes ao metilparabeno de acordo com análise estatística. Para *E. coli* somente sálvia e anis não são equivalentes ao metilparabeno. Para *P. aeruginosa* não são equivalentes ao metilparabeno manjerição, sálvia e menta e para *C. albicans* alecrim, anis, sálvia e manjerição.

TABELA 12. IC₅₀ DE CADA OE E METILPARABENO PARA *S. aureus*

Microorganismo	Amostra	Equação da Reta Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tomilho	$y = -0,0832x + 0,6859$	0,9823	0,04 ± 0,01 (a)
	Canela	$y = -0,1142x + 0,9597$	0,9871	0,05 ± 0,01 (a)
	Menta	$y = -0,1704x + 1,4012$	0,9991	0,08 ± 0,01 (a)
	Cravo	$y = -0,2581x + 2,1378$	0,9946	0,08 ± 0,03 (a)
	Orégano	$y = -0,5182x + 4,3079$	0,9932	0,31 ± 0,03 (a)
	Metilparabeno	$y = -3,0919x + 25,282$	0,9972	1,22 ± 0,38 (a)
	Alecrim	$y = -35,818x + 295,47$	0,9919	14,76 ± 1,74 (b)
	Manjerição	$y = -114,25x + 908,76$	0,9989	17,31 ± 4,35 (b)
	Sálvia	$y = -218,08x + 1769,5$	0,9831	74,15 ± 6,48 (c)

NOTA: Resultados expressos por média e desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA com teste de probabilidade Tukey (p<0,0001).

TABELA 13. IC₅₀ DE CADA OE E METILPARABENO PARA *E. coli*

Microorganismo	Amostra	Equação da Retra Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>Escherichia coli</i>	Menta	$y = -0,0799x + 0,7324$	0,9887	0,06 ± 0,01 (a)
	Cravo	$y = -0,161x + 1,431$	1,0000	0,08 ± 0,00 (a)
	Canela	$y = -0,3699x + 3,24$	0,9956	0,10 ± 0,00 (a)
	Tomilho	$y = -0,2111x + 1,8952$	0,9873	0,10 ± 0,01 (a)
	Orégano	$y = -0,4832x + 4,3331$	0,9977	0,22 ± 0,01 (a)
	Metilparabeno	$y = -0,6221x + 5,6277$	0,996	0,31 ± 0,01 (a)
	Manjeriçao	$y = -16,305x + 141,35$	0,9775	2,66 ± 0,64 (a)
	Alecrim	$y = -10,053x + 89,081$	0,9995	3,17 ± 0,88 (a)
	Sálvia	$y = -161,13x + 1362,3$	0,9989	28,84 ± 7,66 (b)
Anis	$y = -101,11x + 852,23$	0,9949	38,79 ± 2,00 (c)	

NOTA: Resultados expressos por média e desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA com teste de probabilidade Tukey (p<0,0001).

TABELA 14. IC₅₀ DE CADA OE E MEILPARABENO PARA *P. aeruginosa*

Microorganismo	Amostra	Equação da Retra Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Orégano	$y = -0,2664x + 2,1559$	0,9912	0,16 ± 0,00 (a)
	Cravo	$y = -0,5268x + 4,2312$	0,9989	0,25 ± 0,09 (a)
	Tomilho	$y = -1,0631x + 9,6084$	0,9983	0,28 ± 0,00 (a)
	Canela	$y = -0,8554x + 6,9437$	0,9984	0,38 ± 0,23 (a)
	Metilparabeno	$y = -2,0124x + 16,606$	0,9846	1,08 ± 0,01 (a)
	Alecrim	$y = -56,423x + 440,98$	0,9964	10,85 ± 2,39 (a)
	Manjeriçao	$y = -273,12x + 2157,4$	0,9673	79,37 ± 1,18 (b)
	Sálvia	$y = -306,1x + 2467,8$	0,9933	138,05 ± 5,28 (c)
	Menta	$y = -283,74x + 2111,2$	0,9990	182,47 ± 22,03 (d)

NOTA: Resultados expressos por média e desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA com teste de probabilidade Tukey (p<0,0001).

TABELA 15. IC₅₀ CALCULADA DE CADA OE E METLPARABENO PARA *C. albicans*

Microorganismo	Amostra	Equação da Retra Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>Candida albicans</i>	Tomilho	$y = -0,0614x + 0,5540$	0,9979	0,07 ± 0,02 (a)
	Canela	$y = -0,0609x + 0,4917$	0,9895	0,09 ± 0,02 (a)
	Orégano	$y = -0,1055x + 0,8346$	0,9928	0,12 ± 0,02 (a)
	Metilparabeno	$y = -0,4678x + 3,6708$	0,9976	0,21 ± 0,03 (a)
	Cravo	$y = -0,1984x + 1,5574$	0,9840	0,26 ± 0,07 (a)
	Menta	$y = -1,2244x + 9,4763$	0,9900	1,50 ± 0,31 (a)
	Alecrim	$y = -10,622x + 76,788$	0,9896	15,49 ± 1,39 (b)
	Anis	$y = -52,659x + 397,60$	0,9984	19,98 ± 4,04 (b)
	Sálvia	$y = -68,056x + 526,08$	0,9977	45,54 ± 5,20 (c)
	Manjeriçao	$y = -350,44x + 3031,5$	0,9992	193,59 ± 3,52 (c)

NOTA: Resultados expressos por média e desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA com teste de probabilidade Tukey (p<0,0001).

Desta maneira, de uma forma geral, os OEs mais indicados para compor os *blends* em relação à sua atividade antimicrobiana são cravo, canela, manjeriço, menta e orégano.

Segundo RAUT; KARUPPAYIL (2014), comparada com outras bactérias, *P. aeruginosa* apresenta tolerância para inibição por OE. Isto se confirma neste estudo quando observamos que a IC₅₀ dos OEs e metilparabeno foi maior para *P. aeruginosa* que para os demais microorganismos. Ainda assim, a atividade antimicrobiana da maioria dos OEs é equivalente ao metilparabeno, o que ainda configura uma atividade relevante para o uso como conservante cosmético.

O alto potencial antimicrobiano encontrado para o OE de canela está de acordo com o observado por ZHANG et al. (2015) que relatou um valor de MIC de 1,0mg/mL para *Staphylococcus* e *E. coli* e concluiu que o mecanismo de ação do OE se dá em decorrência da perda de eletrólitos nas bactérias causada pelo seu maior componente, o aldeído cinâmico.

O OE de cravo mostrou alta atividade antimicrobiana contra todos os microorganismos testados, mas principalmente contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. AJIBOYE et al. (2016) também encontrou valores de MIC baixos, em torno de 0,10 mg/mL, contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para extrato aquoso de cravo.

O OE de tomilho apresentou a maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *C. albicans* dentre os OEs estudados. Seu poder antimicrobiano é amplamente relatado na literatura (AL-BAYATI, 2008; BAKKALI et al., 2008; ROTA et al., 2008; SACCHETTI et al., 2005).

Assim como neste trabalho, o alto poder antimicrobiano do orégano, menta e alecrim também foi observado MARTUCCI et al. (2015), BRAHMI et al. (2016) e ZAOUALI; BOUZAINÉ; BOUSSAID (2010), respectivamente.

5.3. AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

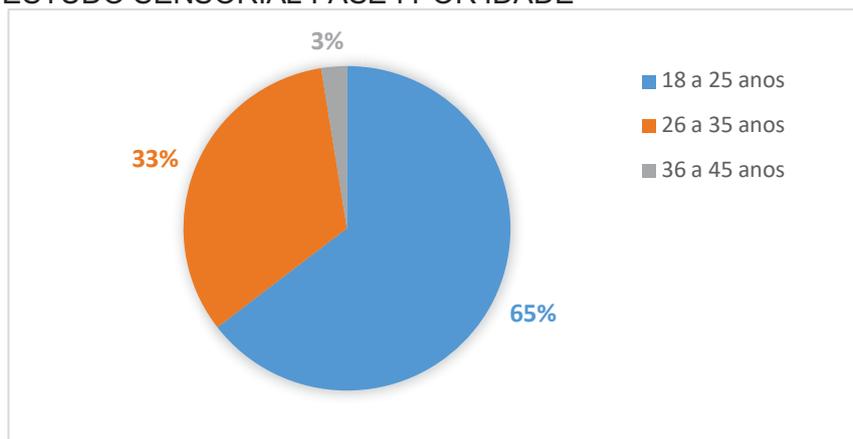
A Fase I do estudo sensorial avaliou a aceitação dos OEs individualmente a fim de identificar os de maior aceitação pelo consumidor. A TABELA 16 mostra as perguntas realizadas e escalas utilizadas na Fase I.

TABELA 16. PERGUNTAS E ESCALAS PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL FASE I

Pergunta	Escala
Avalie o quanto você gosta de cada um dos cheiros.	Escala categórica 7 pontos (desgosto muito a gosto muito)
Como você descreve cada cheiro?	CATA - 16 descritores

Participaram do estudo 76 consumidores na Fase I sendo que, a grande maioria dos participantes (65%) apresentou a faixa etária entre 18 e 25 anos (GRÁFICO 12) e 87% eram mulheres. Este perfil de público é adequado para o objetivo do estudo, por se tratar de uma parcela importante dos consumidores de cosméticos.

GRÁFICO 12. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO SENSORIAL FASE I POR IDADE



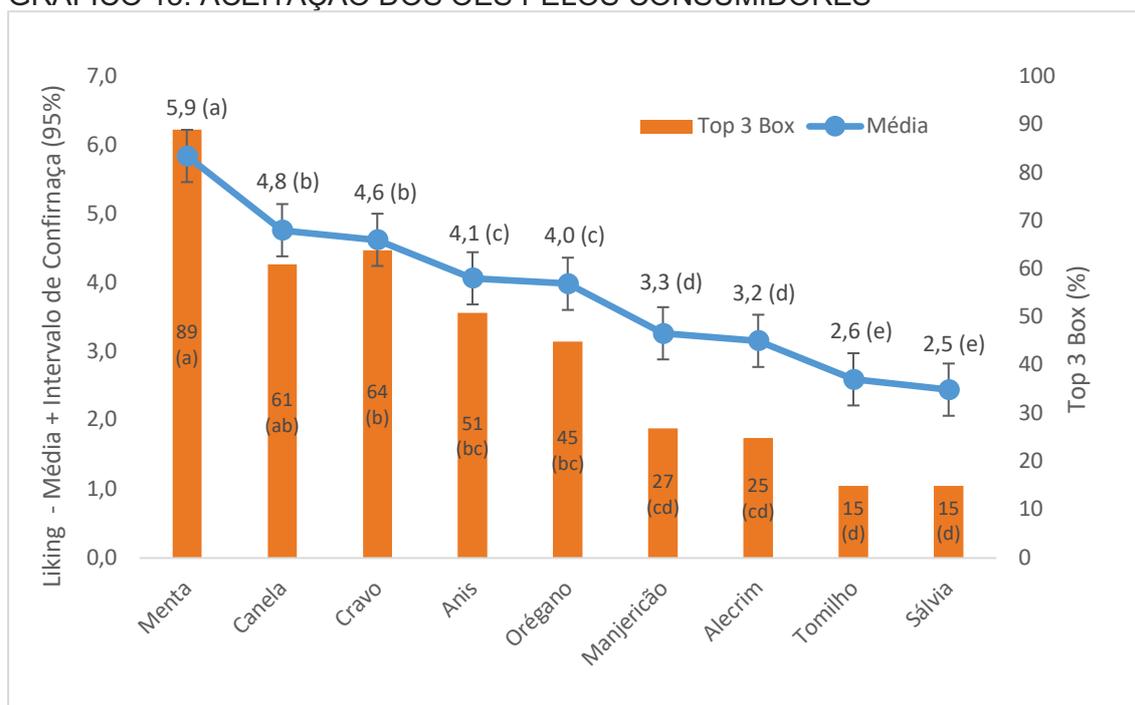
O GRÁFICO 13 apresenta dois dados coletados através da pontuação da agradabilidade (*liking*) na escala hedônica de 7 pontos para os OES. No eixo esquerdo é apresentada a média de *liking* e no eixo direito a proporção de respostas pela soma das categorias positivas “gosto”, “gosto um pouco” e “gosto muito”, também chamada de Top 3 Box. Podemos observar que o OE de maior aceitação no público estudado é OE de menta com 89% de Top 3 Box e média de 5,9. Em seguida os OEs de canela e cravo aparecem em segundo lugar com 4,8 e 4,6 de *liking*, respectivamente.

Os OEs de anis e orégano vem em seguida com 4,1 e 4,0 de *liking*, respectivamente, e encontram-se numa posição intermediária em relação ao

conjunto de OEs avaliados. Os OEs de manjeriço e alecrim, com somente 27% e 25% de Top 3 Box, respectivamente, só não foram piores avaliados que tomilho e sálvia que aparecem em último lugar com média de 2,6 e 2,5, respectivamente, e Top 3 Box de 15%.

Em função somente destes resultados, poderíamos considerar que os OEs de manjeriço, alecrim, tomilho e sálvia seriam os menos adequados para compor os *blends* em função de sua baixa agradabilidade.

GRÁFICO 13. ACEITAÇÃO DOS OES PELOS CONSUMIDORES



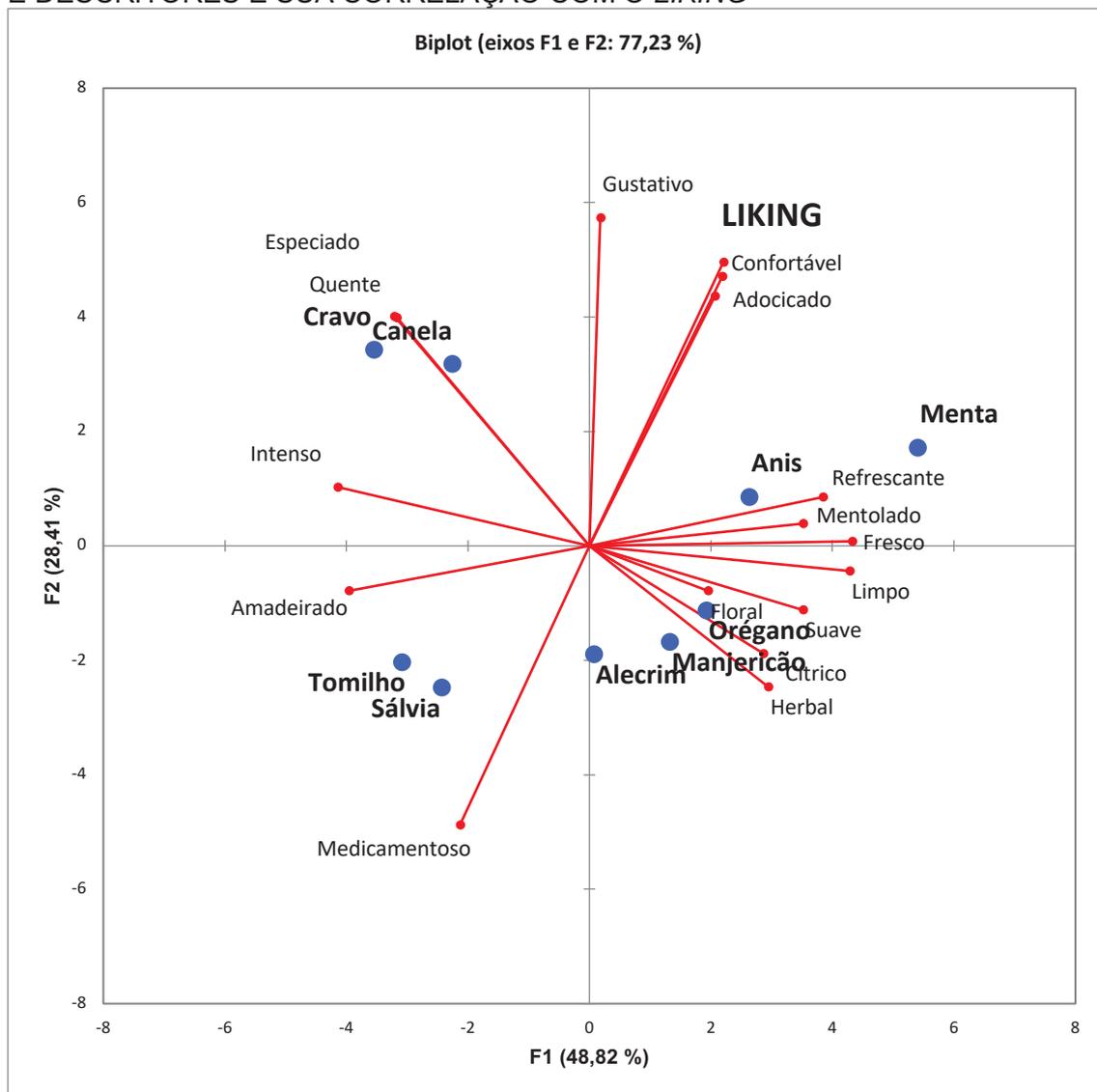
NOTA: Média e intervalo de confiança de *liking* na escala de 7 pontos (eixo esquerdo) e proporção de respostas em top 3 box (eixo direito). Amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% de confiança ($p < 0,0001$).

O GRÁFICO 14 nos ajuda a entender as aceitações e rejeições encontradas. A Análise do Componente Principal (ACP) mostra os atributos descritivos mais associados com cada OE e com o *liking*. Podemos observar que os OE mais próximos da região de *liking* (menta, cravo, canela e anis) estão fortemente relacionados com os atributos limpo, refrescante, mentolado, gustativo, confortável, adocicado, quente e especiado.

Já os OEs de sálvia e tomilho são rejeitados por serem amadeirados e medicamentosos. Orégano, manjeriço e alecrim estão associados com floral, suave, cítrico e herbal. É importante ressaltar que o ACP construídos em duas

dimensões foi capaz de explicar 77,23% das correlações existentes, sendo que os outros 22,77% poderiam ser explicados em uma terceira dimensão. Apesar disto, esta porcentagem, já pode ser considerado adequada para uma análise robusta dos dados (DUTCOSKY, 2013).

GRÁFICO 14. ACP REPRESENTANDO AS AFINIDADES EXISTENTES ENTRE OES E DESCRITORES E SUA CORRELAÇÃO COM O *LIKING*



NOTA: Quanto mais próxima uma amostra se encontra de um descritor, maior a relação entre eles e quanto mais próxima do posicionamento de *liking* a amostra se encontra, maior sua agradabilidade (DUTCOSKY, 2013).

5.4. DESENVOLVIMENTO DOS *BLENDS*

A construção dos *blends* levou em conta os resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana e sensorial dos óleos individuais que foram discutidos e apresentados nos itens anteriores.

De forma geral, foram priorizados os OEs que apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana iguais ou superiores às referências (BHT e metilparabeno) e/ou agradabilidade em Top 3 Box superior a 40%, resultados sombreados na TABELA 17 que resume o racional utilizado.

TABELA 17. RESUMO DOS DADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E *LIKING* PARA CADA OE

AMOSTRA	DPPH IC ₅₀ (μL/mL)	<i>S.</i> <i>aureus</i> IC ₅₀ (μL/mL)	<i>E.</i> <i>coli</i> IC ₅₀ (μL/mL)	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> IC ₅₀ (μL/mL)	<i>C.</i> <i>albicans</i> IC ₅₀ (μL/mL)	Liking (%Top 3 Box)
Alecrim	180,52	14,76	3,17	10,85	15,49	15
Anis	>800,00	-	3,79	-	19,98	49
Canela	0,05	0,05	0,10	0,38	0,09	61
Cravo	0,01	0,08	0,08	0,25	0,26	64
Manjeriçã	115,42	17,31	2,66	79,37	193,59	26
Menta	75,71	0,08	0,06	182,47	1,50	88
Orégano	1,74	0,31	0,22	0,16	0,12	45
Sálvia	296,92	74,15	28,84	138,05	45,54	14
Tomilho	1,49	0,04	0,10	0,28	0,07	15
BHT	0,35	-	-	-	-	-
Metilparabeno	-	1,22	0,31	1,08	0,21	-

Conforme discutido anteriormente, os OEs com atividade antioxidante estatisticamente igual ou superior ao BHT são cravo, canela, tomilho e orégano.

O anis, além de não apresentar atividade antioxidante (>800,0μL/mL), possui baixa atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *C. albicans* e não possui nenhuma atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apesar disto, o anis apresenta boa aceitação por parte do consumidor (49%), e, contanto que não confira afeito antagonista nas atividades biológicas dos *blends*, pode contribuir positivamente para o hedônico da fragrância, sendo, portanto selecionado.

Além de alecrim, manjeriçã e sálvia apresentarem atividade antimicrobiana inferior ao metilparabeno para todos os microorganismos testados, também apresentam baixa agradabilidade (15%, 26% e 14%, respectivamente). Estes OEs, portanto, não foram considerados na construção dos *blends*.

Canela e cravo, além de apresentarem excelente atividade antioxidante e boa aceitação por parte do consumidor, apresentaram atividade antimicrobiana equivalente ou superior ao BHT contra todos os microorganismos testados. Estes OEs, portanto, foram selecionados com a construção dos *blends*.

Embora o tomilho tenha apresentado baixa aceitação pelo consumidor, decidiu-se mantê-lo na construção dos *blends* em baixa concentração, em função de sua excelente atividade antioxidante e antimicrobiana.

Uma vez selecionados os OEs anis, canela, cravo, menta, orégano e tomilho para a construção dos *blends*, partiu-se para análise de segurança das combinações, segundo Código de Práticas IFRA. Primeiramente, foram identificadas as moléculas com restrição presente em cada OE e sua respectiva concentração de acordo com o Anexo I para padrões IFRA atualizado para a Carta IFRA publicada em 2015 e em vigor no momento (*Annex I to the IFRA Standards - 48th Amendment*). A TABELA 18, demonstra estas concentrações e elas foram tomadas de base para o cálculo da quantidade de cada molécula nos blends construídos.

TABELA 18. CONCENTRAÇÃO (%) DAS MOLÉCULAS COM RESTRIÇÃO POR IFRA NOS OES ESTUDADOS

	1-Octen-3-yl acetate	Benzaldehyde	Benzyl benzoate	Cinnamic alcohol	Cinnamic aldehyde	Coumarin	Estragole	Eugenol	Geraniol	Isoeugenol	I-Carvone	Methyl eugenol	p-Methoxybenzaldehyde
Anis	-	-	-	-	-	-	3,30	-	-	-	-	-	0,20
Canela		0,26	0,66	0,26	75,00	0,66	-	2,20	-	0,02	-	-	-
Cravo	-	-	-	-	-	-	-	73,30	-	-	-	-	-
Menta	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67,00	-	-
Orégano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tomilho	-	-	-	-	-	-	-	0,10	0,10	-	-	0,03	-

FONTE: Adaptado de IFRA (2015).

Já a TABELA 19, apresenta a concentração máxima permitida de cada molécula no produto final, já considerando a concentração que a fragrância estará aplicada. Uma vez que os *blends* construídos se propõe a aplicação em creme corporal, foi considerada a Categoria de Produto 4 (cremes corporais, óleos, loções, cremes perfumados de todos os tipos, exceto cremes e loções para bebês) para a determinação dos limites (IFRA, 2015).

TABELA 19. LIMITES PARA MOLÉCULAS SUJEITAS À RESTRIÇÃO IFRA

Ingrediente	Razão	Limite* %
1-Octen-3-yl acetate	Sensibilização	0,300
Benzaldehyde	Sensibilização	0,270
Benzyl benzoate	Sensibilização	26,700
Cinnamic alcohol	Sensibilização	0,400
Cinnamic aldehyde	Sensibilização	0,050
Coumarin	Sensibilização	1,600
Estragole	Carcinogênico	0,010
Eugenol	Sensibilização	0,500
Geraniol	Sensibilização	5,300
Isoeugenol	Sensibilização	0,020
l-Carvone	Sensibilização	1,200
Methyl eugenol	Carcinogênico	0,004
p-Methoxybenzaldehyde	Sensibilização	1,610

FONTE: Adaptado de IFRA (2015).

NOTA: Limite permitido no produto final para cremes perfumados de uso corporal.

Com as informações das TABELAS 18 e 19 foram elaboradas diversas combinações dos 6 OEs. Podemos observar que aldeído cinâmico, eugenol e estragol são limitares importantes na construção, pois seus limites no produto final são baixos e sua presença nos OEs alta, principalmente para aldeído cinâmico e eugenol. Outro limitante importante é o baixo limiar de detecção olfativo do tomilho, por exemplo, fazendo com que mesmo com alto potencial biológico não pode ser usado em alta concentração por comprometer a aceitação hedônica do *blend*.

A TABELA 20 apresenta os 3 *blends* desenvolvidos com as respectivas porcentagens após inúmeras tentativas realizadas. Elas representam a melhor combinação entre potencial biológico, aceitação hedônica e restrição IFRA. As proporções de anis, canela, cravo e tomilho foram fixadas uma vez que as concentrações máximas permitidos são baixas (anis e canela) ou o odor não é

bem aceito (cravo e tomilho). Os *blends* se diferenciam nas proporções de orégano e menta, sendo o *Blend 2* apresenta maior proporção de menta, o *Blend 3* maior proporção de orégano e o *Blend 1* quantidades equivalentes dos dois OEs.

TABELA 20. CONCENTRAÇÕES DE CADA OES NOS *BLENDS* FINAIS

Óleo Essencial	Blend 1	Blend 2	Blend 3
Anis	15,0%	15%	15%
Canela	3,0%	3%	3%
Cravo	7,0%	7%	7%
Menta	32,5%	40%	25%
Orégano	32,5%	25%	40%
Tomilho	10,0%	10%	10%
TOTAL	100%	100%	100%

Considerando que a concentração de 2% foi aplicada no creme corporal, com objeto de atuar como sistema conservante e fragrância (KERDUDO et al., 2016), teremos as concentrações de cada molécula restrita por IFRA conforme mostra a TABELA 21. Podemos observar que para os 3 *blends* esta concentração é inferior ao limite máximo permitido.

TABELA 21. CONCENTRAÇÃO DAS MOLÉCULA RESTRITA POR IFRA NO PRODUTO FINAL

Molécula	Concentração na composição (%)			Limite permitido de cada molécula no produto final para Categoria 4* (%)
	Blend 1	Blend 2	Blend 3	
1-Octen-3-yl acetate	0,00039	0,00048	0,00030	0,30000
Benzaldehyde	0,00016	0,00016	0,00016	0,27000
Benzyl benzoate	0,00040	0,00040	0,00040	26,70000
Cinnamic alcohol	0,00016	0,00016	0,00016	0,40000
Cinnamic aldehyde	0,04500	0,04500	0,04500	0,05000
Coumarin	0,00040	0,00040	0,00040	1,60000
Estragole	0,00990	0,00990	0,00990	0,01000
Eugenol	0,10459	0,10444	0,10474	0,50000
Geraniol	0,00065	0,00050	0,00080	5,30000
Isoeugenol	0,00001	0,00001	0,00001	0,02000
l-Carvone	0,43550	0,53600	0,33500	1,20000
Methyl eugenol	0,00020	0,00015	0,00024	0,00400
p-Methoxybenzaldehyde	0,00060	0,00060	0,00060	1,61000

NOTA: A Categoria 4 refere-se a cremes perfumados.

5.5. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO NATURAL

Uma vez que se faz necessária a comprovação da segurança microbiológica nos produtos cosméticos finais (KERDUDO et al., 2016), foi desenvolvida uma emulsão natural para a condução do *Challenge Test*. Esta mesma formulação também foi utilizada na Fase II do Estudo Sensorial.

Emulsões são formas farmacêuticas constituídas por duas fases líquidas a princípio imiscíveis, aquosa e oleosa, mas estabilizadas pela presença de um tensoativo. As emulsões são chamadas de loção quando líquidas e cremes quando semi-sólidas (AULTON, 2005). Para tanto foram seguidas as orientações da Ecocert quanto à composição da emulsão para classificá-la como natural: pelo menos 95% dos ingredientes de origem natural sobre o total de ingredientes da formulação .

Inicialmente, a formulação foi idealizada apenas com álcool cetílico como tensoativo (Fórmulas 1 a 3), mas a consistência não se mostrou adequada para um creme corporal. A Fórmula 4, acrescida de olivato de sorbitano, apresentou a consistência ideal e foi então selecionada, conforme mostra a TABELA 22.

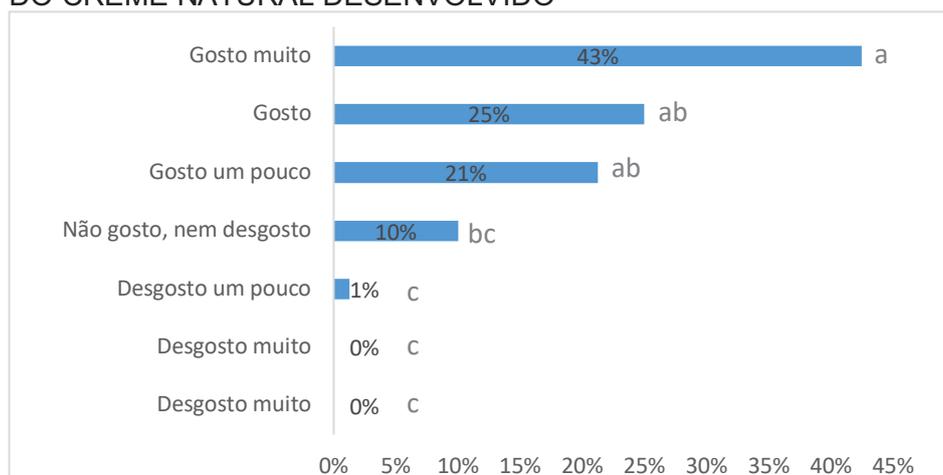
TABELA 22. FORMULAÇÕES PILOTADAS PARA EMULSÃO NATURAL

Função	Ingrediente	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4*
Fase Oleosa					
Emoliente	Óleo de semente de uva	12,00%	12,00%	8,00%	8,00%
Tensoativo	Álcool cetílico vegetal	5,00%	8,00%	3,00%	3,00%
Emulsificante	Olivato de sorbitano	-	-	-	3,00%
Fase Aquosa					
Umectante	Glicerina vegetal	5,00%	5,00%	4,00%	4,00%
**	Blend de OEs	2,00%	2,00%	2,00%	2,00%
Veículo	Água destilada	qsp	qsp	qsp	qsp

NOTA: * Fórmula aprovada e utilizada no teste sensorial e Challenge Test. ** Função conservante (antimicrobiana e antioxidante) e fragrância.

Uma vez que a Fase II do teste sensorial foi conduzida com os *blends* aplicados no creme desenvolvido, a consumidor foi questionado quanto a sua agradabilidade. O GRÁFICO 15, demonstra que 43% dos 79 consumidores entrevistados “gostam muito” da textura e sensação proporcionada em pele. Se considerarmos o Top 3 Box, o índice de aceitação é de 89%.

GRÁFICO 15. DISTRIBUIÇÃO DE RESPOSTAS DE AGRADABILIDADE DO CREME NATURAL DESENVOLVIDO



5.6. AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DOS *BLENDS*

A TABELA 23 mostra a AA% de cada *blend* em diferentes concentrações utilizadas para a construção das curvas de calibração e consequente cálculos de IC₅₀ apresentados na TABELA 24. Podemos observar que todos os *blends* desenvolvidos apresentam atividade antioxidante estatisticamente superior ao BHT, sendo o *Blend 3* o de maior atividade.

TABELA 23. RESULTADOS DE AA(%) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CADA *BLEND* E BHT

Amostra	Concentração (µL/mL)	AA% + DP
<i>Blend 1</i>	0,800	80,58 ± 0,50
	0,400	67,65 ± 0,29
	0,200	50,03 ± 0,53
	0,100	30,49 ± 0,68
<i>Blend 2</i>	0,800	81,68 ± 0,05
	0,400	69,74 ± 0,52
	0,200	52,68 ± 0,20
	0,100	33,01 ± 0,53
<i>Blend 3</i>	0,800	83,18 ± 0,47
	0,400	72,98 ± 0,29
	0,200	55,77 ± 0,62
	0,100	34,80 ± 0,41
BHT	0,400	55,95 ± 0,64
	0,200	32,68 ± 0,07
	0,100	20,01 ± 0,14
	0,050	10,53 ± 0,29

NOTA: Os resultados de AA% referem-se a média + desvio padrão (DP) de medidas em triplicata.

TABELA 24. IC₅₀ DOS *BLENDS* PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

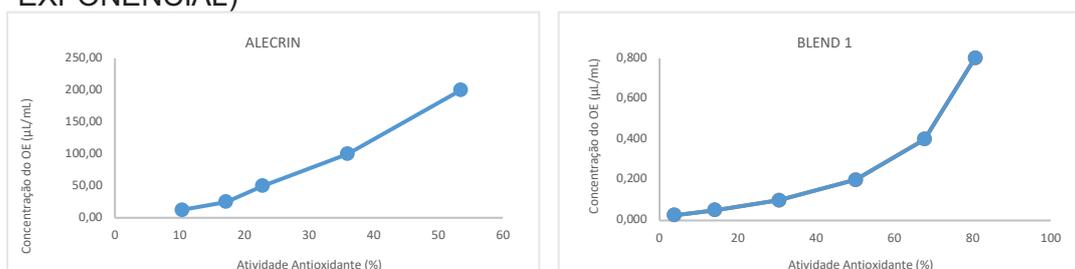
Amostra	Equação da Retra Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>Blend 3</i>	$y = -21,736x + 43,179$	0,9978	0,16 ± 0,003 (a)
<i>Blend 2</i>	$y = -22,377x + 43,823$	0,9963	0,17 ± 0,004 (b)
<i>Blend 1</i>	$y = -20,883x + 40,814$	0,9954	0,19 ± 0,002 (c)
BHT	$y = 0,00780x - 0,0463$	0,9937	0,35 ± 0,010 (d)

NOTA: Resultados expressos por média + desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por análise de variância ANOVA e teste de probabilidade Tukey ($p < 0,0001$).

O maior potencial antioxidante do *Blend 3* poderia ser justificado pela presença de uma maior concentração de OE de menta (40%). No entanto, as análises de AA isoladamente mostram que a IC₅₀ do OE de menta é maior que a do OE de orégano ($75,71 \pm 1,78$ e $1,74 \pm 0,00$ µL/mL, respectivamente), nos levando a concluir que existe um efeito sinérgico na combinação dos óleos.

Outro achado que indica haver um efeito sinérgico na atividade antioxidante dos *blends* são os perfis das curvas de calibração dos OEs isolados *versus* dos *blends*, conforme exemplificam os GRÁFICOS 16 e 17 através da comparação entre a curva do OE de alecrim e do *Blend 1*. Podemos observar que para o OE é formada uma reta enquanto que para o *Blend 1* é formada uma curva exponencial, mostrando que, com o aumento da concentração dos *blends* o efeito antioxidante aumenta exponencialmente, ou seja, existe um efeito sinérgico da combinação em altas concentrações.

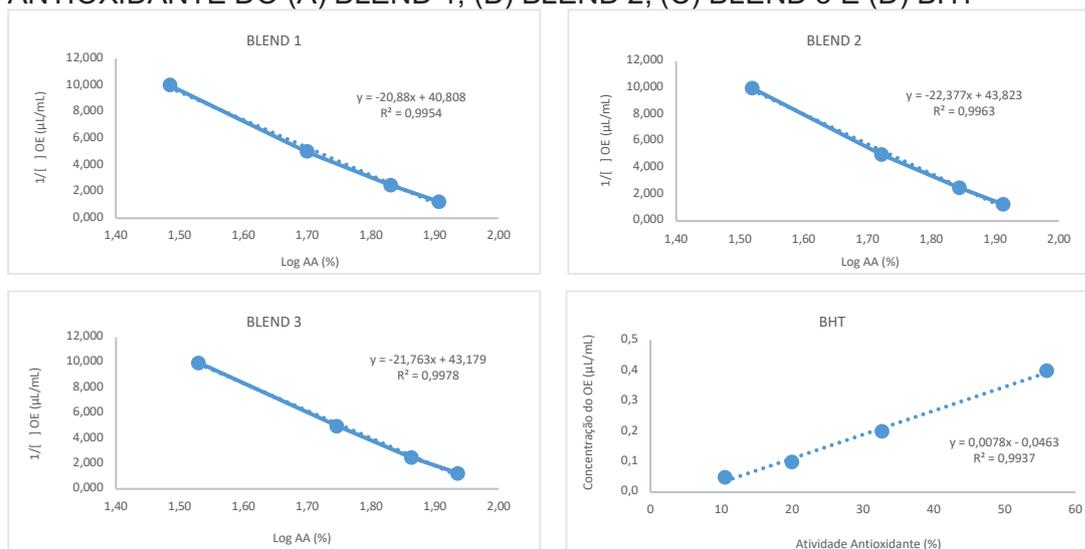
GRÁFICO 16 E 17. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (TRIPLICATA) DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO (16) OE DE ALECRIM E (17) *BLEND 1*, MOSTRANDO QUE O COMPORTAMENTO DIFERE (RETA *VERSUS* EXPONENCIAL)



Em função deste comportamento dos *blends*, foi necessário fazer um ajuste nas curvas de calibração para o cálculo da IC₅₀ a fim de transformar as curvas

exponenciais em retas. Foi então utilizado o log da AA% e o inverso da concentração, conforme mostram os GRÁFICOS 18A a 18D. É importante ressaltar que para o BHT, assim como para os OEs, este efeito também não foi observado.

GRÁFICO 18A A 18D. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO (A) BLEND 1, (B) BLEND 2, (C) BLEND 3 E (D) BHT



5.7. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS *BLEND*S

Os GRÁFICOS 19A e 19L a seguir mostram as curvas de calibração médias obtidas de dados em triplicata construídas para o cálculo das IC_{50} apresentados na TABELA 25 relativos a atividade antimicrobiana dos *blends* frente aos quatro microorganismos testados.

GRÁFICO 19A A 19L. CURVAS DE CALIBRAÇÃO MÉDIA DE MEDIDAS EM TRIPLICATA PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLEND 1 PARA (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*, DO BLEND 2 PARA (E) *S. aureus*, (F) *E. coli*, (G) *P. aeruginosa* E (H) *C. albicans* E DO BLEND 3 PARA (I) *S. aureus*, (J) *E. coli*, (K) *P. aeruginosa* E (L) *C. albicans*

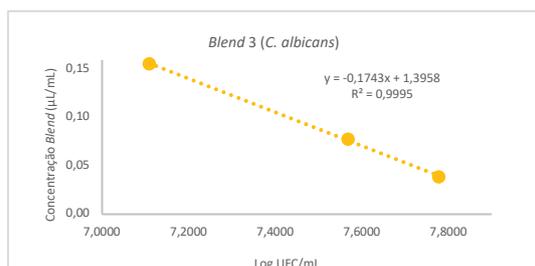
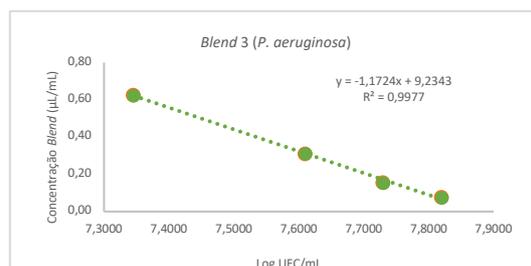
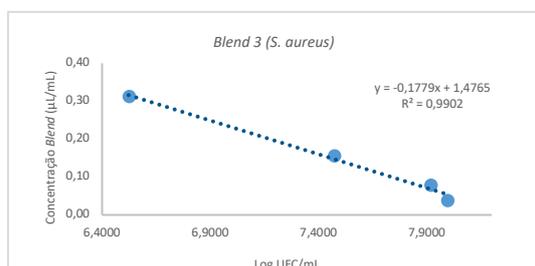
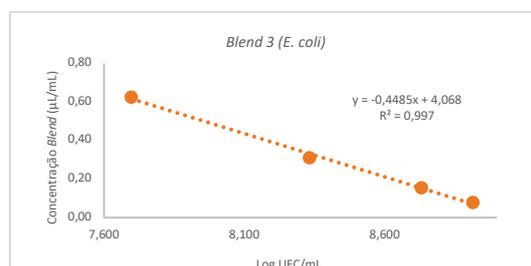
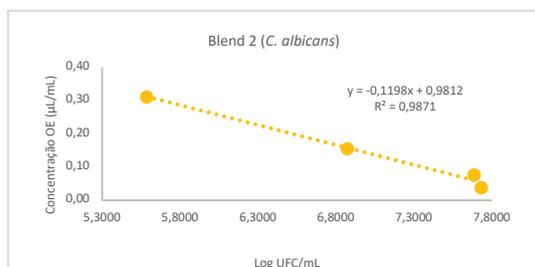
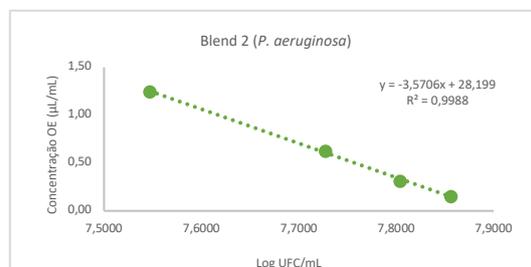
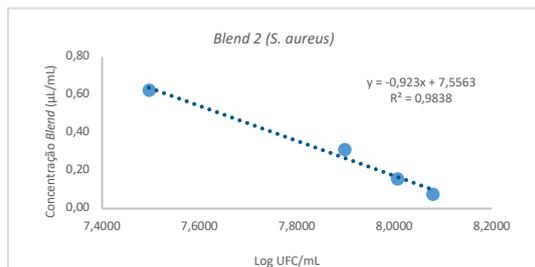
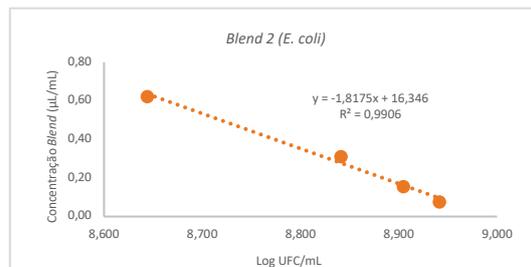
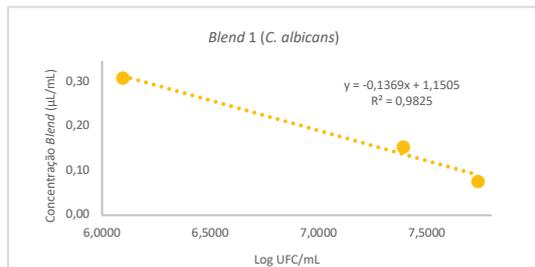
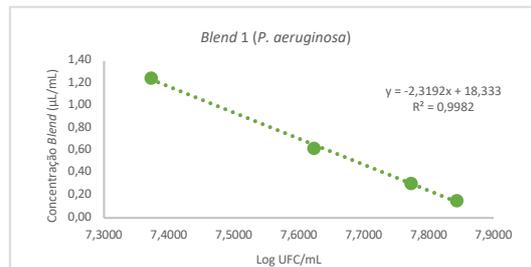
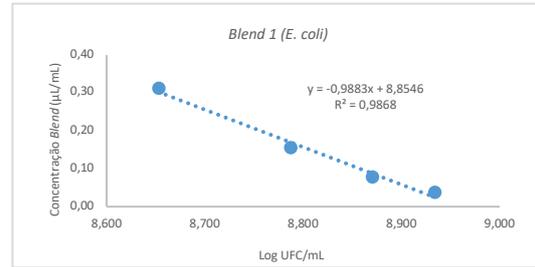
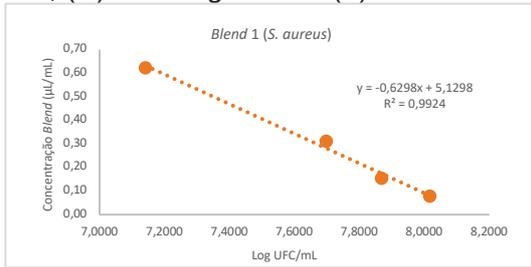


TABELA 25. IC₅₀ DE CADA MICROORGANISMO DOS 3 BLENDS DESENVOLVIDOS

Microorganismo	Amostra	Equação da Retra Média	R ² Médio	IC ₅₀ + DP (µL/mL)
<i>S. aureus</i>	Blend 3	$y = -0,1779x + 1,4765$	0,990	0,09 ± 0,02 (a)
	Blend 1	$y = -0,6298x + 5,1298$	0,992	0,20 ± 0,06 (b)
	Blend 2	$y = -0,923x + 7,55630$	0,984	0,38 ± 0,01 (c)
	MP	$y = -3,0919x + 25,282$	0,997	1,22 ± 0,38 (d)
<i>E. coli</i>	Blend 3	$y = -0,4485x + 4,0680$	0,997	0,27 ± 0,04 (a)
	MP	$y = -0,6894x + 6,2105$	0,988	0,31 ± 0,01 (a)
	Blend 1	$y = -0,9883x + 8,8546$	0,987	0,36 ± 0,15 (a)
	Blend 2	$y = -1,8175x + 16,346$	0,991	1,17 ± 0,37 (b)
<i>P. aeruginosa</i>	Blend 3	$y = -1,1724x + 9,2343$	0,998	0,39 ± 0,03 (a)
	Blend 1	$y = -2,3192x + 18,333$	0,998	0,85 ± 0,08 (b)
	MP	$y = -2,0124x + 16,606$	0,985	1,08 ± 0,01 (c)
	Blend 2	$y = -3,5706x + 28,199$	0,999	1,38 ± 0,52 (c)
<i>C. albicans</i>	Blend 2	$y = -0,1198x + 0,9812$	0,987	0,09 ± 0,01 (a)
	Blend 3	$y = -0,1743x + 1,3958$	1,000	0,10 ± 0,02 (a)
	Blend 1	$y = -0,1369x + 1,1505$	0,983	0,13 ± 0,01 (b)
	MP	$y = -0,3298x + 2,6338$	0,990	0,21 ± 0,03 (c)

NOTA: Resultados expressos por média e desvio padrão (DP) de medidas em triplicata, sendo que amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA e teste de probabilidade Tukey ($p < 0,0001$).

LEGENDA: MP: Metilparabeno.

As FIGURAS 10, 11 e 12 apresentam recortes das placas de cultivo obtidas nos ensaios de microdiluição em placa para cada microorganismo e *blend*. Podemos observar que a conversão do TTC ocorre claramente com as bactérias, mas não ocorre com a levedura. Para *C. albicans* o crescimento microbiano é medido pela turvação do meio e não pela coloração, conforme observado por VEIGA (2016).

FIGURA 10A A 10D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLEND 1 MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

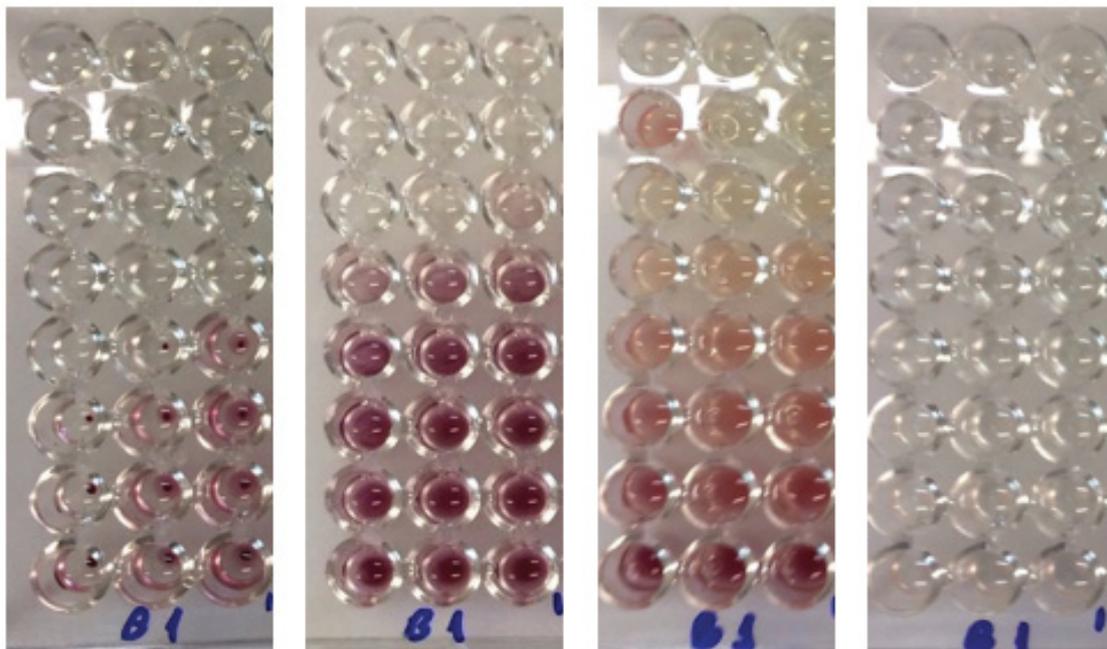


FIGURA 11A A 11D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLEND 2 MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*

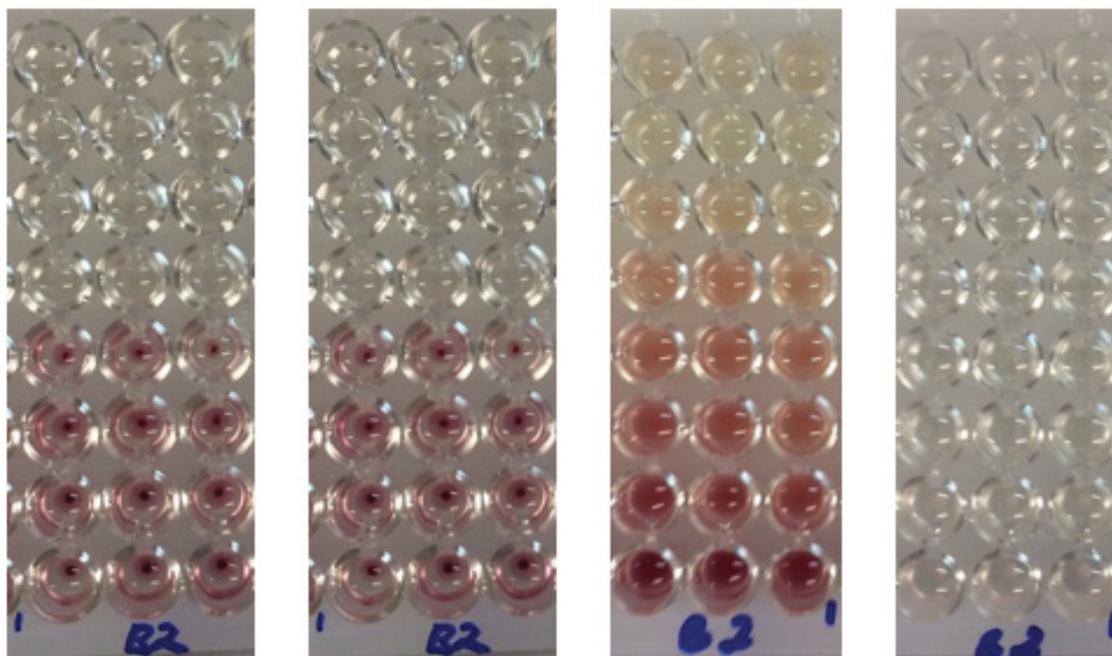
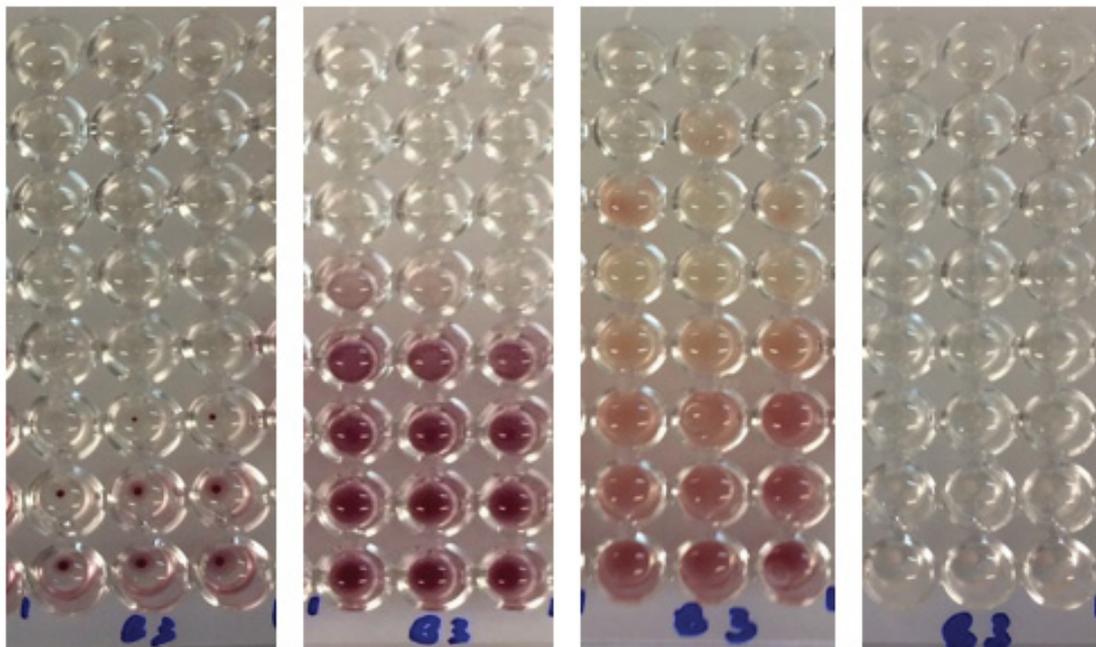


FIGURA 12A A 12D. PLACAS DE CULTIVO DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO *BLEND 3* MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, OS MICROORGANISMOS (A) *S. aureus*, (B) *E. coli*, (C) *P. aeruginosa* E (D) *C. albicans*



5.8. AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS *BLENDS*

Assim como foi avaliada a aceitação dos OEs isoladamente para selecionar os de maior agradabilidade na opinião do consumidor, os *blends* também foram testados pelo mesmo método aplicados ao creme natural desenvolvido. A TABELA 26 mostra as perguntas feitas ao consumidor e as escalas utilizadas.

TABELA 26. PERGUNTAS E ESCALAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO SENSORIAL FASE II

Pergunta	Escala
Avalie o quanto você gosta de cada uma das fragrâncias e do sensorial do creme.	Escala categórica 7 pontos (desgosto muito a gosto muito)
Como você descreve cada fragrância?	CATA 16 descritores
Das 3 fragrâncias apresentadas, qual é a sua preferida?	Múltipla escolha

Participaram da Fase II do estudo sensorial 79 consumidores e, assim como na Fase I, a grande maioria dos participantes apresentou entre 18 e 25

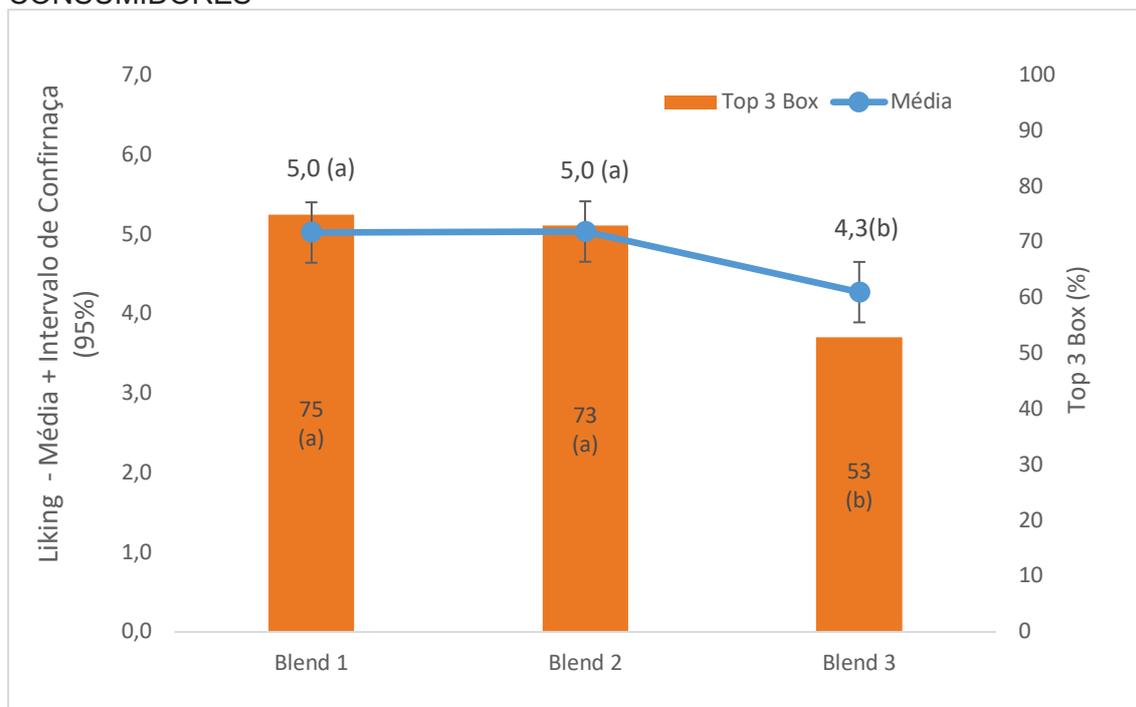
anos (GRÁFICO 20) e 87% eram mulheres. Estes resultados já eram esperados em função do local de aplicação do estudo e é de grande valia para a análise por se tratar de um público bastante importante para o setor cosmético.

O GRÁFICO 21 mostra que o *Blend 3* apresentou a menor aceitação dentre os 3 *blends* avaliados, enquanto os *Blends 1* e *2* apresentam aceitação superior ao *Blend 3* e equivalentes entre si.

O GRÁFICO 22 mostra, através da análise de ACP, que os *Blends 1* e *2* estão mais próximos do posicionamento do *Liking* que o *Blend 3*. Os atributos que justificam a rejeição do *Blend 3* são principalmente medicamentoso, especiado e quente. Já os *Blends 1* e *2* são aceitos por motivos diversos: O *Blend 1* está associado principalmente com fresco, suave e herbal enquanto o *Blend 2* está associado principalmente com refrescante, limpo, floral, mentolado e adocicado.

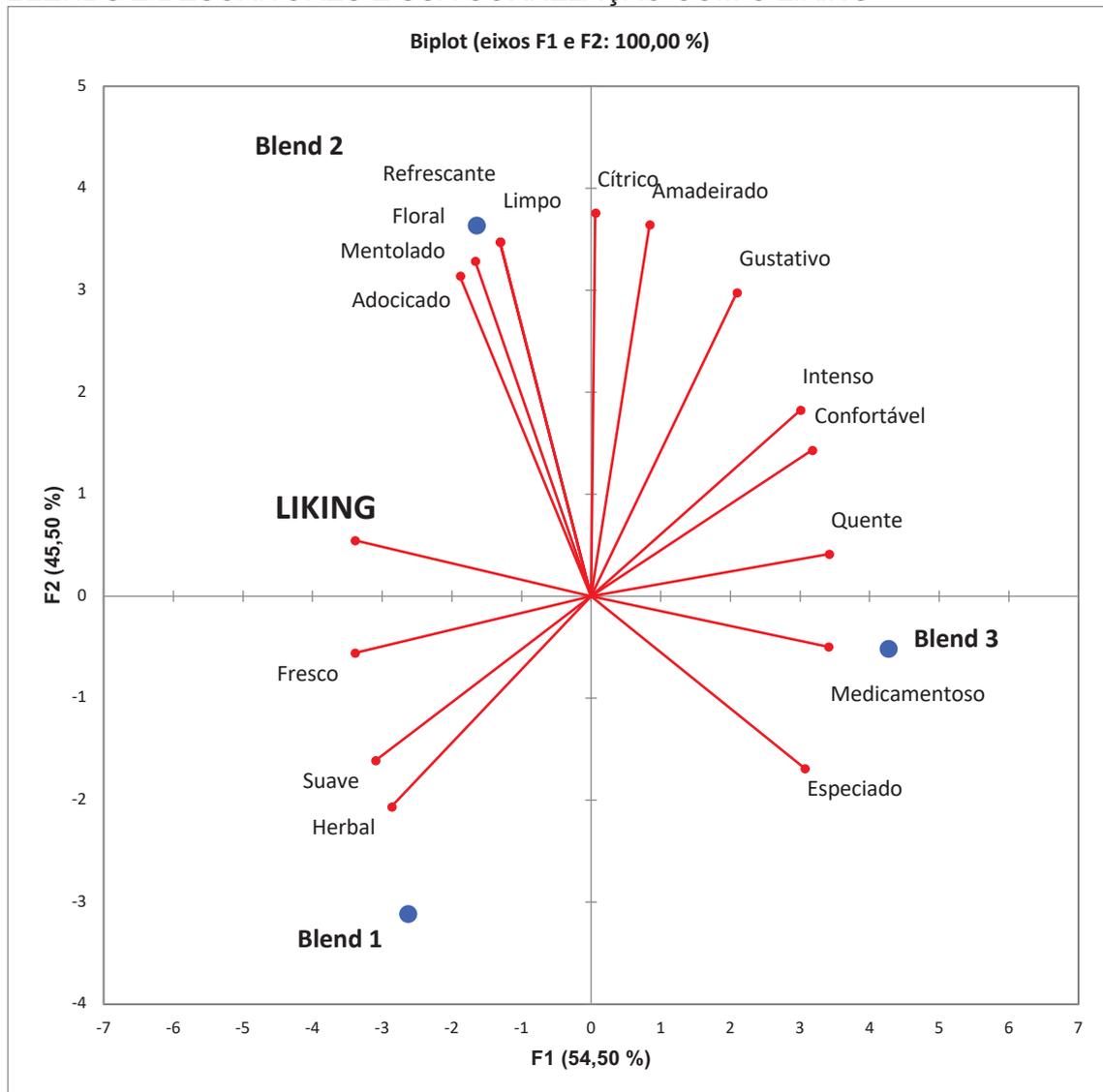
Se compararmos estes resultados com os resultados dos OEs, podemos observar que os atributos quente e especiado são positivos para o OE mas não são desejados numa fragrância de creme corporal.

GRÁFICO 21. REPRESENTAÇÃO DA ACEITAÇÃO DOS *BLENDS* PELOS CONSUMIDORES



NOTA: Resultados de *liking* expressos por média + intervalo de confiança em escala de 7 pontos (eixo esquerdo) e proporção de respostas em Top 3 Box (eixo direito). Amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% de confiança por ANOVA com teste de probabilidade Tukey ($p < 0,0001$).

GRÁFICO 22. ACP REPRESENTANDO AS AFINIDADES EXISTENTES ENTRE BLENDS E DESCRITORES E SUA CORRELAÇÃO COM O LIKING

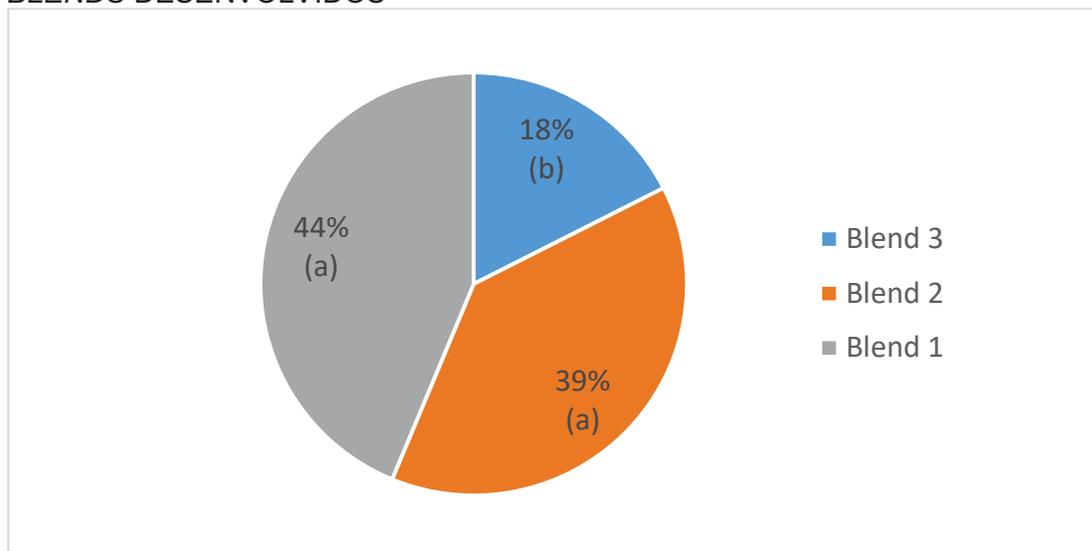


NOTA: Quanto mais próxima uma amostra se encontra de um descritor, maior a relação entre eles e quanto mais próxima do posicionamento de *liking* a amostra se encontra, maior sua agradabilidade (DUTCOSKY, 2013).

Os consumidores foram também questionado sobre sua preferência em relação aos três *blends* avaliados. O GRÁFICO 23 mostra que a preferência dos consumidores se divide entre os *Blends* 1 e 2, confirmando os resultados de aceitação do GRÁFICO 21. Somente 18% dos consumidores escolheu o *Blend* 3 como preferido, confirmando sua rejeição como fragrância de um creme corporal.

O ACP construídos dos *blends* em duas dimensões foi capaz de explicar 100,0% das correlações existentes, ou seja, não haveria necessidade de uma análise a terceira dimensão (DUTCOSKY, 2013).

GRÁFICO 23. PREFERÊNCIA GLOBAL PELO CONSUMIDOR DENTRE OS 3 *BLENDS* DESENVOLVIDOS



NOTA: Amostras representadas por letras diferentes apresentam diferença significativa a 95% por ANOVA e teste de probabilidade Tukey ($p < 0,001$).

5.9. TESTE DESAFIO DO CONSERVANTE

A segurança microbiológica de produtos cosméticos é um pré-requisito para sua produção e comercialização e os resultados de Teste Desafio do Conservante (*Challenge Test*) são necessários para comprovar esta estabilidade (KERDUDO et al., 2016).

As TABELAS 27, 28 e 29 apresentam os resultados obtidos no *Challenge Test* para os *Blends* B1, B2 e B3, respectivamente, considerando os inóculos *pool* de bactérias Gram Positivas, bactéria Gram Negativa e *pool* de fungos. De acordo com a Farmacopéia Brasileira, produtos tópicos com base aquosa devem apresentar redução de 2 logs na contagem de UFC/g no 14º dia a partir da contagem inicial, e nenhum aumento do 14º ao 28º dias para bactérias e nenhum aumento a partir da contagem inicial para fungos (BRASIL, 2010).

Podemos observar que para os três *blends* desenvolvidos a contagem de UFC/g no 14º dia foi praticamente zerada nos 3 inóculos estudados mostrando

que os *blends* atuaram como sistema efetivamente como sistema conservante da formulação.

TABELA 27. CONTAGEM DE (UFC/G) DE BACTÉRIAS *GRAM POSITIVAS* NO *CHALLENGE TEST* PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS *BLENDS* 1, 2 E 3

Amostra	t0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Blend 1	3,0x10 ⁶	9,5x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 2	4,1x10 ⁶	2,5x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 3	7,0x10 ⁶	3,0x10 ¹	<10	<10	<10

TABELA 28. CONTAGEM (UFC/G) DE BACTÉRIAS *GRAM NEGATIVAS* NO *CHALLENGE TEST* PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS *BLENDS* 1, 2 E 3

Amostra	t0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Blend 1	6,5x10 ⁶	1,0x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 2	8,5x10 ⁶	5,0x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 3	8,5x10 ⁶	5,5x10 ¹	<10	<10	<10

TABELA 29. CONTAGEM (UFC/G) DE FUNGOS NO *CHALLENGE TEST* PARA A FORMULAÇÃO CONTENDO OS *BLENDS* 1, 2 E 3

Amostra	t0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Blend 1	3,0x10 ⁶	9,5x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 2	4,1x10 ⁶	2,5x10 ¹	<10	<10	<10
Blend 3	7,0x10 ⁶	3,0x10 ¹	<10	<10	<10

5.10. DISCUSSÃO GERAL

Embora todos os *blends* estejam aptos a atuarem como sistema conservante de acordo com os resultados de *Challenge Test*, os estudos de DPPH para atividade antioxidante e microdiluição em caldo para atividade antimicrobiana indicam que o *Blend 3* é o mais efetivo em termos de ação biológica. Em contrapartida, o *Blend 3* é o menos aceito pelo consumidor como agente de perfumação.

O *Blend 1* não foi penalizado em nenhuma das análises biológicas quando comparado com as referências, mas o *Blend 2* apresentou efeito antimicrobiano inferior ao metilparabeno para o microorganismo *E. coli*. Em relação à aceitação pelo consumidor, os *Blends 1* e *2* apresentam resultados estatisticamente semelhantes.

A maior eficácia do *Blend 3* pode ser justificada pela maior presença de OE de orégano (40%) em relação aos *Blends 1* e *2* (33% e 25%, respectivamente).

O alto poder antioxidante e antimicrobiano do OE de orégano foi relatado por MARTUCCI et al. (2015) e justificado em função de seu conteúdo fenólico.

Portanto, podemos concluir que, no caso de uma seleção do *blend* de melhor efeito conservante e maior aceitação pelo consumidor como fragrância, o *Blend 1* é o mais indicado.

Embora não tenha sido realizado um estudo de estabilidade formal para as formulações contendo os *blends*, amostras de cada uma delas foram armazenadas em potes opacos que foram mantidos em temperatura ambiente (condição normal de uso e armazenamento). No momento da construção desta dissertação haviam se passado 4 meses desde a fabricação destas amostras e não havia nenhuma alteração de cor e odor, sinais típicos de presença de processo oxidativo ou contaminação microbiana.

6. CONCLUSÃO

Uma vez que o consumo de cosméticos naturais é uma tendência mundial e as estimativas de mercado indicam que este segmento tende a crescer também no Brasil, a busca por ingredientes que atendam aos requisitos, tanto de órgãos regulatórios como de certificações privadas, tende a ser também cada vez maior.

Os resultados encontrados mostram que é possível o desenvolvimento de uma emulsão corporal cosmética de composição estritamente natural, livre de ingredientes sintéticos e controversos, como o BHT e o metilparabeno, em que o sistema conservante seja constituído somente por OEs e que também cumpra o papel de fragrância.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. **Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2015-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGUÊS-11ago2015.pdf>>. Acesso em: 6 maio. 2016.
- AJIBOYE, T. O. et al. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 208–215, 2016.
- AKRAMI, F. et al. Antioxidant and antimicrobial active paper based on *Zataria* (*Zataria multiflora*) and two cumin cultivars (*Cuminum cyminum*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 929–933, 2015.
- AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 403–406, 2008.
- ANDERSEN, F. A. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. **International journal of toxicology**, v. 27 Suppl 4, n. SUPPL. 4, p. 1–82, jan. 2008.
- APAOLAZA, V. et al. Natural ingredients claim's halo effect on hedonic sensory experiences of perfumes. **Food Quality and Preference**, v. 36, p. 81–86, 2014.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARILLÊ, E.; LAROZE, C. **The Book of Perfume**. Paris: Flammarion, 1995.
- BIGHETTI, E. **Cosméticos orgânicos e cosméticos naturais**. Disponível em: <<http://www.negocioestetica.com.br/cosmeticos-organicos-e-cosmeticos-naturais/>>. Acesso em: 19 jul. 2016.
- BRAHMI, F. et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. **Industrial Crops and Products**, mar. 2016.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, v. 1, p. 546, 2010.
- BRASIL. **Resolução - RDC nº 29, de 1º de Junho de 2012**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2569e7004c58f11fb8e7f8dc39d59d3e/Resolucao+RDC+Nº+29,+de+1º+de+junho+de+++2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 19 abr. 2016.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira - Volume I**. 5. ed. Brasília, DF: [s.n.].
- CALO, J. R. et al. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems– A Review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, jan. 2015.
- CHEN, Q. et al. In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum*

L.) oils and their main components. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 632–637, 2014.

CIVILLE, G. V.; OFTEDAL, K. N. Sensory evaluation techniques - Make “good for you” taste “good”. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 4, p. 598–605, 2012.

CLARIANT. **Product Fact Sheet NIPAGIN® M**. Disponível em: <<https://www.ulprospector.com/documents/73141.pdf?bs=2063&b=42518&st=20&r=la&ind=personalcare>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

Conservantes. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n_44.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2016.

COSMETICS&TOILETRIES. **Organic Cosmetics Market Research**. Disponível em: <<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/networking/news/company/Organic-Cosmetics-Market-Research-372973201.html>>. Acesso em: 26 abr. 2016.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of Parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5–13, 2004.

DAVIES, E. The sweet scent of success. **Chemistry World**, n. February, p. 40–44, 2009.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 4. ed. Curitiba: PUCPRes, 2013.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, out. 2015.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 76–82, 2008.

EUROMONITOR. **Beauty and Personal Care in Brazil**. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/beauty-and-personal-care-in-brazil/report>>. Acesso em: 9 jun. 2016.

EUROPIAN COMISSION. **Consumers : Commission improves safety of cosmetics For more information**: Disponível em: <http://europa.eu/rapid/press-release_IP-14-1051_en.htm>. Acesso em: 8 abr. 2016.

FAINE, L. A. et al. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, n. 3, p. 221–226, 2006.

FDA. **“Organic” Cosmetics**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Cosmetics/Labeling/Claims/ucm203078.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

FERNANDEZ, X. et al. Parfum , chimie et création. **L’actualité Chimique**, v. 323–324, p. 42–51, 2008.

FERNANDO, A. et al. Análise de Correspondência : bases teóricas na interpretação de dados categóricos em Ciências da Saúde Correspondence Analysis : a theoretical basis for categorical data interpretation in Health Sciences Análisis de Correspondencia : bases teóricas para l. v. 30, n. 3, p. 473–486, 2014.

FOCUS ON SURFACTANTS. Distribution strategies and adoption issues for green

cosmetics. **Focus on Surfactants**, v. 2015, n. 7, p. 6, jul. 2015.

FONSECA-SANTOS, B.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M. Sustainability, natural and organic cosmetics: Consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 17–26, 2015.

Fragrances. Disponível em: <<http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/fragrance>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898–904, 2007.

GÜLÇİN, İ. et al. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 371–382, 2003.

GÜLÇİN, İ.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489–499, 2012.

HAJLAOUI, H. et al. Chemical composition and biological activities of Tunisian Cuminum cyminum L. essential oil: A high effectiveness against Vibrio spp. strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8, p. 2186–2192, 2010.

HIGUCHI, C. T. Regulamentação de Cosméticos Orgânicos no Brasil: Apelo Sustentável à Pele. **Revista de Saúde , Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 7, n. 2004, p. 82–83, 2012.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.

IFRA. **IFRA RIFM QRA Information Booklet Version 7.1**. Disponível em: <[http://www.ifraorg.org/Upload/Docs/22182_GD_2008_02_15_IFRA_RIFM_QRA_Information_booklet_V6.0_\(46th_IFRA_Amendment\).pdf](http://www.ifraorg.org/Upload/Docs/22182_GD_2008_02_15_IFRA_RIFM_QRA_Information_booklet_V6.0_(46th_IFRA_Amendment).pdf)>. Acesso em: 1 set. 2017.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1749–1755, 2009.

JUTEAU, F. et al. **Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil** Fitoterapia. [s.l.: s.n.].

KERDUDO, A. et al. Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 9, p. 1077–1089, 2016.

KHANUM, R.; THEVANAYAGAM, H. Lipid peroxidation: Its effects on the formulation and use of pharmaceutical emulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131–137, 2005.

LEE, W. J. et al. You taste what you see: Do organic labels bias taste perceptions? **Food Quality and Preference**, v. 29, n. 1, p. 33–39, 2013.

LEFFINGWELL & ASSOCIATES. **Flavor & Fragrance Industry Leaders**. Disponível em: <http://www.leffingwell.com/top_10.htm>. Acesso em: 27 fev. 2017.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732–1738, 2008.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057–3064, 2011.

MANTLE, D. et al. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 4, p. 385–391, 1998.

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205–213, set. 2015.

MEILGAAARD, M.; VANCE CIVILLE, G.; THOMAS CARR, B. **Sensory Evaluation Techniques**. 4. ed. New York: Boca Raton: CRC Press, 2006.

MENSOR, L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 127–130, 2001.

NOP. **National Organic Program**. Disponível em: <<https://www.ams.usda.gov/about-ams/programs-offices/national-organic-program>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

OISHI, S. Effects of parabens on the male reproductive system in rats. **Environmental Sciences**, v. 9, n. 2–3, p. 181, 2002.

OSTROSKY, E. A. et al. 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, jun. 2008.

PARK, H.-J. et al. Human health risk assessment of phenoxyethanol in cosmetics. **Toxicology Letters**, v. 229, p. S133, set. 2014.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 379–385, 2007.

POUILLOT, A. et al. Natural Antioxidantes and their Effects on the Skin. p. 239–257, 2011.

PRAKASH, B. et al. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 201–208, nov. 2012.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, dez. 2014.

REED, M.; FUJIWARA, H.; THOMPSON, D. C. Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices. **Chemico-Biological Interactions**, v. 138, n. 2, p. 155–170, 2001.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Biological activities and major components determination

in essential oils intended for a biodegradable food packaging. **Industrial Crops & Products**, v. 97, p. 201–210, 2017.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.

ROZIN, P. et al. Preference for natural: instrumental and ideational/moral motivations, and the contrast between foods and medicines. **Appetite**, v. 43, n. 2, p. 147–54, out. 2004.

ROZIN, P. The Meaning of “ Natural ” Process More Important Than Content. **Psychological Science Research**, v. 16, n. 8, p. 652–658, 2016.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621–632, 2005.

SCHAEFER, K. **Report Finds Consumers Desire Organic**. Disponível em: <<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/category/natural/98601119.html>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

SCHAEFER, K. **Natural / Organic Products Assessed for “ Naturalness ”**. Disponível em: <<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/regulatory/organic/126663193.html>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

SELL, C. **The Chemistry of Fragrances - From Perfumer to Consumer**. 2. ed ed. Cambridge: RSC Publishing, 2006.

SONI. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, jul. 2005.

SOUZA, A. C.; ROCHA, R.; VIEIRA, M. D. T. **Análise de Correspondência Simples e Múltipla para Dados Amostrais Complexos**. Disponível em: <http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/Artigo_Sinape_v2.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2018.

SURFACTANTS, F. ON. World Natural Care offers natural preservative system for cosmetics products. **Focus on Surfactants**, v. 2015, n. 6, p. 4, jun. 2015.

TECHSCI RESEARCH. **Global Organic Cosmetics Market Forecast & Opportunities, 2021**. Disponível em: <Global Organic Cosmetics Market Forecast & Opportunities, 2021>. Acesso em: 20 maio. 2016.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 43, p. 587–595, 2013.

USDA. **Cosmetics, Body Care Products, and Personal Care Products**. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5068442>>. Acesso em: 22 maio. 2016.

VEIGA, A. **Validação de Método Microbiológico para Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Compostos Antimicrobianos**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

WANG, G.-W. et al. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, 2011a.

WANG, G.-W. et al. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, jun. 2011b.

WANG, W. et al. **Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components** **Food Chemistry**. [s.l: s.n.].

YAMAMOTO, S. The Roots of Natural Cosmetics and its Modern Interpretation. **SÖFW-Journal**, v. 134, n. 8, 2008.

YEHYE, W. A. et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 295–312, 2015.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3144–3152, 2010.

ZHANG, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282–289, 2015.

ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

AVALIAÇÃO SENSORIAL - FASE I

- 1) **Avalie o quanto você gosta de cada um dos cheiros listados?**
Assinale somente uma opção por cheiro.

ESCALA	593	231	798	654	412	903	115	882	310
Gosto muito									
Gosto moderadamente									
Gosto ligeiramente									
Não gosto, nem desgosto									
Gosto ligeiramente									
Gosto moderadamente									
Gosto muito									

- 2) **Como você descreve cada cheiro?**
Assinale tantos descritores quanto forem necessários

DESCRIPTOR	593	231	798	654	412	903	115	882	310
Cítrico									
Herbal									
Floral									
Especiado									
Amadeirado									
Fresco									
Suave									
Intenso									
Confortável									
Quente									
Mentolado									
Adocicado									
Refrescante									
Limpo									
Medicamentoso									
Gustativo									

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

AVALIAÇÃO SENSORIAL - FASE II

- 1) **Avalie o quanto você gosta de cada uma das fragrâncias e do sensorial do creme**
Assinale somente uma opção por cheiro.

ESCALA	698	567	413	Creme
Gosto muito				
Gosto moderadamente				
Gosto ligeiramente				
Não gosto, nem desgosto				
Gosto ligeiramente				
Gosto moderadamente				
Gosto muito				

- 2) **Como você descreve cada fragrância?**
Assinale tantos descritores quanto forem necessários.

DESCRITOR	698	567	413
Cítrico			
Herbal			
Floral			
Especiado			
Amadeirado			
Fresco			
Suave			
Intenso			
Confortável			
Quente			
Mentolado			
Adocicado			
Refrescante			
Limpo			
Medicamentoso			
Gustativo			

- 3) **Das 3 fragrâncias apresentadas, qual é a sua preferida?**
Assinale somente uma opção.

<input type="checkbox"/> 698
<input type="checkbox"/> 567
<input type="checkbox"/> 413

ANEXO 2 – PARECER CEP

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Blends de Óleos Essenciais com Potencial Antimicrobiano e Antioxidante

Pesquisador: FABIO SEIGI MURAKAMI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68312817.0.0000.0102

Instituição Proponente: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.092.774

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de Blends de óleos essenciais com potencial antimicrobiano e antioxidante”, sob a orientação e coordenação do Prof. Dr. Fabio Seigi Murakami, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, com a participação de Suélyn Féderle mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo geral “Entender quão agradável e aceita são fragrâncias naturais, desenvolvidas somente com óleos essenciais puros e livres de componentes sintéticos, a fim de melhorar os conhecimentos técnicos sobre cosméticos naturais.”

Objetivos específicos

“-medir a agradabilidade de 15 óleos essenciais comumente utilizados na construção de fragrâncias;”

“-medir a aceitação de 2 a 3 fragrâncias (blends) construídas a partir da combinação de 2 ou mais dos 15 óleos essenciais;”

“-segmentar os consumidores entrevistados em função do seu nível de preocupação com o consumo de produtos naturais e comparar a aceitação das fragrâncias nos diferentes grupos;”

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

“-comparar a aceitação dos consumidores antes e depois de receberem a informação de que os ingredientes e fragrâncias são de origem naturais.”

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que os possíveis riscos dos participantes é apresentar alguma reação adversa (respiratória ou dérmica) às fragrâncias ou aos componentes da loção, sendo referidos os cuidados e medidas adotadas.

O risco o qual o voluntário estará sujeito, ainda que muito baixo, é apresentar alguma reação adversa (respiratória ou dérmica) à fragrância ou aos componentes da loção. Uma vez que este tipo de reação está normalmente atrelado ao histórico particular de cada indivíduo, a exclusão de voluntárias que já tenham apresentado pelo menos uma vez na vida este tipo de reação já reduzirá significativamente o risco. Os pesquisadores destacam entre os benefícios do estudo que “se espera entender a aceitação de fragrâncias naturais, bem como comprovar sua aplicabilidade em cosméticos naturais e trazer maior sustentabilidade ao desenvolvimento de cosméticos.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A contextualização do projeto pauta-se na literatura considerada pertinente à temática abordada, apropriada aos objetivos do estudo.

Local do Estudo

O estudo será realizado nas dependências do curso de Farmácia da UFPR, no campus Jardim Botânico em Curitiba.

Termo de Concordância – Condução do Estudo

O termo de concordância com a condução do estudo foi assinado pela Prof^ª. Dr^ª. Nilce Nazareno da Fonte, coordenadora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Participantes:

Os participantes do estudo serão constituídos por homens e mulheres, de 18 a 60 anos, consumidores (as) de cosméticos.

Tamanho da Amostra

A amostra será constituída por 100 participantes.

Plano de Recrutamento

“Estudantes, funcionários (as) e professores (as) serão abordados e convidados a participar da pesquisa através da leitura, aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.” Critérios de Inclusão e Exclusão

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Critérios de inclusão: "homens e mulheres, de 18 a 60 anos, consumidoras de cosméticos.

Critérios de exclusão: "homens e mulheres com histórico de alergia a cosméticos e/ou fragrâncias, menores de 18 anos ou maiores de 60 anos, não usuários de cosméticos e grávidas ou lactantes."

Metodologia proposta

Os pesquisadores referem que será realizada uma pesquisa afetiva quantitativa (MAILGAARD, 2010).

A pesquisa envolverá a experimentação de cosméticos e a aplicação de questionário: perfil demográfico e psicográfico, avaliação de óleos essenciais e avaliação das fragrâncias desenvolvidas, com a finalidade de entender a aceitação das fragrâncias que estão sendo desenvolvidas.

"a) Perfil demográfico e psicográfico: idade, classe social por Critério Brasil (ABEP, 2015), hábitos de consumo de cosméticos e preocupação com consumo de produtos naturais."

"b) Avaliação dos óleos essenciais: quanto à sua agradabilidade e descrição olfativa."

"c) Avaliação das fragrâncias desenvolvidas: as fragrâncias já aplicadas em uma formulação de creme base serão aplicadas no antebraço dos participantes, avaliando: agradabilidade, adequação olfativa para o produto em questão, intenção de uso do produto, descrição olfativa e comparação com seu creme habitual de uso."

"Os dados serão compilados em planilhas de Excel, contendo as informações acerca de aceitabilidade de fragrâncias naturais."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os documentos e termos requeridos.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ajustes necessários

1 Projeto Detalhado

-No "item 8", análise crítica de riscos e benefícios, especificar e ampliar o conteúdo referente a benefícios.

"Benefícios: os voluntários participarão de uma pesquisa que busca trazer maior sustentabilidade ao desenvolvimento de cosméticos."

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



-No "Item 11", especificar o endereço completo do local onde será realizado o estudo.

"A pesquisa será realizada no prédio de Setor de Ciências da Saúde da UFPR, nas dependências do curso de Farmácia, no campus Jardim Botânico em Curitiba."

-No "item 17", especificar no plano de recrutamento os procedimentos de acesso, divulgação e recrutamento dos participantes.

"Estudantes, funcionários (as) e professores (as) serão abordados e convidados a participar da pesquisa através da leitura, aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido."

- Substituir o uso do termo empregado "voluntário", por "participante".

"Os voluntários serão orientados, inclusive pelo TCLE, que os questionários serão descartados depois de compilados em planilhas de Excel e que gerarão informações acerca de aceitabilidade de fragrâncias naturais."

2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- Incluir o nome do orientador na página 1, pois só consta o nome da mestrandia

"Eu, Suélyn Féderle, aluna de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná, estou convidando você, consumidor de cosméticos a participar de um estudo intitulado Desenvolvimento de Blends de Óleos Essenciais com Potencial Antimicrobiano e Antioxidante, pesquisa que busca desenvolver fragrâncias naturais para cosméticos."

- Na letra "c", informar o número da sala.

"c) Para tanto você deverá comparecer nas dependências do curso de Farmácia para avaliar os óleos essenciais e cremes e responder o questionário referente a eles o que levará aproximadamente 30 minutos."

- Nas letras "d" e "e", informar as medidas adotadas para minimizar desconfortos e possíveis riscos.

"d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a cansaço olfativo."

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



“e)Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser reação alérgica (respiratória ou dérmica) à fragrância ou aos componentes da loção.”

Favor corrigir e vincular à Instituição Proponente UFPR/SCS sua Unidade/órgão:

Entrar na ABA: Alterar meus dados – Buscar Instituição: nosso CEP: Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde clicar no ícone com desenho de caneta, logo abre uma árvore com vários DEPARTAMENTOS E COORDENAÇÕES: ESCOLHER AQUELA DE ONDE FOI APROVADO O SEU PROJETO DE PESQUISA Ex.: Programa de Pós-Graduação em Ed. Física e/ou Departamento de Teoria e Prática de Ensino e/ou Departamento de Clínica Médica... - adicionar e salvar , em seguida voltar a edição do projeto na Plataforma Brasil- 1ª página: Onde diz Instituição Proponente: baixar a seta para a Unidade/órgão pretendida – imprimir novamente a folha de rosto onde aparecerá no campo unidade/órgão o nome do Depto ou Coordenação selecionado. Solicitar assinatura e dados do responsável pelo Depto ou Coordenação (na ausência deste pode ser o Vice ou Diretor do Setor).

Deverá aparecer em seu projeto como Instituição proponente exemplo: Programa de pós-graduação em Genética ou o nome de seu Departamento.(ex.; Departamento de Clínica Médica? Departamento de Farmácia)

Considerações Finais a critério do CEP:

Como responder as pendências:

- 1) O Pesquisador deverá devolver as pendências no prazo máximo de até 30 dias, a contar desta data, postando e enviando através da Plataforma Brasil - modo: Editar (), (seguindo todas as etapas até enviar novamente).
- 2) Favor responder em documento (carta simples) à parte todas as pendências que constam no parecer, com indicação dos documentos e PÁGINAS nas quais as modificações foram feitas; da mesma forma, assinalar com cor diferenciada todas as alterações feitas nos documentos que foram revisados.
- 3) Os arquivos com as respostas às pendências deverão ser anexados na PB sempre com títulos diferentes dos já inseridos, pois se o arquivo contiver o mesmo nome o sistema irá inserir o arquivo anterior automaticamente. (Ex.: TCLE corrigido.doc ou TCLE versão 1...)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Não excluir os arquivos já enviados, para manter o histórico do projeto, uma vez que os arquivos fazem parte do projeto original.

Em www.cometica.ufpr.br consultar PARECER E EMENDA – Como ler e responder às pendências.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_875960.pdf	14/05/2017 20:32:00		Aceito
Outros	termo_comp_inicio_pesq.pdf	14/05/2017 20:31:10	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	questionario_sensorial.docx	14/05/2017 20:30:43	Suélyn Féderle	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_cep_detalhado_final.docx	09/05/2017 21:17:08	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	termo_confidencialidade.pdf	09/05/2017 21:06:36	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	responsabilidades_projeto.pdf	09/05/2017 21:04:32	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	declar_uso_especifico.pdf	09/05/2017 21:03:44	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	analise_merito.pdf	09/05/2017 21:02:43	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	check_list.pdf	09/05/2017 21:01:57	Suélyn Féderle	Aceito
Declaração de Pesquisadores	oficio_pesquisador.pdf	09/05/2017 21:00:02	Suélyn Féderle	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_2.pdf	09/05/2017 20:32:12	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	SolicitacaodealteracaorespprincFABIO.pdf	03/05/2017 13:19:01	Gilse Elisangela da Silva de Souza	Aceito
Outros	NotificaaopesquisadorFABIO.pdf	03/05/2017 13:19:01	Gilse Elisangela da Silva de Souza	Aceito
Outros	alteracao_pesq_respons.pdf	02/05/2017 20:23:37	Suélyn Féderle	Aceito
Outros	ata_aprovacao.pdf	24/03/2017 19:49:48	Suélyn Féderle	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Declaração de Instituição e Infraestrutura	concordancia_serv_envolvidos.pdf	08/03/2017 21:02:42	Suélyn Féderle	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.docx	08/03/2017 21:01:20	Suélyn Féderle	Aceito
Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/03/2017 21:01:20	Suélyn Féderle	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 31 de Maio de 2017

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Professor Seigi Murakami e Suélyn Féderle, respectivamente professor e aluna de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, consumidor de cosméticos a participar de um estudo intitulado Desenvolvimento de *Blends* de Óleos Essenciais com Potencial Antimicrobiano e Antioxidante, pesquisa que busca desenvolver fragrâncias naturais para cosméticos.

a) O objetivo desta pesquisa é avaliar a agradabilidade e aceitação de óleos essenciais para cosméticos.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário avaliar olfativamente óleos essenciais em fita olfativa e avaliar olfativamente 2 a 3 cremes corporais contendo as fragrâncias desenvolvidos com os óleos essenciais.

c) Para tanto você deverá comparecer no nas dependências do curso de Farmácia para avaliar os óleos essenciais e cremes e responder o questionário referente a eles o que levará aproximadamente 30 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a cansaço olfativo. Neste caso, você deve fazer intervalos de 1 minuto a cada 3 amostras avaliadas.

e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser reação alérgica (respiratória ou dérmica) à fragrância ou aos componentes da loção. Neste caso, você deve parar imediatamente a avaliação e comunicar os pesquisadores que estarão aplicando a pesquisa (Suélyn Féderle e Fábio Seigi Murakami).

f) O benefício esperado com essa pesquisa é participar de um estudo que busca trazer maior sustentabilidade ao desenvolvimento de cosméticos. Nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

g) A pesquisadora Suélyn Féderle e o Professor Fábio Seigi Murakami, responsável por este estudo, poderão ser localizados nos laboratórios de Tecnologia Farmacêutica e Controle Microbiológico II do Curso de Farmácia da UFPR, Campus Jardim Botânico, Rua Professor Lothário Meissnerm, 632, pelos e-mails suelyn.federle@yahoo.com.br ou fsmurakami@ufpr.br ou ainda pelo telefone (41) 992219260 no horário de 8h às 17h para

Participante da Pesquisa _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
Orientador _____

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD
Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |
cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (pesquisadores dos estudos). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade

l) O material obtido – questionário – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será destruído/descartado ao término do estudo, dentro de 2 meses.

m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação

o) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

p) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ___/___/17

Assinatura do Participante de Pesquisa

Fábio Seigi Murakami – Pesquisador Principal

Participante da Pesquisa _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
Orientador _____

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD
Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |
cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259