



LUCILENE FERNANDES SILVA

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha pulegium*
(L). L., *Corymbia citriodora* E *Cymbopogon citratus*,
INCORPORADOS EM GÉIS ANTISSÉPTICOS**

LAVRAS – MG

2017

LUCILENE FERNANDES SILVA

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* E *Cymbopogon citratus*,
INCORPORADOS EM GÉIS ANTISSÉPTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora
Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a)
autor(a).**

Silva, Lucilene Fernandes.

Propriedades físico-químicas e atividades biológicas de óleos essenciais de *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*, incorporados em géis antissépticos / Lucilene Fernandes Silva. - 2017.

85 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Poejo. 2. Eucalipto Limão. 3. Capim Limão. 4. Produtos Naturais. 5. Higienização das mãos. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Batista, Luís Roberto. III. Título.

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* E *Cymbopogon citratus*,
INCORPORADOS EM GÉIS ANTISSEPTICOS**

**PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
ESSENTIAL OILS OF *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon
citratus*, INCORPORATED IN ANTISEPTIC GELS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de abril de 2017.

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Dra. Celeste Maria Patto de Abreu | UFLA/MG |
| Dr. Luís Roberto Batista | UFLA/MG |
| Dr. David Lee Nelson | UFVJM/MG |
| Dr. Luiz Roberto Marques Albuquerque | UFVJM/MG |

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2017**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades a mim destinadas, por todos os momentos, lições, amizades e desafios colocados em minha vida.

À minha família, especialmente minha mãe, Terezinha Rosângela da Silva, e meu pai, João Marcelino da Silva, por todos os esforços e não foram poucos para que eu chegasse até aqui; todos os conselhos, broncas, carinho, amor, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida e apoio incondicional. Aos meus irmãos, Edilson Marcelino Silva e Wanderléia Fernanda Silva, pelas brigas, carinho, amizade, apoio e por sempre me incentivarem a continuar.

À minha orientadora, professora Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos acadêmicos, pela dedicação mostrada durante todos esses anos de convivência, pela competência, apoio, correções e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, por permitirem a realização deste trabalho, e a todos que contribuíram de alguma forma para conclusão do mesmo.

Ao meu coorientador, professor Luís Roberto Batista, pelas idéias, paciência, disponibilidade, confiança, disponibilização do laboratório e reagentes para execução dos experimentos e toda a contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Josefina Aparecida de Souza, pela amizade e apoio constante.

Aos amigos e colegas do laboratório de Química Orgânica-Óleos Essenciais e Análises de Qualidade de Aguardente, pela convivência durante todos esses anos.

Aos amigos e colegas técnicos do Departamento de Química, por sempre me incentivarem a continuar.

Aos professores do Departamento de Química pela paciência e ensinamento adquiridos durante minha graduação, mestrado, doutorado e como servidora do departamento.

A todos os amigos de infância, do curso, do departamento, que sempre torcem para que nossos sonhos se tornem realidade.

RESUMO

Os óleos essenciais constituem um importante grupo fitoquímico constituído por metabólitos secundários utilizados nas indústrias com ênfase nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica. Os atributos aromáticos e as atividades biológicas dessas substâncias os colocam atualmente em posição de destaque. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*, desenvolver formulações antissépticas de uso tópico na forma de gel com adição dos óleos essenciais incorporados às bases hidroxietilcelulose e carboxipolimetileno, bem como a avaliação das atividades físico-química, antibacteriana, fosfolipásica e os efeitos sobre eritrócitos humanos. Os óleos essenciais foram obtidos das folhas frescas de *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* e extraídos por hidrodestilação empregando o aparelho de Clevenger modificado. Foram caracterizados e quantificados por CG/EM e CG/DIC, respectivamente. As avaliações físico-químicas foram realizadas avaliando-se o pH, testes de liberação, espalhabilidade, estabilidade em centrífuga e densidade; além de estudar as atividades antibacteriana (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), irritação cutânea, fator de proteção solar, atividade fosfolipásica, efeito sobre eritrócitos e avaliação da atividade microbiológica (contaminação dos géis). O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou como constituintes majoritários pulegona, mentol e mentona e os óleos essenciais de *C. citriodora* e *C. citratus* apresentaram geranial e neral. Os resultados mostraram que os géis de carboxipolimetileno incorporados com óleos essenciais apresentaram menores variações nas propriedades físico-químicas. Comparando o efeito da incorporação dos óleos essenciais aos géis, foi possível observar que os géis sem a adição de óleos mantiveram por mais tempo a característica referente ao pH. No teste de liberação, a diálise mostrou que o gel *M. pulegium*-hidroxietilcelulose apresentou resultados mais expressivos, seguido dos géis *C. citriodora*-carboxipolimetileno e *C. citratus*-carboxipolimetileno. A viscosidade dos géis até 30 dias apresentou decréscimo reduzindo a espalhabilidade, contudo a partir de 60 dias todos se tornaram mais viscosos. O pH apresentou redução para todas as formulações testadas, também mostrando perda de estabilidade dos géis. Diante dos ensaios biológicos foi possível observar que comparados ao antisséptico comercial, álcool em gel, as formulações apresentaram irritação em menor grau e pelos testes de hemólise e fosfolipase, não foi verificada toxicidade dos produtos. Os géis não apresentaram fator de proteção solar e a atividade antibacteriana frente à *S. aureus* e *E. coli* foi significativa e superior que a do álcool em gel, além desses parâmetros, os géis não apresentaram contaminação. Os géis a base de óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* apresentaram características de interesse para a produção de novos produtos e com potencial antisséptico.

Palavras-chave: Poejo. Eucalipto limão. Capim limão. Produtos naturais. Higienização das mãos.

ABSTRACT

The essential oils constitute an important phytochemical group composed of secondary metabolites used in the industries with emphasis in the alimentary, cosmetic and pharmaceutical areas. The aromatic attributes and the biological activities of these substances put them today in a prominent position. The objectives of this work were to chemical characterize the essential oils of *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*, develop topical antiseptic formulations in the form of gel with the addition of the essential oils incorporated into the hydroxyethylcellulose and carboxypolymethylene bases, as well as the evaluation of physicochemical, antibacterial, phospholipase activities and effects on human erythrocytes. The essential oils were obtained from the fresh leaves of *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* and extracted by hydrodistillation using the modified Clevenger apparatus. They were characterized and quantified by CG / MS and CG / DIC, respectively. The physico-chemical evaluations were performed by evaluating the pH, release tests, spreadability, centrifugal stability and density; in addition to studying the antibacterial activities (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), skin irritation, sun protection factor, phospholipase, effect on erythrocytes and evaluation of microbiological activity (contamination of gels). The essential oil of *M. pulegium* presented as main constituents pulegone, menthol and menthone and the essential oils of *C. citriodora* and *C. citratus* presented geranial and general. The results showed that carboxypolymethylene gels incorporated with essential oils had lower variations in physico-chemical behavior. Comparing the effect of the incorporation of the essential oils to the gels, it was possible to observe that the gels without the addition of oils maintained for longer the characteristic referring to the pH. In the release test, dialysis showed that the *M. pulegium*-hydroxyethylcellulose gel presented more expressive results, followed by gel *C. citriodora*-carboxypolymethylene and *C. citratus*-carboxypolymethylene. The viscosity of the gels up to 30 days showed a decrease reducing the spreadability, however from 60 days all became more viscous. The pH presented reduction for all formulations tested, also showing loss of stability of the gels. Before the biological tests it was possible to observe that, compared to the commercial antiseptic, gel alcohol, the formulations presented irritation to a lesser degree and by the hemolysis and phospholipase tests, no toxicity of the products was verified. The gels did not present a sun protection factor and the antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* was significant and superior than that of alcohol in gel, besides these parameters, the gels did not present contamination. The essential oils gels of *M. pulegium*, *C. citriodora* and *C. citratus* presented characteristics of interest for the production of new products with antiseptic potential.

Keywords: Poejo. Lemon Eucalyptus. Lemon Grass. Natural products. Hand hygiene.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| PRIMEIRA PARTE | 8 |
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 9 |
| 2.1 Higienização das mãos: busca por novos produtos | 9 |
| 2.2 Bactérias | 11 |
| 2.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 2.3 Óleos essenciais | 15 |
| 2.4 Biossíntese de metabólitos secundários encontrados nos óleos essenciais..... | 16 |
| 2.5 Gênero <i>Mentha</i> | 30 |
| 2.5.1 <i>Mentha pulegium</i> (L). L..... | 31 |
| 2.6 Gênero <i>Corymbia</i> | 33 |
| 2.6.1 <i>Corymbia citriodora</i> | 33 |
| 2.7 Gênero <i>Cymbopogon</i> | 35 |
| 2.7.1 <i>Cymbopogon citratus</i> | 35 |
| 2.8 Fitocosméticos | 36 |
| 2.9 Gel | 37 |
| 2.9.1 Carboxipolimetileno (Carboxipolimetileno 940P)..... | 38 |
| 2.9.2 Hidroxietilcelulose (Hidroxietilcelulose® 250)..... | 39 |
| 3 CONCLUSÃO | 39 |
| 4 REFERÊNCIAS | 40 |
| SEGUNDA PARTE – ARTIGOS | 46 |
| ARTIGO 1 – Desenvolvimento de formulações antissépticas de uso tópico e suas atividades físico químicas empregando os óleos essenciais extraídos de <i>Mentha pulegium</i>, <i>Corymbia citriodora</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> | 46 |
| ARTIGO 2 – Atividades biológicas de antissépticos a base de óleos essenciais | 64 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins medicinais é bastante difundida. Com o desenvolvimento da tecnologia, aliado ao interesse em se confirmar o conhecimento na medicina popular, as plantas medicinais têm tido seu valor terapêutico pesquisado intensamente. Entre os países que compõem a América do Sul, o Brasil se encontra em posição privilegiada em relação à variedade em sua flora. Entre tantos compostos produzidos pelas plantas, os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais que estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal.

Tem sido estabelecido cientificamente que os óleos essenciais possuem propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, inseticida, cosmética, entre outras.

Dados da Embrapa (2016) mostram que o Brasil tem uma importante posição no comércio de óleos essenciais, sendo o quarto maior produtor mundial e o primeiro em óleos essenciais cítricos.

Os estudos das potencialidades biológicas e farmacológicas dos óleos essenciais os caracterizam como, substâncias promissoras, principalmente para produção de antissépticos para mãos devido as suas atividades antibacterianas. Sabe-se que as mãos constituem a principal via de transmissão de micro-organismos pois a pele é um possível reservatório de diversos micro-organismos, que podem se transferir de uma superfície para outra, por meio de contato direto (pele com pele), ou indireto, através do contato com objetos e superfícies contaminados (BOYCE; PITTET, 2002). Os óleos essenciais configuram uma alternativa que vêm ganhando espaço devido ao fato de serem substâncias com baixo peso molecular, voláteis, não permanecendo no ambiente e, na maioria das vezes, apresentarem baixa toxicidade para mamíferos.

Entre as espécies que concentram os elementos voláteis nas folhas, destacam-se *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*, como importantes fontes de compostos biologicamente ativos. Silva et al. (2015a) evidenciaram atividade antibacteriana para duas espécies de *Mentha*; Barros et al. (2015) constataram a desinfecção total das espécies de *E. coli* e *S. Choleraesuis* tratados com óleo essencial de plantas do gênero *Cymbopogon*, e Lorenzi et al. (2003) enfatizam a importância do óleo essencial de *Corymbia citriodora* em indústria de perfumaria e como desinfetantes, constatando, assim, o potencial antisséptico dessas plantas.

Existem aspectos relevantes nos óleos essenciais que ainda necessitam ser verificados para a produção de novos produtos, como a sua toxicidade. Os consumidores atualmente buscam por produtos naturais com menor toxicidade possível; as novas tecnologias e a ampla concorrência são parâmetros necessários para o desenvolvimento constante de novos produtos e serviços. Portanto, a finalidade dos novos produtos está intimamente relacionada à percepção de seu valor pelos consumidores.

Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho analisar a composição química dos óleos essenciais de *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*, preparar antissépticos incorporados com os óleos essenciais dessas plantas, avaliar suas propriedades físico-químicas, testar a toxicidade, o potencial de irritação, a atividade antibacteriana e a contaminação dos géis preparados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Boas práticas de higiene pessoal para manipulação de alimentos e ambientes hospitalares

O aumento crescente de micro-organismos resistentes, principalmente das bactérias tem acentuado a necessidade de adotar medidas de prevenção e controle como prioridade na redução da transmissão de patógenos. Entre as medidas preconizadas para esse controle, tem-se a higienização das mãos. A higienização das mãos é considerada a medida de controle mais importante e eficaz para prevenir a transmissão de patógenos. Mesmo essa técnica tendo implicações decisivas para reduzir/eliminar as contaminações, pesquisas mostram que esse princípio ainda é pouco aderido e os produtos encontrados no mercado para essa finalidade não apresentam grande eficácia (FIGUEIREDO et al. 2013; HO; ANSARI; PAGE, 2014; ANVISA, 2007).

A higiene das mãos tem sido reconhecida como medida mais importante para prevenir infecções em áreas hospitalares, alimentícias e em outros ambientes com grande acúmulo de pessoas. O reconhecimento da higienização das mãos como um elemento-chave para impedir a propagação de doenças infecciosas é considerada a medida mais eficaz para evitar transmissão cruzada e infecções, pois a lavagem das mãos pelos profissionais das áreas da saúde e alimentícia, com sabonete para eliminar os resíduos e a assepsia com antisséptico com intuito de reduzir os micro-organismos, permitem aumentar a segurança dos consumidores de alimentos manipulados e pacientes hospitalares, reduzindo a contaminação por esses micro-

organismos (OSUGI; KAWAGUCHI; HIROSHIMA, 2014; SLOANE; SHABAN; GILLESPIE, 2012).

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento crescente das doenças transmitidas por alimentos, com a expansão do comércio alimentar, o aumento do consumo de alimentos industrializados ou semiprontos, modificações dos hábitos alimentares e o aumento das refeições fora do domicílio. A falta ou higienização com produtos ineficazes dos profissionais que manipulam os alimentos em restaurantes e indústrias de alimentos são os principais responsáveis pela contaminação dos alimentos e, conseqüentemente, as infecções, sendo os agentes biológicos que causam contaminação, em sua maioria, bactérias e parasitos intestinais (CUSTÓDIO et al., 2009; MUNDY, 2008).

Além das infecções transmitidas por alimentos, também tem sido observada infecções relacionadas à assistência à saúde, que constituem um problema grave e um grande desafio, exigindo dos responsáveis pelos serviços de saúde ações efetivas de prevenção e controle. Tais infecções ameaçam tanto os pacientes quanto os profissionais de saúde, acarretando sofrimentos e resultando em gastos excessivos para o sistema de saúde (ANVISA, 2009).

Na perspectiva de reduzir a contaminação causada por micro-organismos, Kramer et al. (2002) mostraram que géis à base de álcool foram introduzidos em muitos hospitais para a assepsia das mãos. A investigação da eficácia antimicrobiana de dez géis e quatro tipos de produtos para lavagens das mãos de acordo com as normas europeias (EN 1500) mostrou que nenhum gel preencheu os requisitos EN 1500 dentro de 30 segundos de aplicação, ao passo que todas as lavagens foram satisfatórias. Formulações de gel têm sido propostas para reduzir o efeito de secagem dos álcoois e melhorar a eficiência da higiene das mãos. Outros autores, como Cheeseman et al. (2009), relataram que a eficácia de géis à base de álcool pode ser significativamente limitada contra o *S. aureus*. Neste trabalho, também foi destacado que o tempo de contato é um fator importante para garantir a eficácia de produtos à base de géis.

Shintre, Gaonkar e Modak (2006) estudaram o efeito sinérgico do farnesol com óleos essenciais *in vitro* para selecionar um sistema antimicrobiano eficaz para utilização em gel. Pelos ensaios, verificou-se que o farnesol e o óleo essencial de limão mostraram boa atividade sinérgica contra o *S. aureus*, em combinação com cloreto de benzalcônio e cloreto de benzetônio, mas não com outros agentes antimicrobianos. A partir desse resultado, foi, então, desenvolvido um antisséptico à base de álcool contendo uma combinação sinérgica de farnesol e cloreto de benzetônio e sua eficácia foi avaliada em voluntários humanos. Segundo o protocolo US FDA-TFM usando *Serratia marcescens* como um organismo marcador, foi

verificada atividade sobre a bactéria e ainda foi observado que não ocorreu irritação das mãos quando aplicado 10 vezes todos os dias, durante cinco dias consecutivos.

A assepsia (higienização preventiva), portanto, é um fator primordial para a saúde pública em locais de aglomeração de pessoas, em áreas de manipulação de alimentos e em áreas correlatas com o tratamento de saúde. Dessa forma, novos produtos com funções antissépticas mais eficazes necessitam ser produzidos para o processo de higienização das mãos. A busca para a solução desse problema de contaminação bacteriana coloca os óleos essenciais em destaque, já que muitos deles apresentam potencial antibacteriano.

2.2 Bactérias

Os seres humanos, assim como o ambiente, são colonizados por diversos micro-organismos, sendo as bactérias os que mais são encontrados. Elas revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais, sendo muitas delas benéficas para seu hospedeiro, proporcionando proteção contra patógenos e doenças. Contudo, há o inconveniente de existirem também bactérias prejudiciais aos seres humanos e animais. (ARANTES; ANDRADE; BARACHO, 2013).

As bactérias patogênicas têm causado grandes problemas resultantes principalmente da proliferação de micro-organismos resistentes aos principais antibióticos utilizados; esse fato está entre as ameaças mais graves para a saúde pública. Para o sucesso do tratamento antibacteriano com produtos industrializados contaminados pelas mãos dos manipuladores, necessita-se de uma antisepsia das mãos mais eficaz. Recentemente, o aparecimento de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos tem aumentado drasticamente. Dentro do grupo de bactérias resistentes às drogas, citam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Enterococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Silva et al. (2015b), realizando uma pesquisa em produtos comerciais vedados por embalagem de metal e plástica em dois estabelecimentos, observaram após 24 horas a presença de colônias bacterianas nos biscoitos e conservas, mostrando que os alimentos são comumente contaminados por bactérias pela falta ou higienização incorreta das mãos dos profissionais que os manipulam.

Assim como os alimentos, os ambientes hospitalares e de grande circulação de pessoas também apresentam alto nível de contaminação. Custódio et al. (2009), realizando avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de

Itumbiara/Goiás, observaram uma alta contaminação ($>10^6$ unidades formadoras de colônia) nas mãos dos enfermeiros, técnicos de enfermagem e auxiliares de enfermagem. A espécie *Staphylococcus coagulase-negativo* (44,5%) foi o micro-organismo mais isolado, seguido de *Staphylococcus aureus* (40,0%); cerca de 70,0% dos estafilococos foram resistentes à oxacilina. Neste estudo, não houve detecção de bacilos Gram-negativos. Dessa forma, os autores destacaram que houve uma alta contaminação por bactérias epidemiologicamente importantes no ambiente hospitalar, demonstrando a necessidade de maior frequência e cuidado na higienização das mãos.

A atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais tem sido descrita para uma ampla variedade de micro-organismos, tanto Gram-positivos (compostas por várias camadas de peptidoglicano na camada externa) quanto Gram-negativos (compostas por uma camada de peptidoglicano na camada externa), os quais respondem de forma distinta e dependente da composição química dos óleos (BOULANOUAR et al., 2013; BURT, 2004; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011).

Souza et al. (2016), pesquisando o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, encontraram como constituintes majoritários o geranial (43,77%); o neral (31,61%) e o β -mirceno (14,63%) e a concentração mínima bactericida frente a *Escherichia coli* enterotoxigênica foi de 1,0% de óleo essencial.

2.2.1 *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, caracteriza-se por não apresentar esporogenicidade, ser Gram-negativa, aeróbia ou anaeróbia facultativa, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas entre 44,5 – 45 °C (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

A *E. coli* é a principal representante do grupo dos coliformes fecais, sendo considerada como um dos agentes etiológicos de surtos de doenças transmitidas por alimentos. As cepas patogênicas dos micro-organismos são responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade (JAY, 2005). É conhecida pela sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, pois podem sobreviver em pH 2,5 até por 6 horas. Os coliformes fecais nos quais se inclui a bactéria *E. coli* são encontrados em ambientes sanitários e a não higienização das mãos de forma correta é o fator principal para contaminação de alimentos nas indústrias alimentícias (PONATH et al., 2016).

No ano de 2011, a Alemanha sofreu uma epidemia provocada pela bactéria *E. coli* em que foram registradas 35 mortes, sendo esse o surto mais grave de contaminação por essa bactéria registrada na Europa. Em toda a Alemanha, mais de 4 mil pessoas foram contaminadas e muitos sofreram sequelas ao longo da vida, com complicações renais e neurológicas (RASFF, 2014).

Vários surtos ocorridos nos Estados Unidos, Canadá e Japão foram associados ao consumo de hambúrgueres (CÂMARA, 2002). Em 2015, foi veiculada a notícia de que pelo menos 37 pessoas foram infectadas pela bactéria *E. coli* nos Estados Unidos, em uma epidemia ligada a uma rede de lanchonetes. O diagnóstico mostrou que 25 pessoas foram contaminadas por *E. coli* e, desse total, 9 foram hospitalizadas segundo as autoridades locais. Os serviços de saúde do Estado do Oregon identificaram 12 casos de *E. coli* em torno da cidade de Portland, provavelmente ligados à mesma rede de lanchonete (FRANCE PRESSE, 2015).

No Brasil, apesar das limitações do sistema de informações, há registros no sistema AIH/DATASUS de que mais de 600 mil internações ocorrem por ano devido à doença infecciosa intestinal, que pode ser causada por vírus, protozoários e a bactéria *E. coli*, causando quase 8 mil mortes, o que representa importante prejuízo à saúde da população (EDUARDO, 2008).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus*, pertence à família Micrococcaceae, e é formado por bactérias que exibem forma de cocos Gram-positivos, frequentemente encontradas na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, esses micro-organismos causam desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções graves (pneumonia, meningite e síndrome do choque tóxico) (SANTOS et al., 2007).

As linhagens de *Staphylococcus aureus* apresentam como característica a capacidade de seleção de micro-organismos resistentes a agentes antimicrobianos. A disseminação dos *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse micro-organismo, pois se adaptam rapidamente a diferentes ambientes (FATTOM et al., 2004). A bactéria *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais notórios, sendo responsável por 45% das toxinfecções em todo o mundo, causada pela não higienização das mãos de forma correta de profissionais da área da saúde e alimentícia (NETO; SILVA ; STANFORD, 2002).

Mizumachi et al. (2011), realizando um estudo em supermercados no Japão, demonstraram a presença de 52 cepas de *S. aureus* em alças de cestas de compras e 91 cepas nas mãos dos funcionários desses locais.

O grande número de infecções humanas provocadas por esse agente é uma causa importante de infecções relacionadas à falta de assistência à saúde, uma vez que acometem a pele, sistema respiratório, ósseo, distúrbios da articulação e endovascular. Esse fato é comprovado pela contaminação de 12 pacientes internados nos Estados Unidos, no ano de 2008. Esses pacientes foram monitorados e as estirpes contaminadoras de *S. aureus* apresentavam resistência à meticilina (MRSA) e à linezolida (LR), antibióticos utilizados para o controle da espécie bacteriana. Torna-se, portanto, necessária a introdução de novas classes de antimicrobianos, pois a *S. aureus* é capaz de crescer e produzir toxina em uma ampla margem de condições ambientais e em uma variedade de alimentos (FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006).

Nos Estados Unidos, em casos de surtos alimentares, a enterotoxina estafilocócica é comumente isolada, sendo relatados anualmente, em média, 185.00 casos (MUSTAFA; JAIN; AGRAWAL, 2009).

No Brasil, pesquisas realizadas no estado da Paraíba a partir dos dados da vigilância epidemiológica revelaram que o agente etiológico veiculado em 50% dos casos de queijos contaminados foi o *S. aureus* (RUWER; MOURA; GONÇALVES, 2011).

Carmo et al. (2003) relataram um caso de surto alimentar envolvendo *S. aureus* ocorrido no município de Passos-MG, onde 31 pessoas foram acometidas, apresentando sintomatologia de intoxicação alimentar. Os resultados da investigação epidemiológica revelaram a presença de isolados de *S. aureus* em panqueca de frango, sendo esse definido como o alimento responsável pela veiculação da toxina causadora da enfermidade. Além do alimento veiculador da infecção, “swabs” coletados dos colaboradores desenvolveram culturas isoladas de *S. aureus*, sendo considerados portadores assintomáticos e prováveis fontes de contaminação dos alimentos.

Jorgensen et al. (2005) mostraram que, em dezembro de 2003, na Noruega, 8 pessoas foram acometidas por infecção estafilocócica após almoço em escola infantil. As análises microbiológicas revelaram isolados de *S. aureus* em quantidades significativas.

Mais um caso de intoxicação estafilocócica foi relatado por Mustafa, Jain e Agrawal (2009), em que, após almoço em base militar, nos Estados Unidos, 94 militares foram acometidos. As amostras de vômito e fezes dos pacientes, assim como a tomada da geladeira, chão e prateleiras da cozinha, apresentaram colônias de *S. aureus coagulase positiva*,

mostrando, assim, que as mãos dos manipuladores poderiam estar contaminadas, transferindo as bactérias através da manipulação dos alimentos. Assim, pesquisas com o objetivo de explorar novos biocidas orgânicos, bem como o desenvolvimento e refinamento dos processos, têm se mostrado promissoras (SINGH; SINGH, 2012). Nesse contexto, os óleos essenciais, vêm sendo estudados.

2.3 Óleos essenciais

Entre todos os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os óleos essenciais são definidos como uma mistura complexa de substâncias voláteis e odoríferas com consistência oleosa. São líquidos à temperatura ambiente, embora, em alguns casos, sejam sólidos ou resinosos e geralmente incolores. Podem ser sintetizados por todas as partes da planta, ou seja, botões, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e casca, sendo armazenados em diferentes estruturas secretoras. A ISO (International Organization for Standardization) define óleo essencial como o produto obtido por destilação em água ou vapor de plantas, ou ainda, produtos obtidos por pressão de pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al., 2007). Por apresentarem em sua constituição substâncias instáveis, os óleos essenciais exibem alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido às reações na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que catalisam reações de decomposição e transformação.

Bandoni e Czepak (2008) constatam que a composição química dos óleos essenciais é alterada, variando as proporções de seus constituintes ou ainda transformando um constituinte em outro. Essas mudanças ocorrem de acordo com o quimiotipo e fatores ambientais (incidência de luz, temperatura) e ainda com o desenvolvimento da planta ou fatores genéticos, como a origem botânica.

Os óleos essenciais são formados por inúmeros compostos de origens biossintéticas, como hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos sulfurados. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; porém, geralmente um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Bakkali (2008), os constituintes majoritários nos óleos essenciais podem ser responsáveis pela atividade biológica; no entanto, a ação dos óleos essenciais também pode ser atribuída à ação sinérgica ou antagonista de vários componentes. Dessa

forma, as atividades biológicas que os óleos essenciais podem desempenhar os colocam em evidência para a produção de novos produtos.

O Brasil tem se destacado na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. Essa posição deve-se aos óleos essenciais de cítricos. No passado, o país teve destaque como exportador de óleos essenciais de pau-rosa, sassafrás e menta. Os incentivos governamentais são necessários, além da formalização de parcerias de Centros de Pesquisa e Universidades com a Iniciativa Privada, para que técnicas modernas de cultivo, seleção e melhoramento de plantas sejam desenvolvidas e aplicadas, de modo a se obter produtos com qualidade e preço para disputar o mercado internacional (EMBRAPA, 2016).

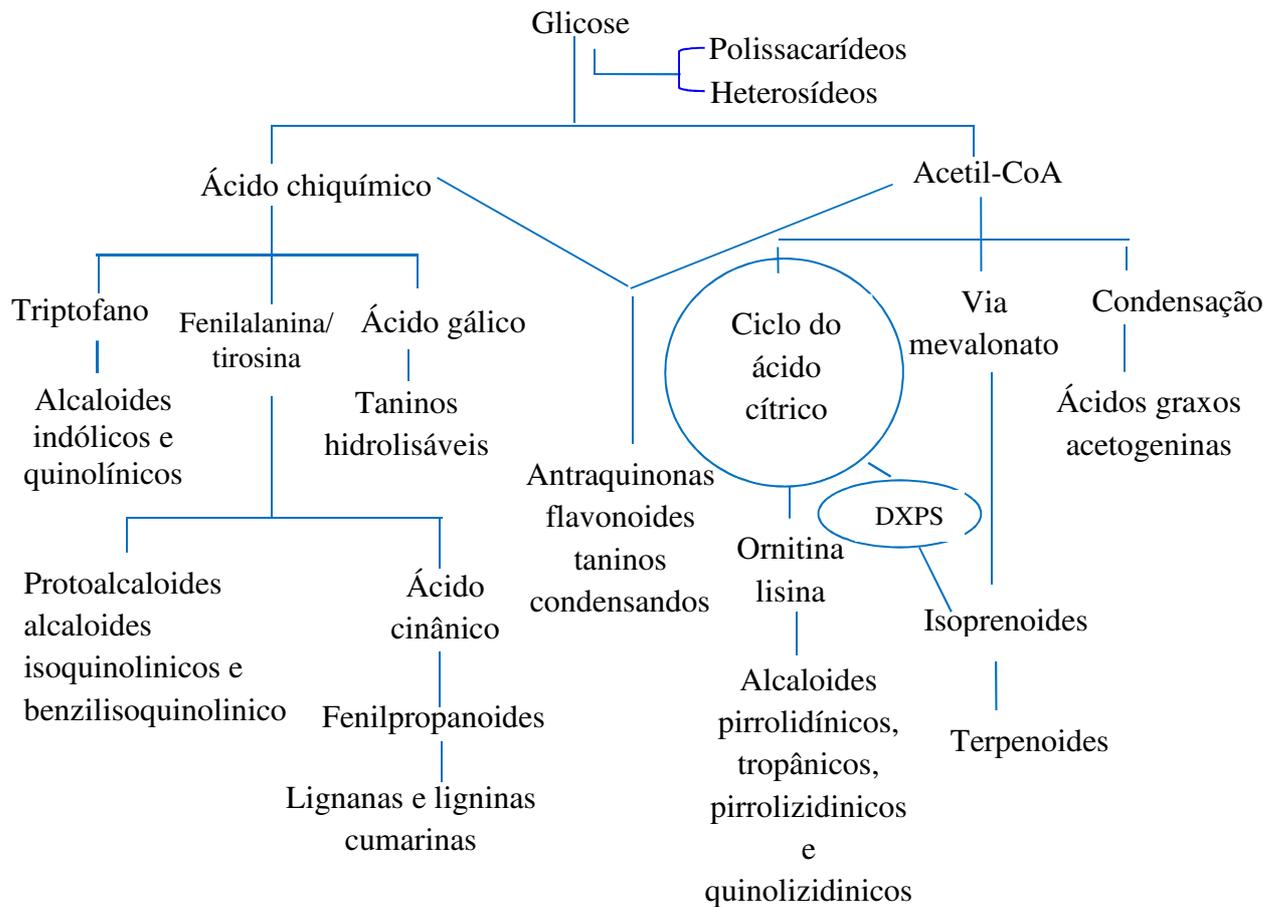
Esses relatos mostram que o Brasil é um grande produtor de óleos essenciais, podendo se destacar na produção de novos produtos, já que os constituintes químicos encontrados nesses óleos essenciais abrangem uma classe de metabólitos secundários com alto potencial biológico.

2.4 Biossíntese de metabólitos secundários encontrados nos óleos essenciais

A síntese dos metabólitos secundários encontrada nos óleos essenciais tem origem no metabolismo dos ácidos graxos e da glicose, sendo produzidos por meio de dois compostos: o ácido chiquímico e o acetil-CoA. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, que irão formar os fenilpropanoides.

Os derivados do acetato produzem os terpenoides, que são sintetizados a partir de cinco unidades de carbono denominadas isopreno e podem ser formados tanto pela via do mevalonato quanto pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Figura 1) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 1 - Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas



Fonte: Adaptado Simões (2007).

Os principais terpenoides encontrados nos óleos essenciais podem ser classificados em monoterpenos e sesquiterpenos. Os fenilpropanoides são encontrados em menor quantidade e tanto os derivados de terpenoides como os fenilpropanoides apresentam diferentes propriedades biológicas.

Os terpenos constituem um amplo grupo de metabólitos naturais, que quando denominados terpenoides, apresentam elementos adicionais, como o oxigênio. Os compostos terpênicos são encontrados em uma diversidade muito grande de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com grande variedade estrutural e atividades biológicas diversas.

A biossíntese dos terpenos pode ser dividida em 4 etapas: síntese do precursor fundamental, IPP (isopentenildifosfato); adições repetitivas do IPP para formação de uma série de homólogos difosfato; ação de enzimas específicas na produção dos esqueletos terpênicos; modificações enzimáticas secundárias dos esqueletos para originar funcionalidade

e uma grande diversidade de compostos (DEWICK, 2009). A via clássica do ácido mevalônico (Figura 2) envolve dois passos de condensação de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA aciltransferases e hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA) para produzir HMG-CoA. Em seguida, o HMG-CoA é reduzido pela HMG-CoA redutase, por um processo que depende de NADPH, formando os ácidos mevárdico e mevalônico. Esse último, por sua vez, é convertido a IPP, por meio de três fosforilações e uma descarboxilação. A IPP isomerase catalisa a conversão do isopentenildifosfato para dimetilalildifosfato (DMAPP) (LÜCKER, 2002).

Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato

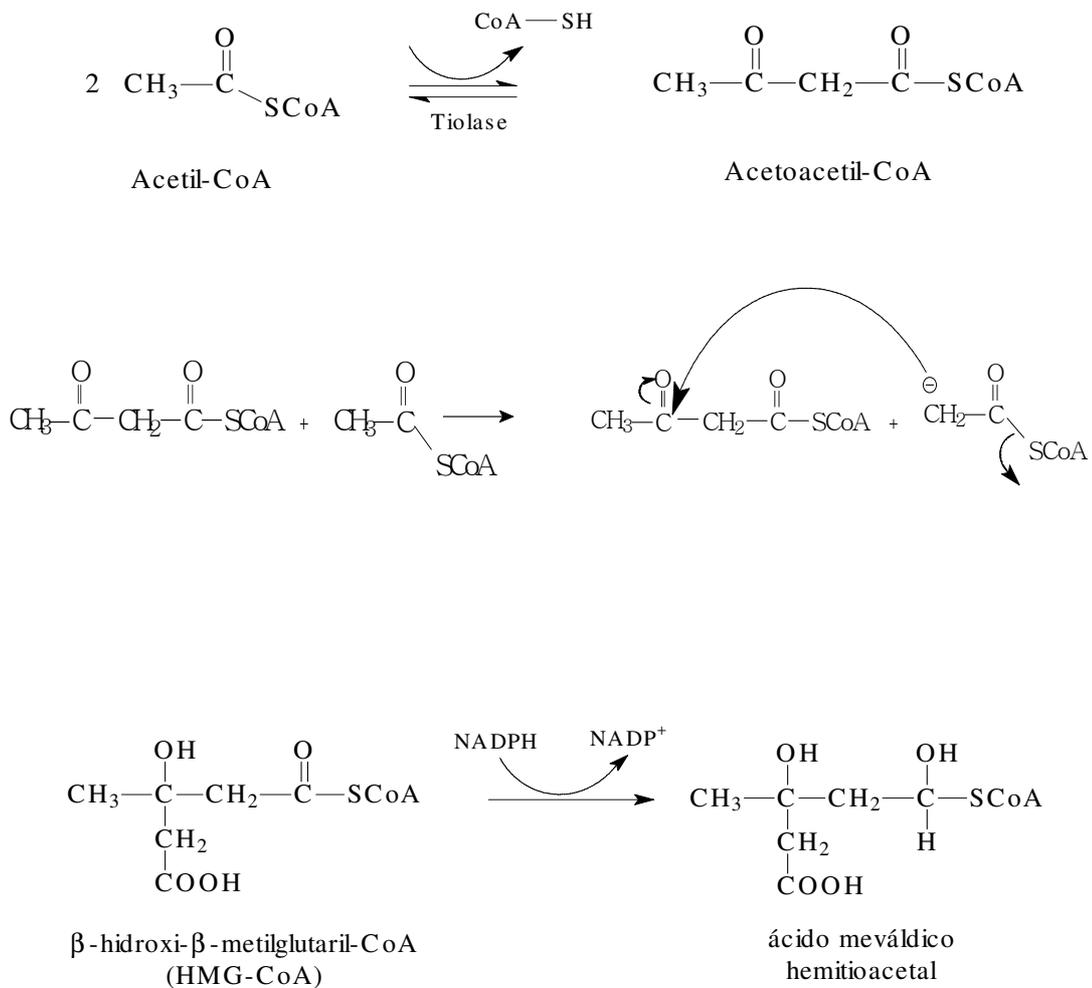


Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato (Continua)

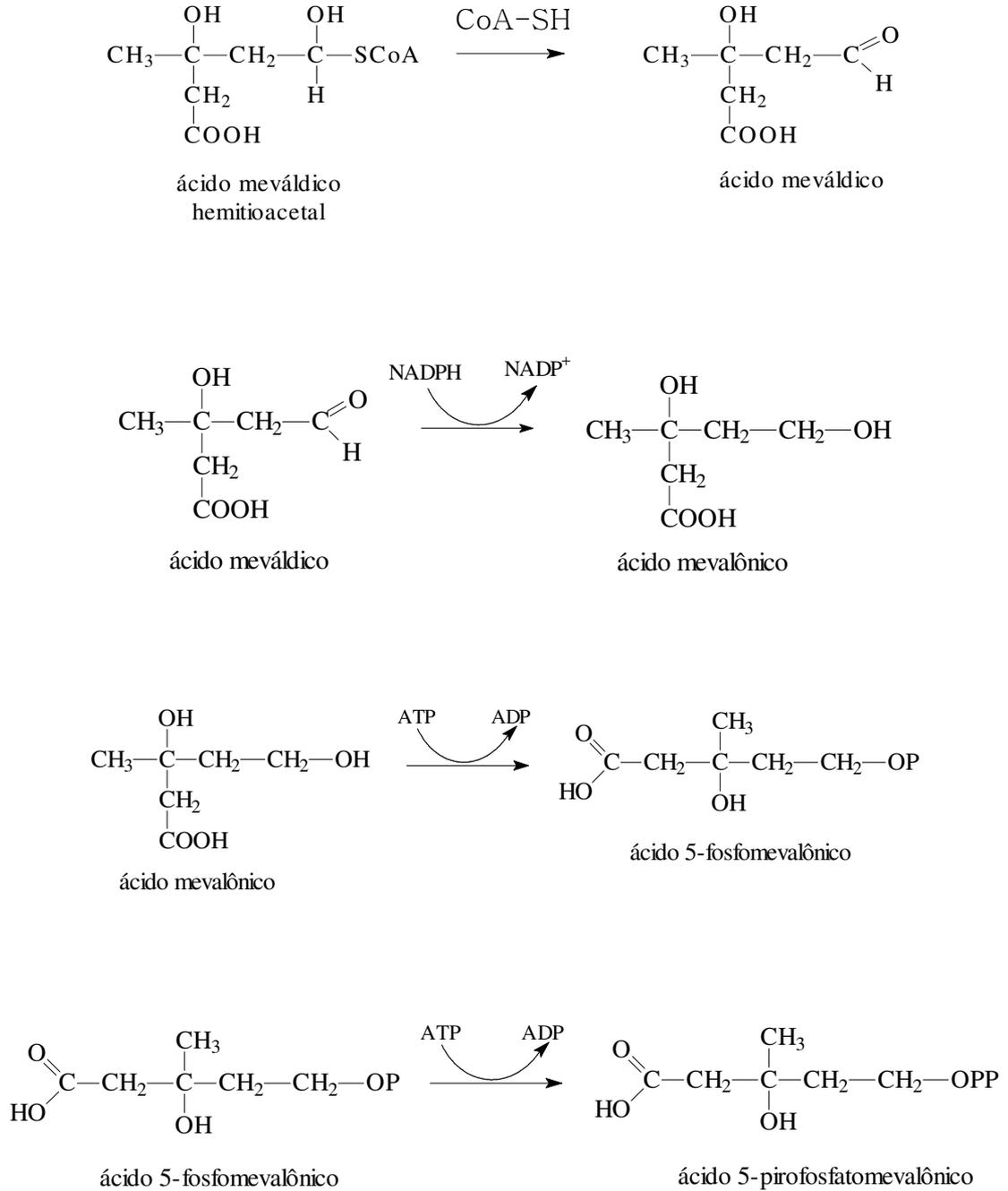
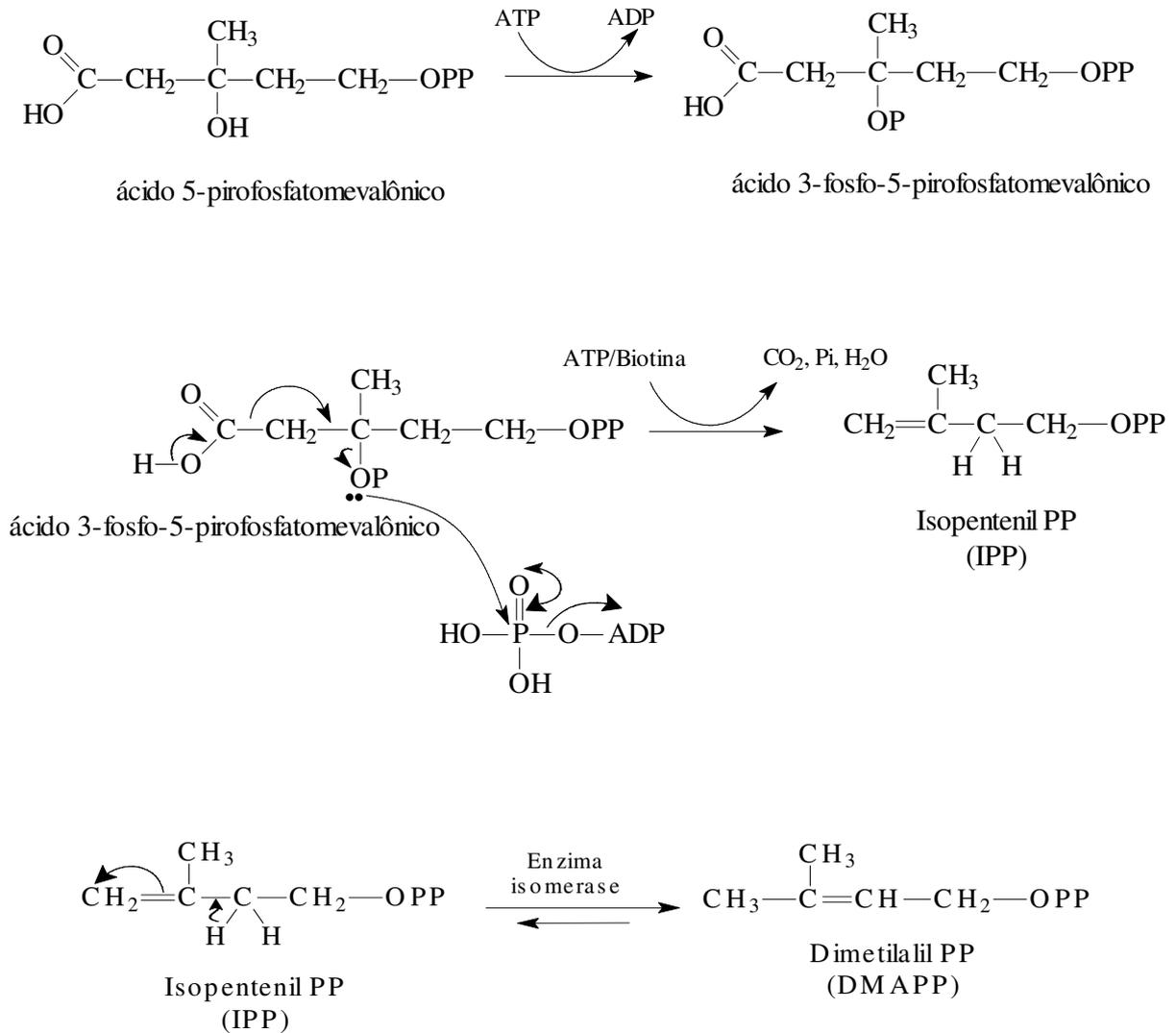


Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato (Continua)



Fonte: Adaptada de Dewick (2009), modificado por Teixeira (2016).

A via do DXPS (Figura 3) tem como precursor do IPP o composto 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, formado pela condensação de uma molécula de piruvato com o ânion ilídeo de enxofre e pela reação da enamina com o gliceraldeído-3-fosfato. Foi denominada por via MEP (2C-metil-D-eritritol-4-fosfato), formada pela 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutisomerase (DXR) a partir do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Em seguida, após sucessivas reações, o MEP é convertido no seu último intermediário, que é convertido em IPP e DMAPP. As moléculas de IPP e DMAPP (Figura 4) dão origem ao trans-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpenos, que representam, geralmente, 90% da composição

dos óleos essenciais. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (DEWICK, 2009).

Figura 3 - Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5P mevalonato

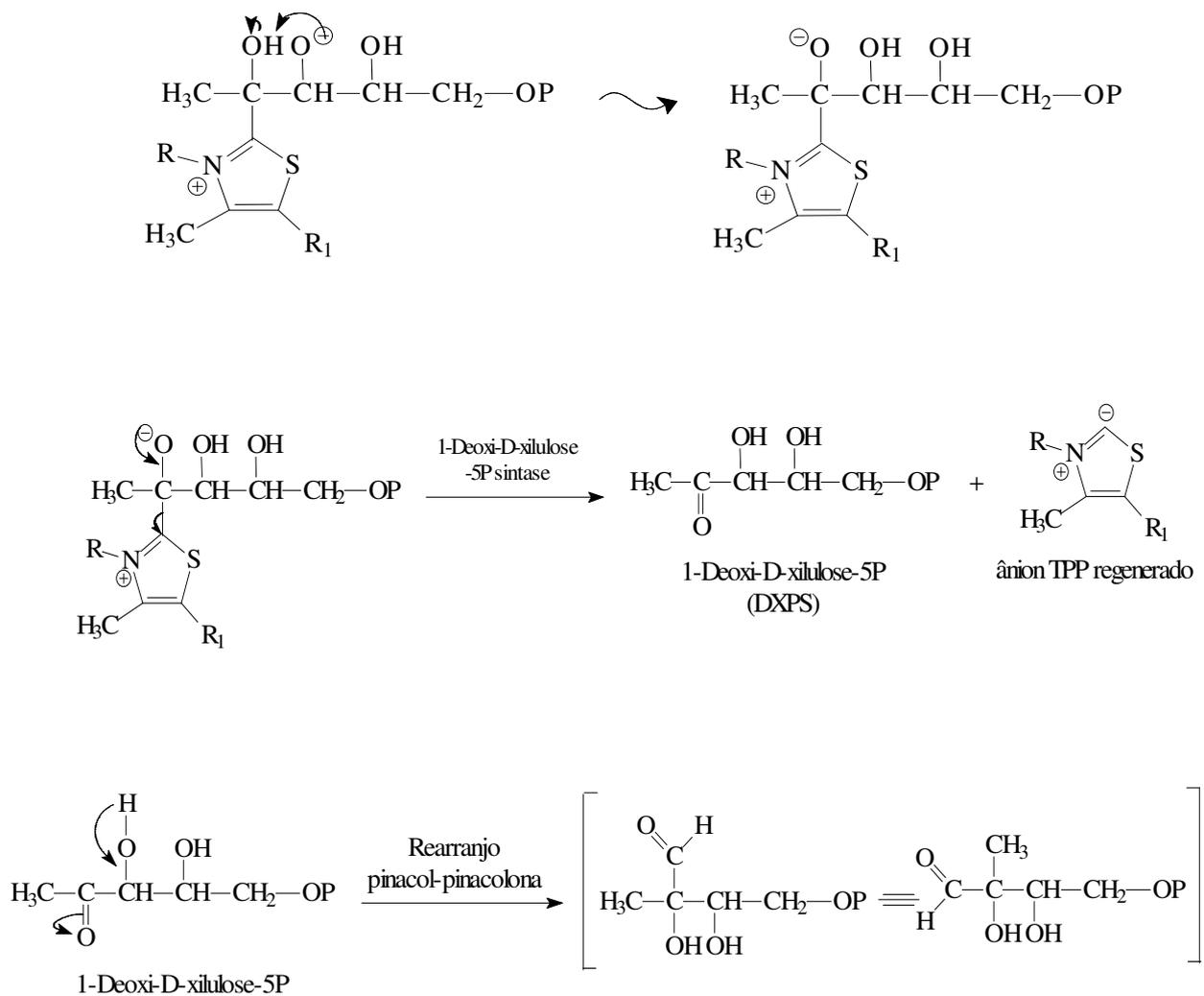


Figura 3 - Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5P mevalonato
(Continua)

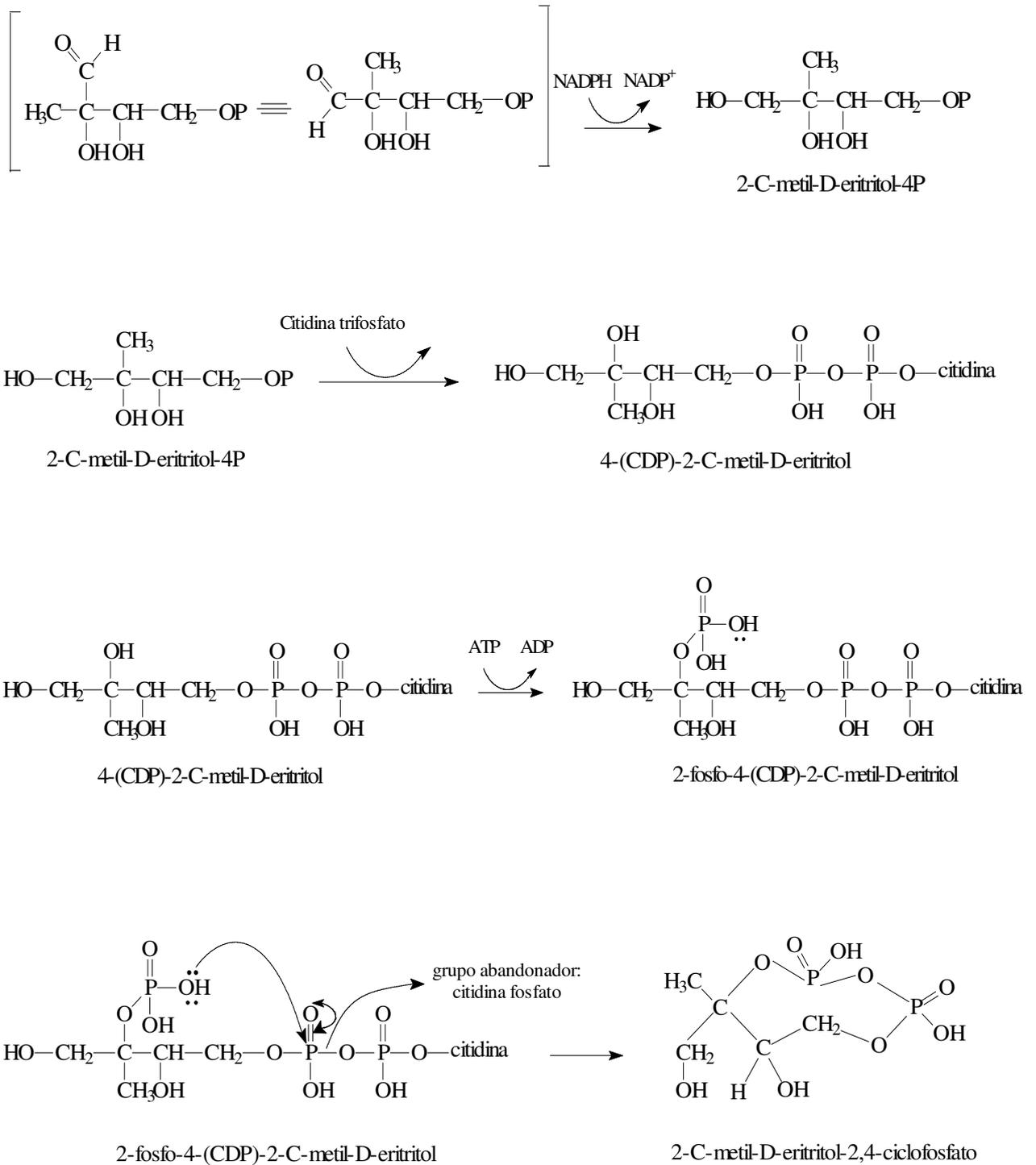
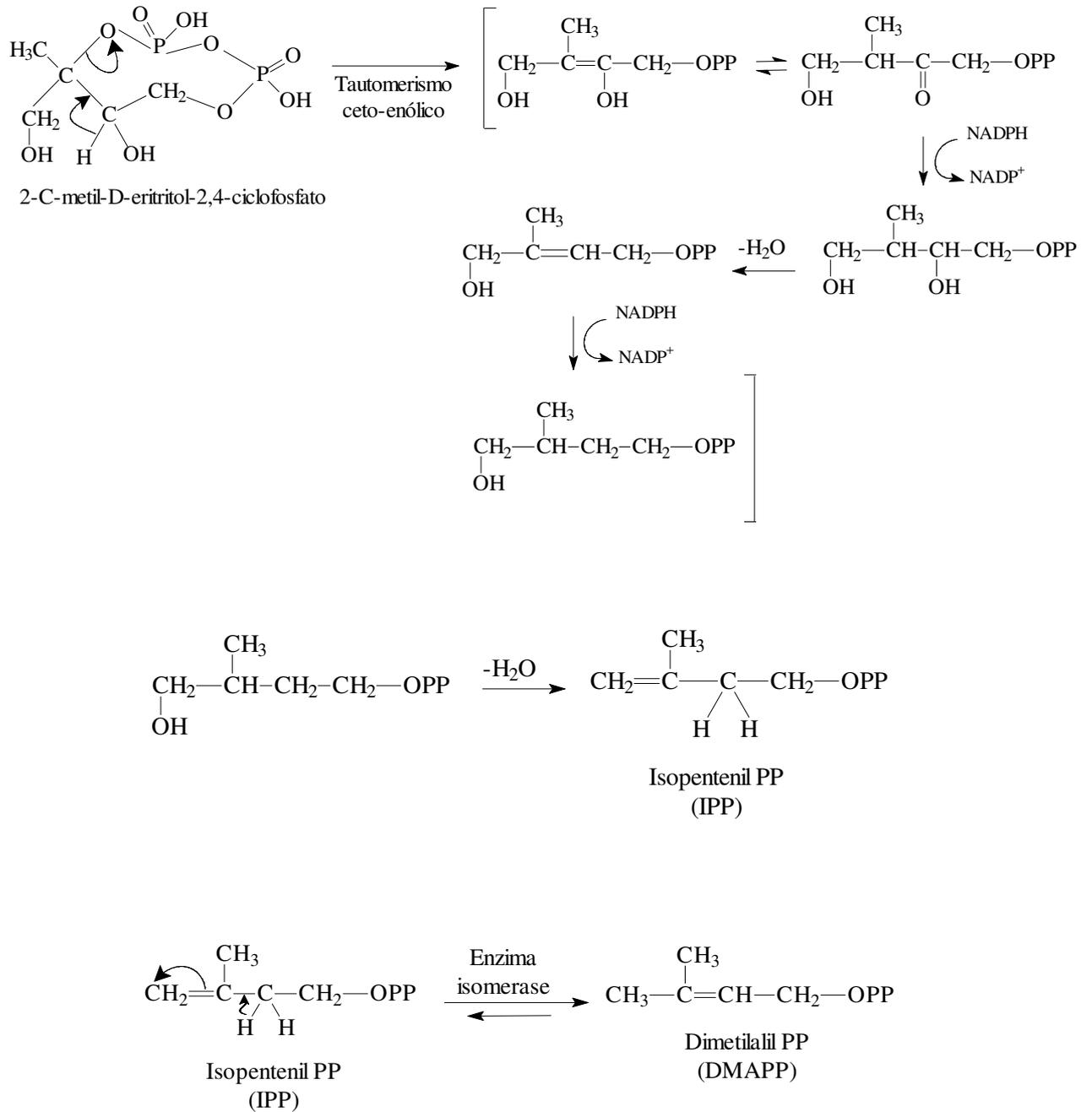


Figura 3 - Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5P mevalonato (Continua)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009), modificado por Teixeira (2016).

Figura 4 - Biossíntese de terpenos a partir da formação dos blocos isoprenoides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalilpirofosfato (DMAPP)

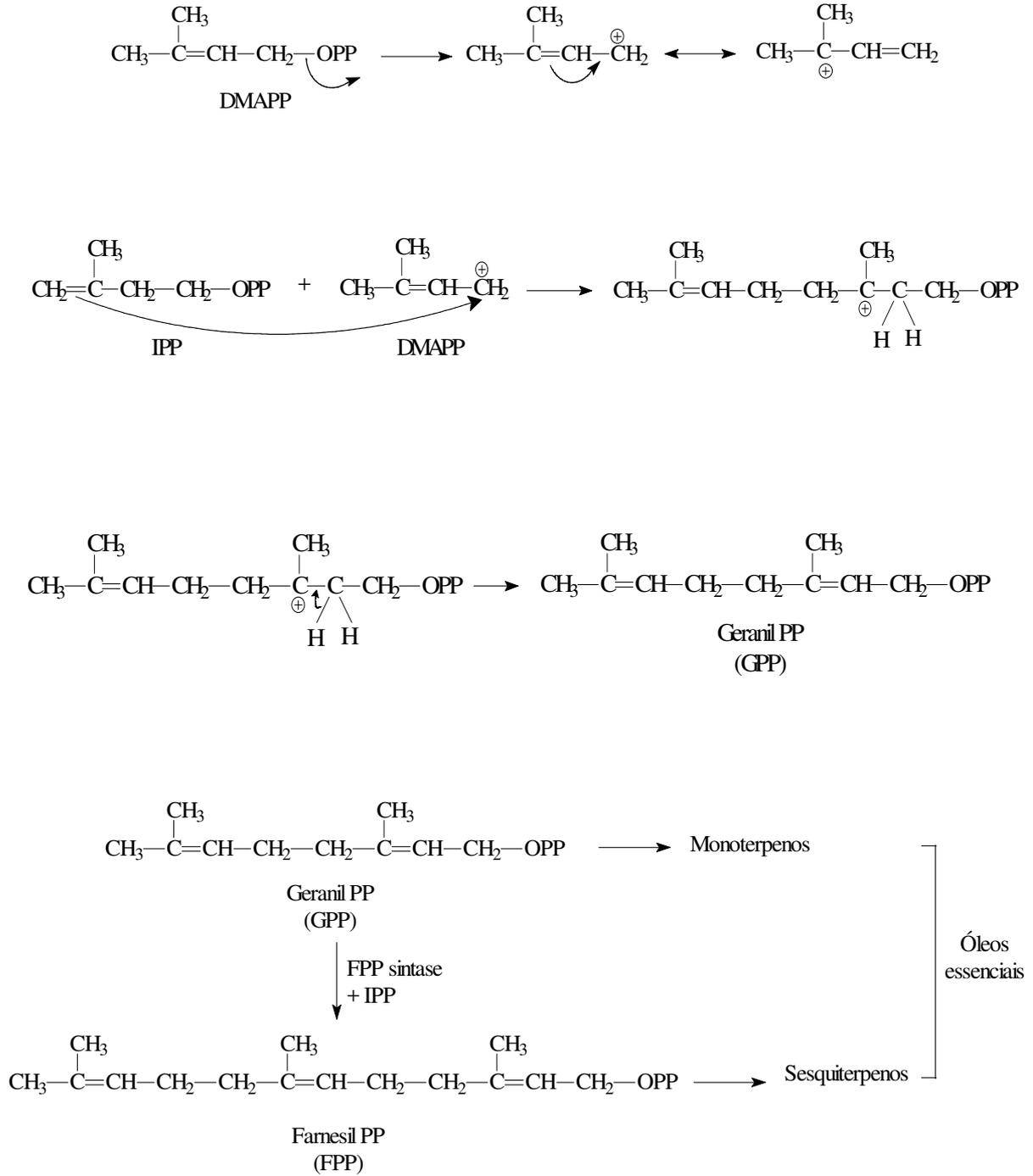
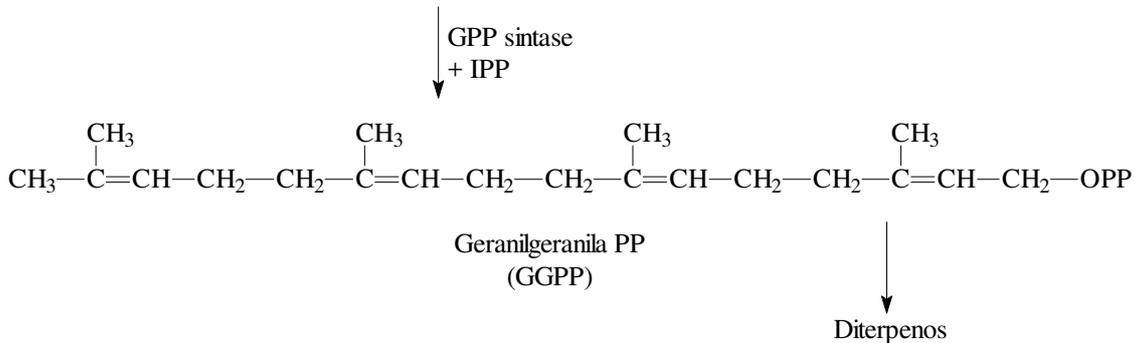


Figura 4 - Biossíntese de terpenos a partir da formação dos blocos isoprenoides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (Continua)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009), modificado por Teixeira (2016).

Além dos terpenos, os óleos essenciais contêm os fenilpropanoides, substâncias naturais largamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivados biossinteticamente do ácido chiquímico (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato (Figura 5). Pela junção do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico (PERES, 2004). O ácido corísmico é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina, os quais perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (Figura 6). Esses últimos, por meio de reduções enzimáticas, originam propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que, por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos fenilpropanoides presentes na constituição de muitos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

Figura 5 - Formação do ácido chiquímico a partir da condensação da eritrose-4-fostato e do fosfoenolpiruvato

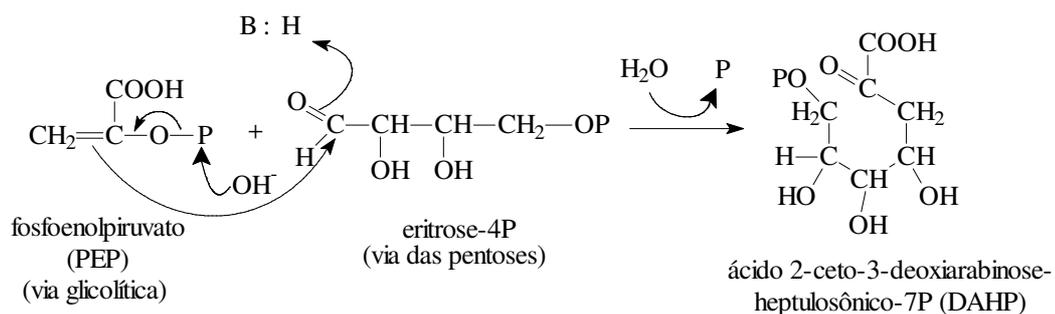
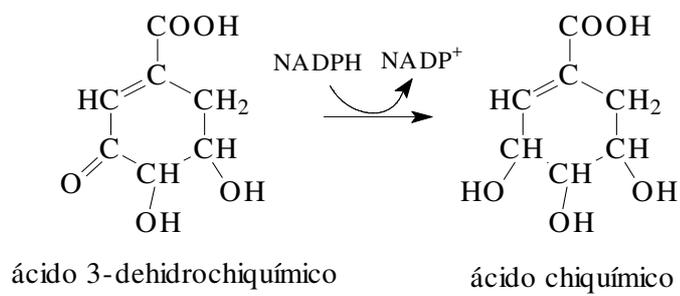
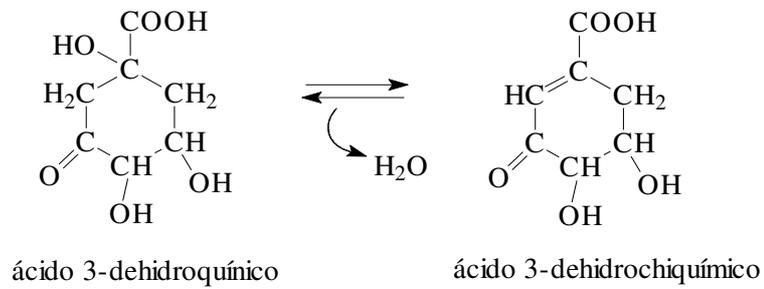
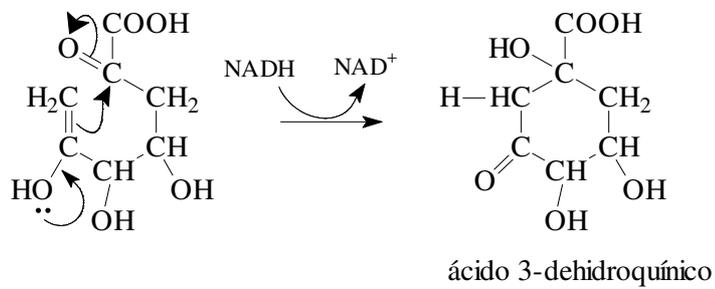
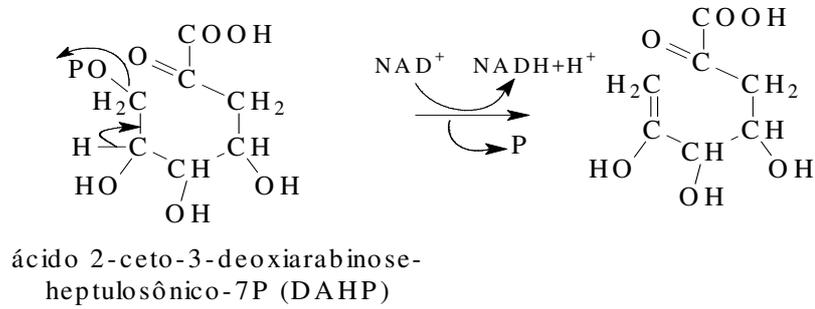


Figura 5 - Formação do ácido chiquímico a partir da condensação da eritrose-4-fosfato e do fosfoenolpiruvato (Continua)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009), modificado por Teixeira (2016).

Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico

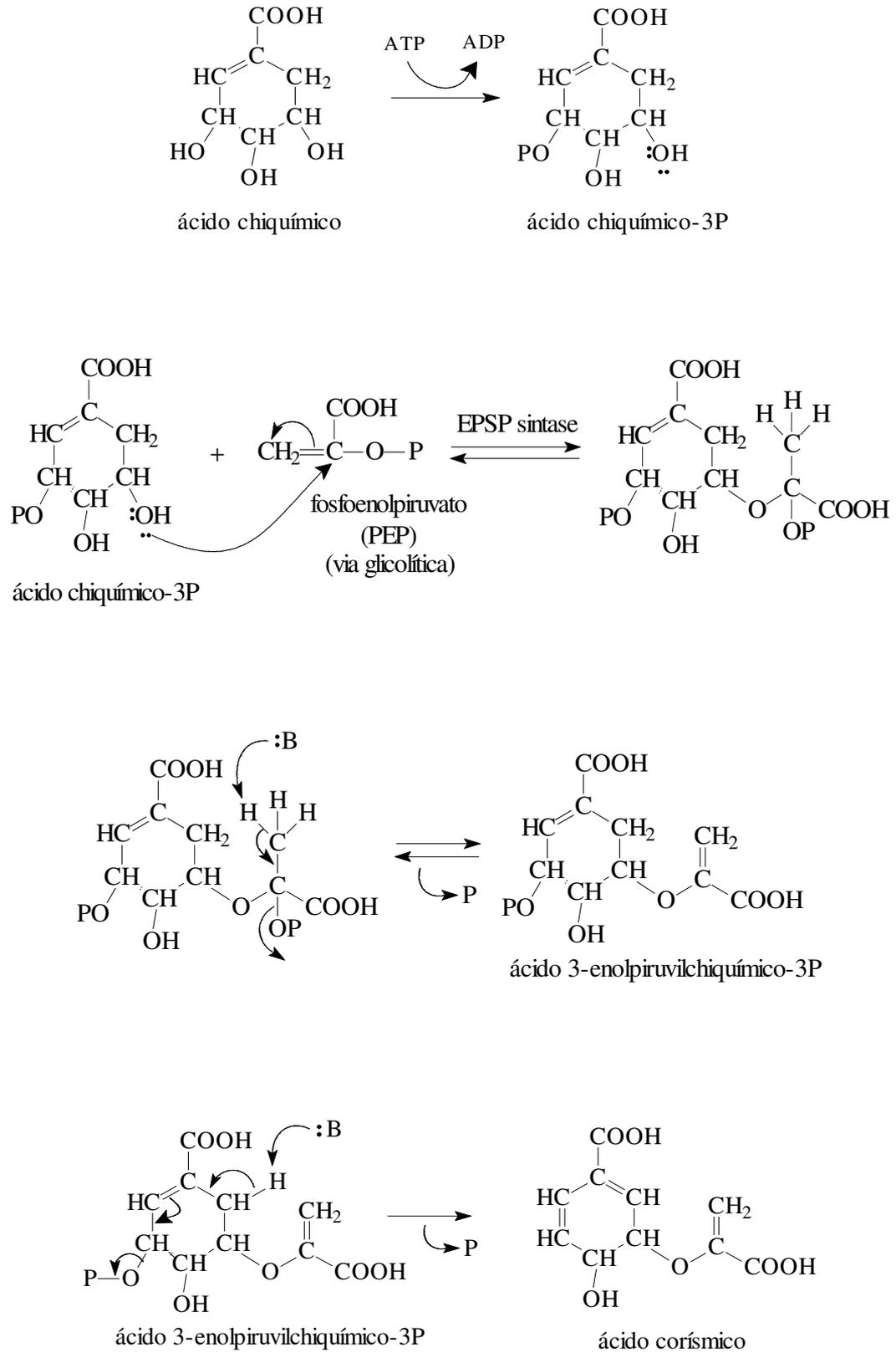


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico (Continua)

Síntese do aminoácido fenilalanina

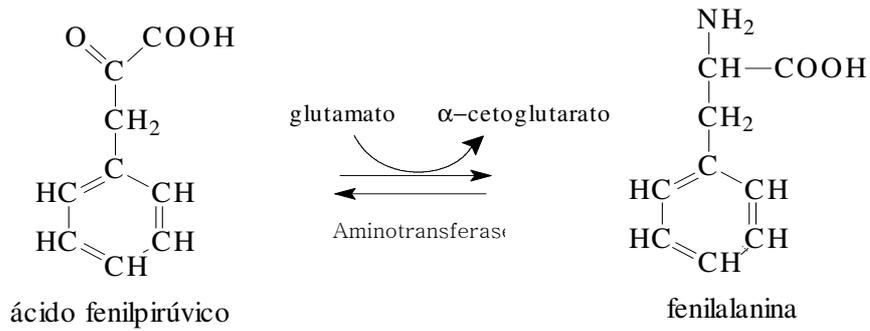
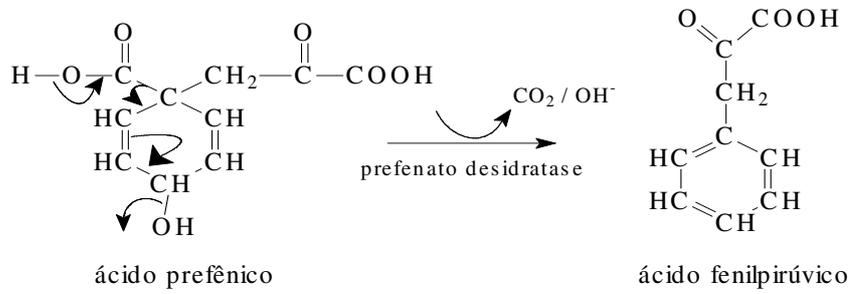
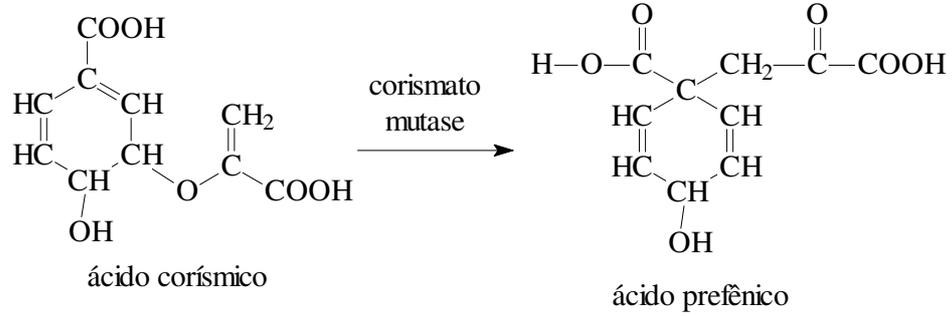


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico (Continua)

Síntese do aminoácido tirosina

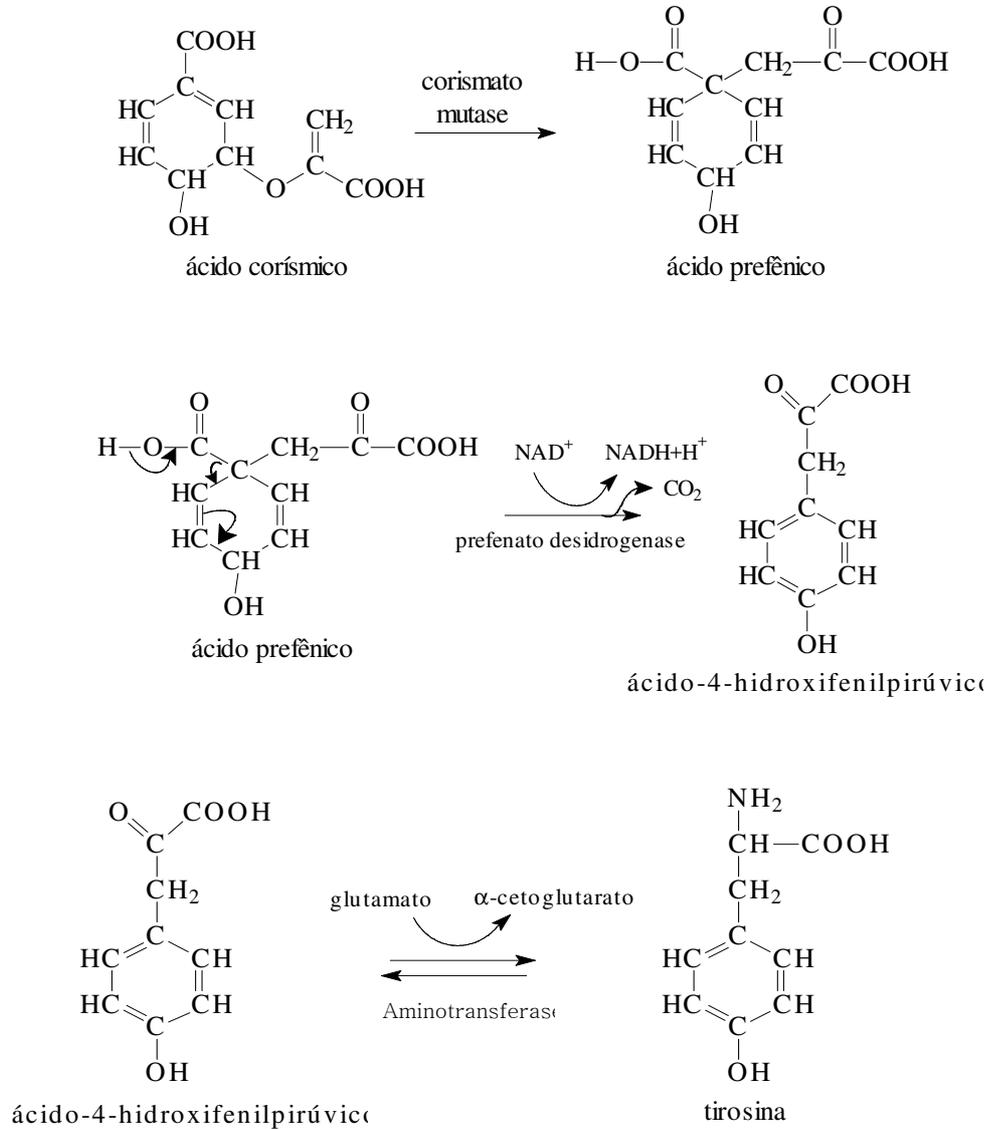
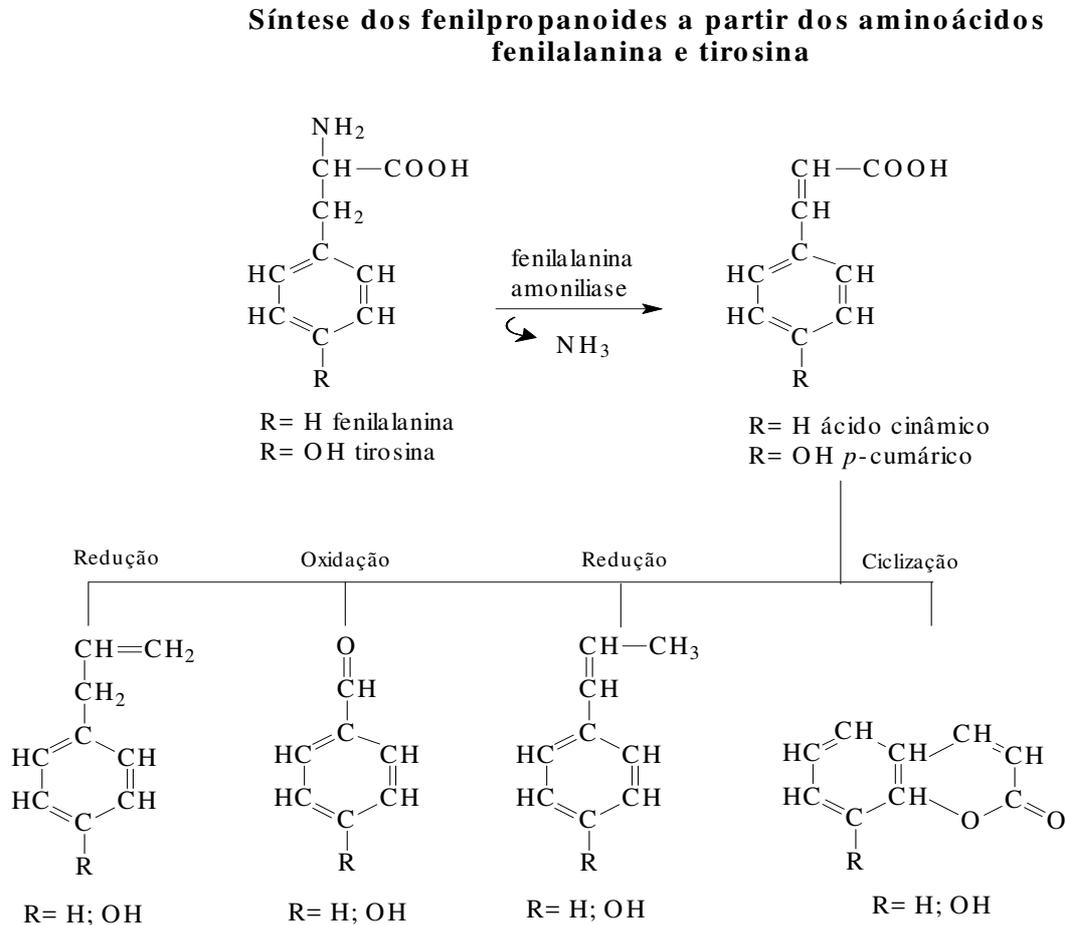


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico (Continua)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009), modificado por Teixeira (2016).

Portanto, devido às insaturações, funções álcool, ácido, aldeído, cetona, entre outras das estruturas dos compostos terpenoides e fenilpropanoides encontradas nos óleos essenciais, esses podem fazer inúmeras reações, apresentando grande potencial biológico e tornando-se estruturas promissoras para o desenvolvimento de novos produtos.

2.5 Gênero *Mentha*

Entre as espécies vegetais conhecidas por produzirem óleos essenciais, destacam-se as espécies do gênero *Mentha*, pertencentes à família Lamiaceae e caracterizadas por sua complexidade, provavelmente devido aos inúmeros híbridos que podem ser formados a partir

do cruzamento espontâneo das espécies. A possibilidade de inúmeros cruzamentos dentro desse gênero possibilita, portanto, o desenvolvimento de uma complexa gama de espécies. A maior heterogeneidade dentro desse gênero encontra-se nas regiões da Europa, Austrália, Ásia Central e norte da África. As *Menthas* são amplamente cultivadas nos cinco continentes, principalmente em regiões temperadas e subtemperadas do mundo (WANG et al., 2013).

Espécies desse gênero também são denominadas hortelãs, agrupam as formas espontâneas e cultivadas; e compreendem plantas herbáceas e geralmente perenes. As folhas podem ser sésseis ou pecioladas, opostas, serradas e suas inflorescências são pequenas, de coloração lilás ou azuladas (WANG et al., 2013). O crescimento é rápido e geralmente suportam variações significativas nas condições edafoclimáticas; contudo, são mais encontradas em locais frescos, úmidos e parcialmente sombreados, podendo ser cultivadas em diversas localidades.

Devido à grande utilização industrial de substâncias extraídas dessas plantas, Khanuja et al. (2000) destacaram a utilização dos óleos essenciais em cosméticos, produtos farmacêuticos, alimentícios, produtos de confeitaria e bebidas alcoólicas industriais.

Segundo Santos et al. (2012), os óleos essenciais das espécies do gênero *Mentha* apresentam um elevado valor comercial, pois geralmente apresentam o monoterpene mentol em suas constituições, substância amplamente usada nas indústrias farmacêutica, cosmética, de higiene pessoal e alimentícia.

2.5.1 *Mentha pulegium* (L.) L.

A espécie vegetal conhecida cientificamente como *M. pulegium* é denominada vulgarmente como poejo, poejinho, poejo-real e menta-selvagem (OLIVEIRA et al., 2011). São nativas da Europa, norte da África, Ásia e Oriente Médio, estando distribuídas principalmente em regiões temperadas e subtemperadas. É uma planta perene, herbácea, aromática e que pode atingir até 40 cm de altura (Figura 7) (SILVA et al., 2015a).

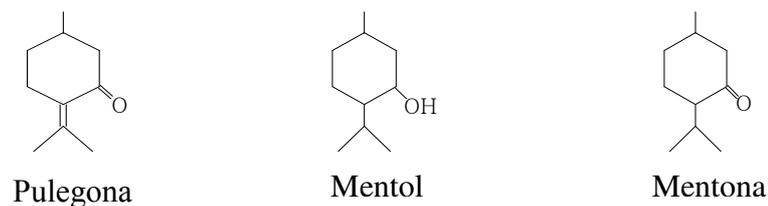
Figura 7 - Aspecto geral da *Mentha pulegium*



Fonte: arquivo pessoal.

As partes aéreas de *M. pulegium* têm sido tradicionalmente utilizadas para tratamentos de sinusite, resfriado, cólera, intoxicação alimentar, bronquite, tuberculose, assim como carminativo, expectorante e diurético, destacando-se como uma importante planta aromática e medicinal. Também é relatado seu potencial antisséptico, repelente, antiespasmódico e anti-inflamatório. Boukhebt et al. (2011) mostraram que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade antioxidante. Silva et al. (2015a) destacam que os constituintes majoritários encontrados para o óleo essencial de *M. pulegium* foram pulegona, mentol e mentona, o que pode ser verificado na Figura 8.

Figura 8 - Constituintes químicos encontrados em óleo essencial de *M. pulegium*



Fonte: Silva et al. (2015a).

Rodrigues et al. (2013) enfatizam a necessidade de uma melhor caracterização de plantas e preparações botânicas, e de avaliação científica dos riscos de exposição dos consumidores a esses produtos. A União Europeia tem estipulado uma concentração máxima para pulegona nas concentrações de 250 mg/Kg nos confeitos que contenham hortelã ou hortelã-pimenta, 2000 mg/Kg microconfeitos destinados a refrescar o hálito, 20 mg/Kg em

pastilhas, 20 mg/Kg em bebidas não alcoólicas que contenham hortelã ou hortelã-pimenta e 100 mg/Kg nas bebidas alcoólicas que contenham hortelã ou hortelã-pimenta (EEC, 2008). Diante de tantas atividades biológicas mostradas pelo óleo essencial dessa espécie e sua utilização na indústria, pode-se evidenciar a sua utilização como uma alternativa promissora.

2.6 Gênero *Corymbia*

O gênero botânico *Corymbia*, pertencente à família Myrtaceae, inclui os chamados eucaliptos-de-jardim. Cerca de 113 espécies de árvores já foram classificadas no gênero *Eucalyptus* até meados da década de 1990, ainda que algumas espécies sejam reconhecidas como um grupo distinto dos *Eucalyptus* desde 1867. As espécies de eucalipto são amplamente cultivadas no Brasil, principalmente pelo crescimento rápido, boa qualidade da madeira e pelo alto rendimento dos óleos essenciais extraídos, que podem ser promissores em atividades biológicas (VILAS BOAS; MAX; MELO, 2009).

Bowyer, Shmulsky e Haygreen (2003) destacam a utilização de espécies do gênero *Corymbia* na fabricação de produtos de madeiras sólida e que sua viabilidade está intimamente relacionada com o desempenho no processamento e com as propriedades físicas e mecânicas do material.

Segundo Morais et al. (2010), as espécies de eucalipto têm seu cultivo ampliado no Brasil, ano após ano, pelas suas características de rápido crescimento e adaptação edafoclimática, além das características florestais e da qualidade de sua madeira.

2.6.1 *Corymbia citriodora*

A *Corymbia citriodora* é uma espécie de ocorrência natural da Austrália, caracterizada por apresentar um porte médio, chegando, algumas vezes, a 50 metros de altura e 1,2 m de diâmetro. Sua madeira apresenta alta densidade ($0,99 \text{ g/cm}^3$), podendo ser indicada para plantios visando a usos múltiplos (Figura 9) (EMBRAPA, 2013).

Figura 9 - Aspecto geral da *Corymbia citriodora*

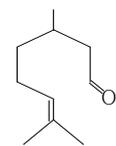


Fonte: Dream-time (2017).

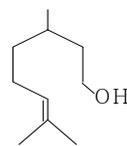
Segundo Reis et al. (2013), a *C. citriodora* tem sua madeira utilizada na produção de carvão vegetal, cabos de ferramentas, lenha, mourões, sendo ela considerada excelente, forte e durável. A espécie *C. citriodora* é representada por árvores altas, ornamentais e com folhas com cheiro de limão.

Vitti e Brito (2003), pesquisando o óleo essencial de *C. citriodora*, observaram rendimento de 1% a 1,6%, ou seja, a cada tonelada de biomassa foliar destilada, pode-se extrair de 10 a 16 kg de óleo. A concentração de seu componente principal, citronelal, varia entre 65% a 85%. O citronelal possui propriedades de repelência contra insetos, mostrando alta eficiência nessa função. No Brasil, o óleo de *C. citriodora* é comercializado bruto, ou, então, sendo a base para obter-se o citronelol e o mentol. As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na Figura 10.

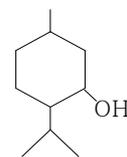
Figura 10 - Constituintes químicos obtidos do óleo essencial de *C. citriodora*



Citronelal



Citronelol



Mentol

Fonte: Vitti e Brito (2003).

2.7 Gênero *Cymbopogon*

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes aromáticas, sendo a maioria dessas nativas da região tropical da Europa. A espécie *Cymbopogon* está categorizada no reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae e gênero *Cymbopogon*. Apresentam odor aromático agradável, característico de limão, além de sabor aromático e ardente, e coloração verde-pálida (TRIPPLEBROOKFARM, 2016).

2.7.1 *Cymbopogon citratus*

A espécie *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, popularmente conhecida como capim-limão, é originária da Índia e encontra-se difundida em vários países e aclimatada nas regiões tropicais do Brasil. Ensaio farmacológicos realizados, em adição às análises microbiológicas, evidenciam que os principais efeitos terapêuticos do capim-limão estão relacionados com as atividades estomacal, analgésica, sedativa e antimicrobiana, utilizado popularmente como antiespasmódico, diaforético, antitérmico, diurético, antialérgico (Figura 11) (AMARANTE, et al., 2012).

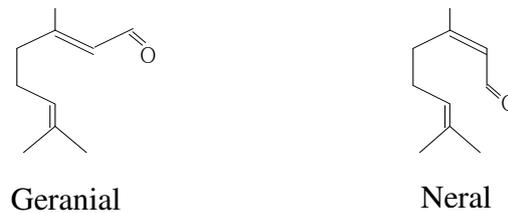
Figura 11 - Aspecto geral do *Cymbopogon citratus*



Fonte: Stumpf (2017).

Martins et al. (2004) constataram que o óleo extraído de *Cymbopogon citratus* é um dos óleos essenciais importantes para obtenção do citral, seu constituinte principal, utilizado como matéria-prima na obtenção de importantes compostos químicos denominados iononas, utilizados na perfumaria. O citral é a mistura isomérica dos constituintes geranial e neral (Figura 12).

Figura 12 - Constituintes químicos do óleo essencial de *C. citratus*



Fonte: Martins et al. (2004).

2.8 Fitocosméticos

A fitocosmética é o ramo da cosmetologia voltada ao uso de insumos vegetais, englobando, assim, os estudos referentes aos óleos essenciais, produtos produzidos pelas plantas. Em constante evolução, a indústria cosmética aposta nessa atitude como vantagem competitiva, caracterizada como tendência nacional e mundial. A fitocosmética dedica-se ao estudo e aplicação das substâncias de origem vegetal, tendo como grande aliada a extensa biodiversidade brasileira (FITOCOSMÉTICA, 2002).

Sabe-se da tendência mundial de utilizar substâncias (princípios ativos e insumos) oriundas de plantas em formulações de uso tópico, tanto nas formulações manipuladas como em produtos comercializados. O usuário/paciente sente-se bem ao utilizar o produto que agrega o conceito de qualidade de vida (GOMES; SANTOS, 2006). Essa valorização de plantas ocasionou crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre a sua segurança e eficácia terapêutica, originando, assim, os fitocosméticos (FENNER et al., 2006).

Cunha et al. (2008) descreveram que as aplicações farmacêuticas mais antigas usadas em cosmética foram as pomadas e os óleos contendo constituintes das plantas. Contudo, outros tipos de preparações, como infusos, cozimentos e macerados obtidos de plantas, ocuparam, durante muitos anos, um lugar de destaque. Atualmente, ainda se utiliza esse tipo de preparações diretamente ou aplicadas em associação com compressas, no tratamento de certas infecções cutâneas.

Aburjai e Natsheh (2003) relataram que a aplicação direta das plantas na indústria cosmética encontra-se cada vez mais em desuso, substituída pela aplicação dos seus extratos ou óleos essenciais.

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade (ANVISA, 2004). São avaliadas as características, como o valor de pH e a espalhabilidade das formulações. Esses parâmetros são estudados comparativamente, considerando-se as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013).

A característica referente ao valor de pH está incluída dentro dos fatores intrínsecos de incompatibilidade química. Esse fator está associado à natureza das formulações e às interações das matrizes com os princípios ativos. A incompatibilidade química diz respeito às reações químicas propriamente ditas que podem ocorrer entre os componentes da formulação e relacionam-se com a integridade e segurança de uso.

Portanto, para o desenvolvimento de antissépticos, a verificação do pH é extremamente importante, pois esse é um dos principais fatores intrínsecos capazes de determinar o crescimento, sobrevivência ou destruição de micro-organismos. Os micro-organismos têm valores de pH ótimo e máximo para sua multiplicação em torno da neutralidade (6,5 a 7,5); assim, as variações de pH de novas formulações têm que ser analisadas com cautela.

Os estudos de estabilidade geram resultados que são avaliados comparativamente, exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência. Esse pode ser um produto de mercado ou uma formulação recém-preparada que, conhecidamente, preserve as características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas do produto (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013).

2.9 Matriz para formulação de gel antisséptico

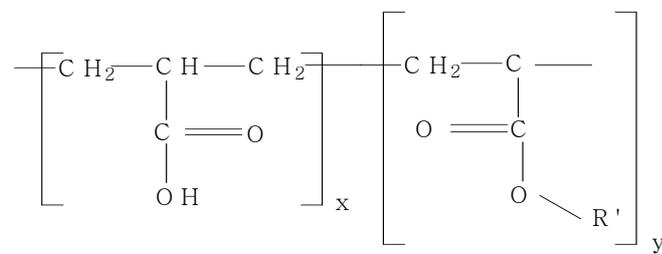
Os géis são dispersões com alto potencial de incorporação de substâncias em sua matriz, tornando-se referências para produção de novos produtos. Ansel, Popovich e Allen Junior (2000) caracterizam os géis como sistemas semissólidos que consistem na dispersão de moléculas grandes ou pequenas em um veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina, pela ação de uma substância a ele adicionada. Existem duas classes de géis: os hidrofóbicos e os hidrofílicos. Além disso, de acordo com as características dos polímeros, os géis podem apresentar natureza iônica ou não iônica. Os géis de natureza não iônica possuem estabilidade em ampla faixa de pH, tornando-se possível a veiculação de substâncias de

caráter ácido, como os alfa-hidroxiácidos. Já os de caráter aniônico, são pH dependentes, ou seja, apresentam-se estáveis em solução neutra ou próxima do pH 7 (GENNARO, 2004).

2.9.1 Carboxipolimetileno (Carboxipolimetileno 940P)

O carboxipolimetileno é um polímero do ácido acrílico de alto peso molecular (Figura 10), considerado um dos espessantes mais comuns para a fase aquosa, sendo muito usado em formulações farmacêuticas líquidas ou semissólidas, como géis, suspensões e emulsões, como espessante para modificar a viscosidade dos produtos (BONACUCINA; MARTELLI; PALMIERI, 2004; CORRÊA et al., 2005).

Figura 10 - Estrutura química do carboxipolimetileno



Fonte: Raschke et al. (2005).

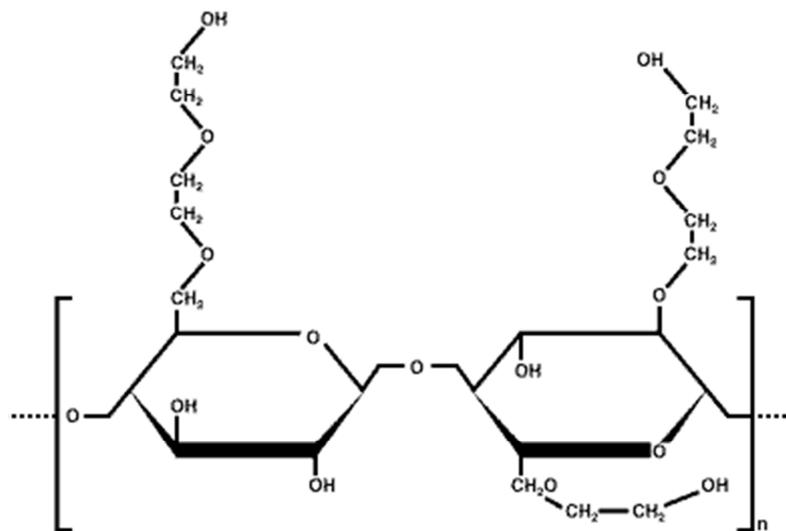
De acordo com Bonacucina, Martelli e Palmieri (2004), os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que, em meio aquoso ou fluido biológico, retêm uma grande parte de água na sua estrutura, sem se dissolver. Por causa da presença de certos grupos funcionais ao longo das cadeias do polímero, os hidrogéis são frequentemente sensíveis às condições do ambiente, como temperatura, pH e composição do solvente.

A dispersão do polímero carboxipolimetileno em água para a preparação do gel produz 1.000 vezes o volume original. O máximo de viscosidade e transparência no gel de carboxipolimetileno é obtido com pH 7, mas a viscosidade e transparência inicia-se em pH 4,5 a 5 e se estende ao pH 11. Na área farmacêutica, os hidrogéis têm sido utilizados para liberação de fármacos. No campo biomédico, um dos primeiros usos foi para a preparação de lentes de contato e intraoculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.9.2 Hidroxietilcelulose (Hidroxietilcelulose® 250)

O hidroxietilcelulose é um polímero não iônico derivado da celulose, apresentando maior compatibilidade com a variação do pH e com a presença de eletrólitos (Figura 11) (CHIROLI, 2013).

Figura 11 - Estrutura química de um hidroxietilcelulose



Fonte: Gianniberti (2016).

Esse gel desperta maior interesse para a veiculação de ativos em dermatologia, por possuir caráter não iônico, tolerando bem soluções ácidas, sendo indicado para a incorporação de ativos que levem a um abaixamento do pH final da formulação. Embora bem tolerados, pHs extremos podem causar alterações na viscosidade (FERREIRA, 2011).

3 CONCLUSÃO

A incorporação de princípios ativos naturais (óleos essenciais) a géis configuram uma alternativa promissora na tentativa de obtenção de novos produtos com maior eficácia antisséptica do que os géis encontrados no mercado que não apresentam tanto efeito. Pela não redução no número de micro-organismos encontrados nas mãos de manipuladores de alimentos e também em profissionais ligados a área da saúde, principalmente em relação as bactérias, torna-se necessária a busca por novos produtos com ação efetiva.

4 REFERÊNCIAS

ABURJAI, T. E; NATSHEH, F. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Res.** Malden, v.17, n.9, p.987-1000, nov. 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Prefácio Gerência-Geral de Cosméticos.** Brasília, 2004.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Higienização das mãos em serviços de saúde.** Brasília, 2007. 52 p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Segurança do Paciente em Serviço de Saúde – Higienização das Mãos.** Brasília, 2009. 100p.

AMARANTE, C. V. T. et al. Calagem e adubação fosfatada favorecem o crescimento do capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p. 92-96. Jul. 2012.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos.** São Paulo: Premier, 2000. p. 288-291.

ARANTES, A. V.; ANDRADE, M. C.; BARACHO, N. C. V. Estudo da atividade antimicrobiana das Folhas de *Jatropha curcas* L. frente ao *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **R. Ciências em Saúde**, Manguinhos, v. 3, n. 2, p. 1-7, Abr./jun. 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores.** Vitória: EDUFES, 2008. 624 p.

BARROS, G. F. et al. Sobrevivência de patógenos de origem alimentar aderidos em aço inoxidável após aplicação de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*. **Rev Inst Adolfo Lutz.**; v.74, n.3, p. 258-65, 2015.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n.3, p. 588-594, Mar. 2009

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carboxipolimetileno gels in hydrophilic cosolvents. **Int. J. of Pharm.**, Ankara, v. 282, n.10, p. 115-130, Sep. 2004.

BOUKHEBTI, H. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. **Der Pharmacia Lettre**, India, v. 3, n. 4, p. 267-275, Jan. 2011.

BOULANOUAR, B.; et. al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Ind Crops Prod.**, Amsterdam v.46, p.85-96, 2013.

BOWYER, J. L.; SHMULSKY, R.; HAYGREEN, J.G. **Forest products and wood science: an introduction**. 4ed. Ames Iowa : IOWA STATE PRESS, 2003, 554 p

BOYCE, J. M.; PITTET, D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recomm Rep**, Atlanta, v.25, n.51, p.1-45, Oct. 2002.

BRASIL. Consulta Pública n.43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do “Guia para a 89 realização de estudos de estabilidade” **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 de julho de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 04/11/2016.

BRASIL. Resolução - RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 9 de agosto de 2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/RDC%2B452012%2BEstudos%2Bde%2BEstabilidade%2B-%2BIFA.pdf/4f387099-3ffc-42c6-9afe_41b4f880e17d Acesso em: 04/11/2016.

BRASIL. Resolução - RDC N° 58, de 20 de dezembro de 2013. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 20 de dezembro de 2013 [Internet]. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2013/iels.dez.13/Iels242/RS-MS-ANVISA-RDC-58_201213.pdf>. Acesso em: 04/11/2016.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam v. 94, n. 3, p.223-253, Aug. 2004.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de Toxinfecção Alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. Campo Grande: Escola de Saúde Pública Dr.Jorge David Nasser, Gestão em Saúde. 2002. 71p.

CARMO, L.S. et al. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol. Curitiba**, v. 46, n. 4, p. 581-586, Dec.2003.

CHEESEMAN, K. E; et al., Evaluation of the bactericidal efficacy of three different alcohol hand rubs against 57 clinical isolates of *S. aureus*. **Hosp Infect**. Birmingham v.72, n.4, p.319-25, Aug. 2009.

CHIROLI, M.; CAMPOS, R.; SILVA, L. L. Doadores de viscosidade utilizados em xampus: revisão de Literatura, 2000 a 2012. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.14, n.1, Jan-Mar./2013.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 41, n. 1, Jan-mar. 2005.

CUNHA, A. et al. **Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia**. 2ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008. p. 310.

CUSTÓDIO, J. et al. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, v.18, n.1, p.7-11, Jan./fev., 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

Dream-time (2017). Disponível em: <http://www.dream-time.com.au/navigation-header/trees-and-shrubs/evergreen-trees>. Acesso em: 04/11/2016.

EDUARDO, M. B. P. **Monitorização das doenças diarreicas agudas-MDDA:normas e instruções**. Secretaria da Saúde. 2. ed. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica 2008. 35p.

EEC (COUNCIL DIRECTIVE. 1334/2008). The approximation of the laws of the member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. **OJ**, June 1988. 15.7.1988, L184/61–411 67. Disponível em<http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav09_en.pdf>. Acesso em: 04 março. 2017.

EMBRAPA, 2013. **Corymbia citriodora: estado da arte de pesquisas no Brasil**. (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 255)

EMBRAPA, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/workshopnichos2016/noticia.php?id=7>. Acesso em: 04/11/2016.

FATTOM, A. I. et al. Development of StaphVax, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the la bench to phase III clinical trials. **Vaccine**, Edinburgh, v. 22, n. 7, p. 880-887, Feb. 2004.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. bras. ciênc. farm.**, São Paulo, v.42, n.3, p.369-394, Jul-set. 2006.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4ed. Juiz de Fora: Pharmabooks editora. 2011. p. 1438.

FERREIRA, J. S. et al. Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil. **Food Control.**, Guildford, v.37, n.1, p.395–400, Mar.2014.

FIGUEIREDO, A. E. et al. Hand hygiene in peritoneal dialysis patients: a comparison of two techniques. **Perit Dial Int**. New York v.33, n.6, p.655-61, Nov-dec. 2013.

FITOCOSMÉTICA. **Indústria avança em direção ao cosmético verde**. 2002. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/fitocosmetica-industria-avanca-em-direcao-ao-cosmetico-verde/>. Acesso em 04 nov. 2016.

FRANCE PRESSE, 2015. **EUA têm surto de infecção por E. coli ligada a rede de fast food Chipotle.** Disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2015/11/eua-tem-surto-de-infeccao-por-e-coli-ligada-rede-de-fast-food-chipotle.html>. Acesso em: 04/11/2016.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiol.**, London, v. 23, n. 3, p. 260-267, 2006.

GENNARO, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia.** ed.20. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 2008.

GIANNIBERTI, 2016. **Estrutura química do hidroxietilcelulose.** Disponível em;http://www.gianniberti.it/Editoriali/aq/Hidroxietilcelulose/bro_nat_chemistr.html. Acesso em: 03/11/2016.

GOMES R.K; SANTOS M. G. **Cosmetologia descomplicando os princípios ativos.** 2º ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2006. 365 p.

HO, J. D.; ANSARI, R. K.; PAGE. D. Hand sanitization rates in an urban emergency medical services system. **J Emerg Med.**, New York, v.47, n.2, p.163-8, Aug. 2014.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JORGENSEN, H. J. et al. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam v. 252, p. 267-272, Nov. 2005.

KHANUJA, S. P. S. et al. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 111, p. 121–125, Jan. 2000.

KRAMER, A.; RUDOLPH, P.; KAMPF, G.; PITTET. D. Limited efficacy of alcohol-based hand gels. **Lancet.** London, v. 359, n. 9316, p. 1489-90, Apr. 2002.

LORENZI H, et al. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2003. 368 p.

LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants.** Proefschrift: Wageningen University, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Tecnovigilância: abordagens de vigilância sanitária de produtos para a saúde comercializados no Brasil. Brasília, 2010.

MARTINS, M. B. G. et al. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v.6, n.3, p.20-29, Mar. 2004.

MIZUMACHI , E. et al. Clonal distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* on handles of handheld shopping baskets in supermarkets. **J Appl Microbiol.** Oxford, v.110, n.2, p.562-7, Feb. 2011.

MORAIS, E. et al. Variação genética, interação genótipo solo e ganhos na seleção em teste de progênies de *Corymbia citriodora* Hook em Luiz Antonio, São Paulo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 85, p. 11-18, Mar. 2010.

MUNDY, L. M. Contamination, acquisition, and transmission of pathogens: implications for research and practice of infection control. **Infect. Control Hosp. epidemiol.**, New Jersey, v.29, n.7, p.590-2, Jul. 2008.

MUSTAFA, M. M S.; JAIN, L. C. S.; AGRAWAL, C.V. K. Food Poisoning Outbreak in a Military Establishment. **Med J Armed Forces**, India, v. 65, n. 3, p. 240-243, Jul. 2009.

NETO, A.C.; SILVA, C.G.M.; STANFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, **Brasil. Food Sci Technol.**, Campinas, v.22, n.3, p.263-271, Set-Dez. 2002.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes voláteis de *Mentha pulegium* L. e *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 165-169, Jan. 2011.

OSUGI, T.; KAWAGUCHI, Y.; HIROSHIMA. S. **Transparent gel-like skin-sterilizing agent containing quaternary ammonium salt and ethyl N-cocoyl L-arginine DL-pyrrolidone carboxylate with other specific ingredients.** n. WO 2014077062 , 22 May 2014.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário.** Piracicaba: USP/ESALQ, 2004. p. 1-10.

PONATH, F. S. et al. Avaliação da higienização das mãos de manipuladores de alimentos do Município de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v.7 n.1, p.63-69, Mar. 2016.

RASCHKE, T. et al. **Cosmetic preparations containing licochalcone A and an organic thickener.** n. US 11/001,081, 2 dez. 2004, 21 set. 2005.

RASFF. Food Alerts, Week 7. Disponível em: <http://www.haccpeuropa.com/2014/02/17/rasff-food-alerts-week-7>. Acesso em: 03 fev. 2016.

REIS, C.A.F. et al. ***Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil.** Embrapa, Documentos 255. Out, 2013.

RODRIGUES, L. et al. Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. **Ind. Crops. Prod.**, Amsterdam, v. 43, n. 2013, p. 692-700, May 2013.

RUWER, C.M.; MOURA, J.F.; GONÇALVES, M.J.F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. Segurança alimentar e nutricional. **Segur. Aliment. Nutr.**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. bras. patol. med. lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, Dez. 2007.

- SANTOS, V. M. C. S. et al. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 97-102, 2012.
- SHINTRE M. S.; GAONKAR T. A.; MODAK S. M. Efficacy of an alcohol-based healthcare hand rub containing synergistic combination of farnesol and benzethonium chloride. **Int J Hyg Environ Health**. v. 209, n.5, p.477-87, Sep.2006.
- SILVA, L. F. et al. Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Menhta viridis* L. and *Mentha pulegium* L.(L) **Am J Plant Sci**, Irvine v.6, n.1, p. 666-675, Mar. 2015a.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.544 p.
- SILVA; A. M. et al. Contaminação em embalagens de alimentos industrializados **Rev. Saúde em foco**, Teresina, v. 2, n. 2, p. 107-114, Ago-Dez. 2015b.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
- SINGH. T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant. **Wood. Sci. Technol.**, New York, v. 46, n. 5, p. 851–870, Sept. 2012.
- SLOANE, T.; SHABAN, R. Z.; GILLESPIE. B. M. Barriers and enablers to the uptake of alcohol-based hand rubs for pre-operative hand antisepsis in the operating room: an Australian perspective. **Healthcare Infection**. Australia, v. 17, n.1, p.25-32, Mar.2012.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Biotech.**, London, v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Biotech.**, London, v.23, p.1-6, 2011.
- SOUZA, A. A. et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu, v.18, n.1, Jan-Mar. 2016.
- STUMPF, M. (2017). Disponível em: <http://www.fazfacil.com.br/jardim/capim-limao-erva-cidreira/> Acesso em: 04/11/2016.
- TRIPPLEBROOKFARM. *Cymbopogon citratus*. Lemon grass. Disponível em: <http://www.tripplebrookfarm.com/iplants/Cymbopogon.html> . Acesso em : 04 nov. 2016
- TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) E *Lippia origanoides* Kunth.: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico**. 2016. Tese (Doutorado em Química/Bioquímica)-Universidade Federal de Lavras, 2016.

VILAS BÔAS, O.; MAX, J. C. M.; MELO, A. C. G. crescimento comparativo de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* no município de marília, SP. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 63-72, Jun. 2009.

VITTI, A. M. S.; BRITO, O. J. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ 2003. 26p. (Documentos Florestais).

WANG, H. T. et al. Analysis of genetic variability and relationships among *Mentha* L. using the limonene synthase gene, LS. **Gene**, Campinas, v. 524, n. 3, p. 246-252, July 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – Desenvolvimento de formulações antissépticas de uso tópico e suas atividades físico químicas empregando os óleos essenciais extraídos de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*

ARTIGO 2 – Atividades biológicas de antissépticos a base de óleos essenciais

Desenvolvimento de Formulações Antissépticas de Uso Tópico e suas Atividades Físico-Químicas Empregando os Óleos Essenciais Extraídos de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*

Resumo

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, sendo modelo para síntese de um grande número de fármacos. As espécies de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* vêm sendo investigadas devido ao grande uso popular. No presente trabalho, teve-se como objetivos: desenvolver e caracterizar físico-quimicamente formulações antissépticas de uso tópico na forma de gel, com adição de óleos essenciais obtidos das plantas em estudo. Os óleos essenciais de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* foram extraídos pelo método de hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado; e caracterizados e quantificados por CG/EM e CG/DIC. Os géis foram desenvolvidos empregando-se as bases hidroxietilcelulose e carboxipolimetileno, incorporados com os óleos essenciais. Os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram pulegona, mentol e mentona (*M. pulegium*), geranial e neral (*C. citratus* e *C. citriodora*). Géis a base de carboxipolimetileno incorporados aos óleos essenciais apresentaram menores variações no pH e não exibiram separação de fases no teste de resistência à centrifugação. O teste de liberação (diálise) mostrou os melhores resultados para os géis incorporados com *M. pulegium* à base de hidroxietilcelulose; e com *C. citriodora* e *C. citratus* à base de carboxipolimetileno. Pelos resultados, evidenciou-se que os géis preparados com os óleos essenciais incorporados à base carboxipolimetileno são produtos promissores devido às características físico-químicas mais estáveis.

Palavras-chave: Poejo, eucalipto-australiano, capim-limão, géis.

Introdução

A utilização de produtos naturais tem sido amplamente estudada nas últimas décadas; e devido a essa tendência, o mercado consumidor busca cada vez mais produtos diferenciados que tragam benefícios extras. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias voláteis extraídas dos vegetais por diferentes técnicas, cuja utilização vem ganhando destaque devido às características antimicrobianas, anti-inflamatórias e repelentes. Devido a esses benefícios, estudos prévios demonstram o interesse das indústrias por essas substâncias, sendo o ramo farmacêutico mais promissor [1].

Paralelamente à comprovação dos benefícios proporcionados pelos óleos essenciais, observa-se um aumento significativo no número de micro-organismos resistentes e esse fato

tem acentuado a necessidade de adotar medidas de prevenção e controle para a redução da transmissão de patógenos.

Atualmente, verifica-se que as infecções são um dos maiores problemas de saúde pública, contribuindo com o aumento da taxa de mortalidade no mundo todo. A principal medida de controle e prevenção populacional de agentes infecciosos é a antissepsia das mãos com produto que seja capaz de destruir agentes patogênicos encontrados na superfície da pele [2,3].

Dessa forma, considerando a crescente necessidade de tratar e prevenir a transmissão de patógenos, surgem novos produtos promissores à base de óleos essenciais, visto que esses possuem excelentes propriedades bactericidas que já foram elucidadas em diversos estudos [4].

Ante as diversas plantas produtoras de óleos essenciais que são ricas em compostos biologicamente ativos, destacam-se *Mentha pulegium* (L.), *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*. As Menthas, também denominadas hortelãs, compreendem as plantas herbáceas e são geralmente perenes [5]. Seus óleos essenciais possuem um elevado valor comercial por apresentarem o monoterpene mentol em suas constituições, que é usado nas indústrias farmacêutica, cosmética, de higiene pessoal e alimentícia [6].

Entre os óleos essenciais obtidos das diferentes espécies de eucalipto, a espécie *Corymbia citriodora* é uma das mais comercializadas, sendo o Brasil o maior produtor [7]. Esses possuem em sua composição química compostos secundários, como o citronelol, geraniol, isopulegol, α e β -pineno, cineol, guaiol, estragol, nopineno, canfeno, mirceno e β -cimeno [8]. A espécie *Cymbopogon citratus*, conhecida como capim-limão, erva-cidreira ou capim-cidreira, é uma planta quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas. Seu óleo essencial tem sido utilizado na aromatização de alimentos e na indústria de cosméticos [9], mostrando que os constituintes presentes nos óleos essenciais dessas espécies apresentam baixa toxicidade, já que é verificado seu uso na indústria alimentícia.

No presente trabalho, objetivou-se desenvolver formulações de uso tópico de 6 géis antissépticos incorporados com óleos essenciais de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* nas bases carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose e determinar as características físico-químicas por meio dos ensaios de diálise, espalhabilidade, pH, resistência à centrifugação e densidade.

Experimental

Coleta das plantas e extração dos óleos essenciais

As folhas de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* foram coletadas às 7 horas do mês de janeiro de 2016 no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras,

em um dia ameno e sem precipitação. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil) 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. e 918 metros de altitude.

As amostras foram pesadas e hidrodestiladas em aparelho de Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros, por 2 horas, para obtenção do hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206 BL) a 965 g por 10 minutos. Após esse processo, os óleos essenciais foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocados em frascos envoltos por papel alumínio e mantidos sob refrigeração [10]. A análise de umidade da planta foi realizada pelo sistema Dean Stark em triplicata, utilizando-se 5g das amostras e 80 mL de ciclohexano, determinando posteriormente os rendimentos dos óleos essenciais presentes nas plantas frescas [11].

Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais foram caracterizados qualitativamente e quantitativamente no Centro de Análises e Prospecção Química (CAPQ), no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS-Shimadzu, modelo QP 2010 Plus), sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (5% fenil; 95% dimetilpolisiloxano) (0,25 µm de espessura de filme); He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 °C, seguindo de um aumento de 3 °C min⁻¹ até atingir 240 °C, depois a 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 7 min; temperatura do injetor: 220 °C e temperatura do detector (ou interface) de 240 °C; o volume da amostra injetada foi de 0,5 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 71,0kPa.

As condições do espectrômetro de massa foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da.

Os constituintes foram identificados com base na comparação dos índices de retenção da literatura [12]. Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

Na avaliação quantitativa, que foi realizada por meio de normalização de áreas (%), utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com detector por ionização de chamas (DIC) e as condições experimentais foram as mesmas empregadas na identificação dos constituintes dos óleos.

Preparação dos géis

Os géis foram preparados nas bases de carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose, com e sem a adição dos óleos essenciais de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*. Os géis utilizados como controle negativo à base de hidroxietilcelulose foram preparados segundo metodologia descrita por Queiroz [13], com modificações (alteração do pH inicial do gel). Esses foram elaborados utilizando-se 1,8% de hidroxietilcelulose, 0,2% de metilparabeno, 5% de propilenoglicol e 100 mL de água destilada, sendo essas substâncias dispersas em água até a formação do gel. Os géis de hidroxietilcelulose com incorporação dos óleos essenciais foram preparados da mesma forma; porém, adicionaram-se 3,35% dos óleos, devido a estudos realizados por Silva et al. [14]. Esses autores determinaram essa concentração inibitória para eliminar as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, empregando o óleo essencial de *M. pulegium*, que serviu como parâmetro para a produção dos géis, já que esses micro-organismos são patógenos contaminantes das mãos.

Na preparação dos géis utilizados como controle negativo, à base de carboxipolimetileno, foi utilizada a metodologia de Mura et al. [15], com modificações (alteração do pH inicial do gel). Esses foram elaborados utilizando-se 0,8% de carboxipolimetileno, 0,2% de metilparabeno, 5% de propilenoglicol e 100 mL de água destilada, sendo essas substâncias dispersas em água até a formação do gel. Os géis de carboxipolimetileno com incorporação dos óleos essenciais foram preparados da mesma forma, adicionando-se também 3,35% dos óleos.

Avaliação do pH

A verificação do pH foi realizada em um pHmetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 9, 7 e 4 [16]. As análises foram realizadas em triplicata, nos tempos 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias [17].

Espalhabilidade

A análise de espalhabilidade foi realizada nos géis nos dias 1, 15, 30, 60 e 90, a fim de se verificar a fluidez das amostras. Um molde circular de 6,1 cm de diâmetro foi colocado abaixo de uma placa suporte de 40x40 cm, posicionado sobre uma escala milimetrada. Com o auxílio de uma espátula, foi espalhado na placa suporte, 1,5 g de cada gel, até cobrir toda a área circular abaixo da placa. Sobre as amostras, foram colocadas placas de vidro de peso conhecido e, após um minuto, foi realizada leitura dos diâmetros atingidos. O procedimento foi realizado em triplicata para cada gel, colocando-se outras placas no intervalo de 1 minuto. Os resultados foram calculados utilizando a expressão $E_i = d^2 \cdot \pi/4$, em que, E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso; d^2 = diâmetro médio (mm^2); $\pi=3,14$ [18].

Resistência à centrifugação

Inicialmente, em tubos de ensaio, foram pesados 5 g das amostras, centrifugando-se em centrífuga da marca Megafuge 16R a rotações crescentes de 120, 510 e 2000 g, durante 15 minutos em cada rotação, à temperatura ambiente [19].

Diálise

A priori, realizou-se a varredura dos óleos essenciais em espectrofotômetro para verificar o comprimento de onda de maior absorbância em que seriam realizadas análises: $\lambda = 257$ nm (*M. pulegium*), $\lambda = 245$ nm (*C. citratus*), $\lambda = 245$ nm (*C. citriodora*). Para a realização das análises, foi escolhida a concentração de 3,35% de óleo essencial, mesma concentração utilizada para o desenvolvimento dos géis. As amostras dos géis e dos óleos essenciais foram adicionadas a microtubos que foram preenchidos até o volume de 2,0 mL, com uma solução hidroalcoólica de concentração 6,5%, sendo essa a menor concentração de etanol em que se observava na diluição dos óleos essenciais. Em seguida, os microtubos foram fechados com as membranas Dialysis tubing (Cellulose membrane), sendo todas as amostras na mesma concentração. Após esse procedimento, os microtubos foram transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL, que continha 50 mL de solução hidroalcoólica, também na concentração 6,5% [20].

Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se uma proveta graduada empregando-se a seguinte fórmula $d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$, em que: d (densidade), M_0 (massa da proveta vazia em gramas), M_1 (massa da proveta com água destilada em gramas), M_2 (massa da proveta com amostra do antisséptico em gramas). A seguir, a proveta foi preenchida com água destilada (10 mL) e seu novo peso foi anotado (M_1). Posteriormente, a proveta foi preenchida com 10 mL das amostras, tendo seu peso anotado (M_2) [21].

Análise estatística

Os resultados analíticos para pH das amostras e espalhabilidade foram submetidos à análise de variância (SISVAR), segundo Ferreira [22] em esquema fatorial 9 x 6 (9 géis e 6 tempos) e 9 x 5 (9 géis e 5 tempos), respectivamente; e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Rendimento

As extrações dos óleos essenciais mostraram diferenças em relação aos rendimentos obtidos, sendo o óleo de *C. citriodora* o que apresentou os resultados mais elevados, com rendimento de 3,43%, ao passo que os óleos de *M. pulegium* e *C. citratus* apresentaram valores aproximados 1,66% e 1,63% em peso seco, respectivamente. Contudo, apesar das diferenças observadas, os três óleos essenciais apresentaram valores significativos de rendimento.

Silva et al. [14] encontraram valores de 2,54% de rendimento no óleo essencial de *M. pulegium*, sendo esse valor superior ao encontrado no presente trabalho. Silva et al. [23] observaram valores inferiores no óleo de *C. citriodora* (1,60 a 2%) e Lucena et al. [24] encontraram baixo rendimento no óleo essencial de *C. citratus* (0,49%). Essas diferenças nos resultados de rendimento e de umidade em materiais vegetais são comuns e podem ser explicadas pelas variações de localizações, época de coleta, estresse em que a planta foi exposta, entre outros fatores [25].

Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os resultados das composições químicas dos óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3. Os constituintes majoritários encontrados no óleo de *M. pulegium* foram pulegona (50,62%), mentol (25,20%) e mentona (23,56%), sendo todos caracterizados como compostos sesquiterpênicos cíclicos. Silva et al. [14], avaliando o óleo essencial de *M. pulegium*, encontraram pulegona (50,01%), mentol (31,90%) e mentona (16,56%) como compostos majoritários. Em relação ao óleo essencial de *C. citriodora*, os compostos majoritários encontrados foram geranial (55,03%) e neral (38,55%), isômeros sesquiterpênicos de cadeia acíclica. Anteriormente, Tomaz et al. [26] encontraram o citronelal em maior proporção no óleo essencial de *C. citriodora*, o que não foi observado neste trabalho.

Em relação ao óleo *C. citratus*, foi constatado que ele apresentou o geranial (58,17%) e o neral (41,35%) como constituintes majoritários. Como composto minoritário, encontrou-se o *Z*-nerol (precursor do neral) que, por uma reação de oxidação, pode-se transformar em neral, tornando a constituição química do óleo essencial de *C. citratus* exclusiva nos constituintes geranial (58,17%) e neral (41,35%). Pinto et al. [27] encontraram como majoritários no óleo de *C. citratus* os compostos geranial, neral e mirceno, sendo esse último composto divergente ao observado neste trabalho.

Gobbo-Neto e Lopes [25] explicaram que essas variações na composição química são influenciadas por diversos fatores, como o desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos. Outros fatores, como a sazonalidade, os índices pluviométricos a que a planta é

exposta também influenciam na quantidade e o estresse na qualidade dos constituintes dos óleos essenciais.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *M. pulegium*.

| Número do pico | TR* | Composto | % Área |
|-----------------------|------------|-----------------|---------------|
| 1 | 14,529 | Mentona | 23,56 |
| 2 | 15,584 | Mentol | 25,20 |
| 3 | 17,715 | Pulegona | 50,62 |
| 4 | 20,470 | n-Tetradecanol | 0,62 |
| Total | | | 100 |

TR* = Tempo de retenção

Tabela 2: Composição química do óleo essencial de *C. citriodora*.

| Número do pico | TR* | Composto | % Área |
|-----------------------|------------|-----------------------|---------------|
| 1 | 7,675 | Mirceno | 5,09 |
| 2 | 11,434 | (Z)- β -Ocimeno | 0,29 |
| 3 | 11,812 | Linalol | 0,47 |
| 4 | 17,693 | Neral | 38,55 |
| 5 | 18,997 | Geranial | 55,03 |
| 6 | 27,733 | 1-Dodecanol | 0,59 |
| Total | | | 100 |

Tabela 3: Composição química do óleo essencial de *C. citratus*.

| Número do pico | TR* | Composto | % Área |
|-----------------------|------------|-----------------|---------------|
| 1 | 17,707 | Neral | 41,35 |
| 2 | 18,409 | (Z)-Nerol | 0,48 |
| 3 | 19,009 | Geranial | 58,17 |
| Total | | | 100 |

Avaliação dos géis

Foi possível observar, por meio da avaliação inicial, que os géis preparados a partir da base carboxipolimetileno apresentaram menor fluidez, ao passo que os géis à base de hidroxietilcelulose mostraram-se mais fluidos. Bonacucina et al. [28] e Ferreira [29] evidenciaram diferenças entre os polímeros carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose. O carboxipolimetileno é um polímero de ácido acrílico, iônico e de alto peso molecular, enquanto o hidroxietilcelulose apresenta grupos hidroxietila ligados à cadeia de celulose e caráter não iônico; portanto, essas bases são quimicamente diferentes. Essa divergência contribuiu para tornar o trabalho mais completo em relação à verificação da introdução de novos produtos em géis, podendo inferir a melhor base para se trabalhar com a incorporação de óleos essenciais. Detectou-se que essas diferenças nas estruturas dos polímeros não promoveram a separação de fases e precipitação dos géis estudados. A utilização desses géis na área farmacológica também contribuiu para a escolha dessas bases, pois, assim, pode-se reduzir as análises em relação à toxicidade dos géis, uma vez que são produtos já utilizados no mercado.

Em relação ao odor das amostras, foi identificado que esse parâmetro se mostrou para os géis de carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose característico de gel. Quando ocorreu a incorporação dos óleos essenciais, o odor foi característico do óleo essencial que integrava o gel.

A consistência do carboxipolimetileno apresentou menor grau de fluidez, sendo considerado consistente quando comparado ao gel hidroxietilcelulose, que se mostrou pouco consistente. Os géis à base de carboxipolimetileno adicionados com os óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* apresentaram consistência semelhante ao controle carboxipolimetileno, ao passo que os géis à base de hidroxietilcelulose adicionados dos óleos de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* apresentaram consistência semelhante ao controle hidroxietilcelulose.

A avaliação do pH dos géis pode ser verificada na Tabela 4.

Tabela 4: Avaliação do pH dos géis preparados.

| Amostras | pH (dias) | | | | | |
|------------------------------------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 7 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| Carboxipolimetileno | 5,51Hc | 5,49Dc | 5,31Dd | 5,66Da | 5,66Ca | 5,24De |
| Hidroxietilcelulose | 5,54Gb | 5,55Cb | 5,50Bd | 5,61Ca | 5,61Da | 5,42Ce |
| Carboxipolimetileno OE <i>M. pulegium</i> | 5,26Fc | 5,36Ea | 5,35Cb | 4,91Ed | 4,91Ed | 4,80Ee |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citriodora</i> | 6,15Da | 6,10Ab | 5,98Ac | 5,95Ad | 5,67Be | 5,37Bf |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citratus</i> | 6,18Ba | 6,02Bb | 5,25Ff | 5,81Bc | 5,73Ad | 5,40Ae |
| Hidroxietilcelulose OE <i>M. pulegium</i> | 5,69Ea | 5,29Fb | 5,29Eb | 3,33Fc | 3,33Fc | 3,15Fd |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citriodora</i> | 6,33Aa | 4,44Hb | 4,00Gd | 3,12Fe | 3,10Gf | 2,56Gg |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citratus</i> | 6,17Ca | 4,48Gb | 4,00Hc | 3,15Id | 3,12He | 2,86Hf |

As letras maiúsculas representam a análise estatística de todos os géis com a variação do tempo. As letras minúsculas representam a análise estatística de cada gel dentro dos tempos, podendo ser avaliado o pH na coluna para cada gel separadamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

O pH das amostras foi um parâmetro que apresentou variação, sendo comprovado estatisticamente. O gel hidroxietilcelulose incorporado com o óleo essencial de *C. citriodora* foi o que apresentou maior valor de pH na primeira análise, sendo o gel controle carboxipolimetileno com o menor valor no mesmo tempo de análise.

Em 7 dias de avaliação, o gel carboxipolimetileno incorporado com o óleo essencial de *C. citriodora* foi o que apresentou maior valor de pH, mantendo-se com os maiores valores de pH até os 30 dias de análise. Em 60 e 90 dias, os maiores valores observados foram para o gel carboxipolimetileno incorporado com o óleo essencial de *C. citratus*. Esse fato pode estar associado aos constituintes dos óleos que, no início, apresentaram maior estabilidade pelas interações dos constituintes geranial e neral ao polímero hidroxietilcelulose, e após sete dias de produção dos géis, mostrou maior estabilidade nas interações geranial e neral com o carboxipolimetileno.

Os géis controles apresentaram variação de pH de 5,51 a 5,24 para o carboxipolimetileno e de 5,61 a 5,42 para o hidroxietilcelulose, enquanto os géis de carboxipolimetileno adicionados com os óleos *M. pulegium* foram de 5,26 a 4,80; *C. citriodora* de 6,15 a 5,37 e *C. citratus* de 6,18 a 5,40. Os géis de hidroxietilcelulose adicionados com os óleos apresentaram valores de pH que variaram para *M. pulegium* de 5,69

a 3,15, de *C. citriodora* 6,33 a 2,56 e *C. citratus* de 6,17 a 2,86. Constatou-se que a variação dos géis à base de hidroxietilcelulose foi maior quando comparados aos géis à base de carboxipolimetileno. Provavelmente esse fato está relacionado com a propriedade tamponante que os géis com base carboxipolimetileno possuem, conforme verificado nos estudos de Bonacucina et al. [28], Ferreira [29] e Merclin [30].

O carboxipolimetileno como polímero de ácido acrílico forma um sistema tamponante, pois o pKa desse polímero varia de 5 a 6, valores que representam que a dissociação desse ácido é baixa; portanto sendo um ácido fraco que pela dissociação também forma uma base fraca, formando um tampão que pode impedir reduções bruscas no pH, efeito não observado nos géis à base de hidroxietilcelulose.

Aulton [31] destacou que a redução no pH de géis à base de hidroxietilcelulose pode causar perda de viscosidade, sendo esse um parâmetro observado no teste de espalhabilidade (Tabela 5).

Tabela 5: Espalhabilidade dos géis preparados.

| Amostra | Tempo (dias) | | | | |
|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 01 (mm ²) | 15 (mm ²) | 30 (mm ²) | 60 (mm ²) | 90 (mm ²) |
| Carboxipolimetileno | 57,90Aab | 33,86Cb | 33,58Ce | 48,01Ac | 42,10ABf |
| Carboxipolimetileno OE <i>M. pulegium</i> | 50,81ABab | 34,06Cb | 36,09Ccd | 42,04BCc | 61,88Ade |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citriodora</i> | 34,94Cbc | 42,61BCab | 34,59Ce | 56,39Ac | 55,67ABdef |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citratus</i> | 40,29Bbc | 46,88Bab | 37,74Bcd | 49,67Bc | 67,26 Acd |
| Hidroxietilcelulose | 57,93Aa | 42,34Bab | 40,24Babc | 55,84Ac | 50,85Aef |
| Hidroxietilcelulose OE <i>M. pulegium</i> | 51,81Bab | 46,02Bab | 44,78Babc | 79,37Ab | 77,87Ac |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citriodora</i> | 52,89Cab | 49,74Ca | 53,07Ca | 109,54Ba | 188,98Aa |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citratus</i> | 60,91Ca | 51,88Ca | 42,14Dabc | 91,55Bb | 134,13Ab |

As letras maiúsculas representam a análise estatística da amostra no decorrer de 90 dias e as letras minúsculas representam a comparação das amostras dentro de cada tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

No primeiro dia de avaliação, verificaram-se diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). O gel hidroxietilcelulose (controle negativo) apresentou o maior resultado de espalhabilidade, apresentando, dessa forma, maior fluidez. A formulação hidroxietilcelulose com o óleo essencial de *C. citratus* foi estatisticamente semelhante, seguida das formulações de hidroxietilcelulose *C. citriodora*, hidroxietilcelulose *M. pulegium*,

carboxipolimetileno e carboxipolimetileno *M. pulegium*. Os géis carboxipolimetileno *C. citratus* e carboxipolimetileno *C. citriodora* apresentaram menor espalhabilidade e foram estatisticamente diferentes dos géis hidroxietilcelulose e hidroxietilcelulose óleo essencial de *C. citratus*. Essa diferença pode ser decorrente das ligações e interações dos constituintes majoritários geranial e neral com o carboximetileno, ocasionando oxidações dos aldeídos e condensações aldólicas com formação de aldóis, acetais ou hemiacetais com a superfície do polímero, assim como as interações distintas com a estrutura desses polímeros que podem ter influenciado na redução da espalhabilidade.

Na avaliação de 15 dias, os géis hidroxietilcelulose, carboxipolimetileno e carboxipolimetileno com o óleo essencial de *M. pulegium* apresentaram redução da espalhabilidade, mostrando diferença para essas bases. Ainda na análise de 15 dias, os géis hidroxietilcelulose *C. citriodora* e hidroxietilcelulose *C. citratus* mantiveram sua estabilidade e continuaram sendo os géis com maior espalhabilidade.

Em 30 dias, o único gel que apresentou variação de espalhabilidade foi o gel hidroxietilcelulose *C. citratus*. Na avaliação de 60 dias, todos os géis, com exceção do gel carboxipolimetileno *C. citratus*, que manteve sua espalhabilidade, apresentaram acréscimo nas espalhabilidades. O aumento da espalhabilidade pode ser decorrente das interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo dos constituintes dos óleos essenciais com os géis.

Na última análise de espalhabilidade, os géis carboxipolimetileno com o óleo essencial de *M. pulegium*, carboxipolimetileno com o óleo essencial de *C. citratus*, hidroxietilcelulose *C. citriodora* e hidroxietilcelulose *C. citratus* tiveram suas espalhabilidade aumentadas e os demais se mantiveram não diferindo estatisticamente.

O gel que mostrou maior valor de espalhabilidade em 90 dias foi o gel hidroxietilcelulose com óleo essencial de *C. citriodora*, sendo estatisticamente diferentes dos demais.

Diante destes resultados, pode-se comprovar que as interações do óleo essencial de *C. citriodora* com as bases carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose são distintas. Esse fato pode ser decorrente também das reduções de pH que podem desestabilizar os géis com polímeros de hidroxietilcelulose, como verificado pelos dados descritos na Tabela 4, em que foram observadas maiores variações de pH para esses géis.

Bugnotto et al. [32] expõem que, nas formas farmacêuticas semissólidas, o acompanhamento da espalhabilidade dos produtos é muito importante, já que, neste caso, as modificações na capacidade de se espalhar e abranger determinada área pode facilitar ou dificultar a sua aplicação, tornando-se, dessa forma, uma análise essencial.

Cordeiro et al. [33] avaliaram géis à base de carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose incorporados com óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) na presença e ausência de luz. Os autores observaram que, na presença de luz, a espalhabilidade das formulações à base de carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose foram basicamente as mesmas, e que a luz proporcionou um aumento da espalhabilidade ao longo do teste. A

espalhabilidade correspondente às amostras do abrigo da luz solar mostraram manutenção da espalhabilidade para o carboxipolimetileno, ante as condições de armazenamento, indicando boa estabilidade física da formulação carboxipolimetileno. Quanto ao hidroxietilcelulose, observaram um elevado aumento da espalhabilidade, acarretando instabilidade da formulação. Esses resultados corroboram com os dados encontrados neste trabalho, visto que as formulações também ficaram expostas à luz. A presença de luz pode ter influenciado as formulações, acarretando instabilidade e, conseqüentemente, maior espalhabilidade das formulações com o decorrer do tempo.

Martins et al. [34], desenvolvendo formulações de uso tópico à base de hidroxietilcelulose e carboxipolimetileno com óleo essencial de cravo-da-índia, observaram boa espalhabilidade durante o período de 35 dias. Esses resultados são divergentes com os dados encontrados no presente trabalho em relação aos óleos de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus*, o que pode estar relacionado aos constituintes presentes nos óleos essenciais e também às condições de armazenamento a que elas foram expostas.

Resistência à centrifugação

Os dados obtidos para os géis produzidos em relação à resistência à centrifugação estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Teste de resistência à centrifugação.

| Amostras | Rotação (g) | | |
|---------------------------------------------|-------------|-----|------|
| | 120 | 510 | 2000 |
| Carboxipolimetileno OE <i>M. pulegium</i> | NS | NS | NS |
| Hidroxietilcelulose OE <i>M. pulegium</i> | NS | NS | SF |
| Carboxipolimetileno OE <i>B. citriodora</i> | NS | NS | NS |
| Hidroxietilcelulose OE <i>B. citriodora</i> | NS | NS | SF |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citratus</i> | NS | NS | NS |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citratus</i> | NS | NS | SF |

NS: Não ocorreu separação de fases; SF: houve separação de fases.

Observa-se que não houve separação de fases em nenhum dos géis quando submetidos à rotação de 120 e 510 xg. Contudo, quando submetidos a maiores velocidades de centrifugação (2000 xg), observou-se uma separação de fases em todos os géis adicionados de óleos essenciais na base de hidroxietilcelulose. Provavelmente, esses géis podem perder a homogeneidade quando submetidos a rotações elevadas, que podem ser decorrentes da menor interação dos constituintes dos óleos essenciais *M. pulegium* (pulegona, mentol e mentona), *C. citratus* (geranial e neral) e *C. citriodora* (geranial e neral), com a estrutura do polímero hidroxietilcelulose promovendo, assim, a separação de fase.

Diálise

Pelos resultados, observou-se que a liberação do óleo essencial de *M. pulegium* apresenta diferenças, quando comparado com o óleo incorporado nas bases carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose (Figura 1 A).

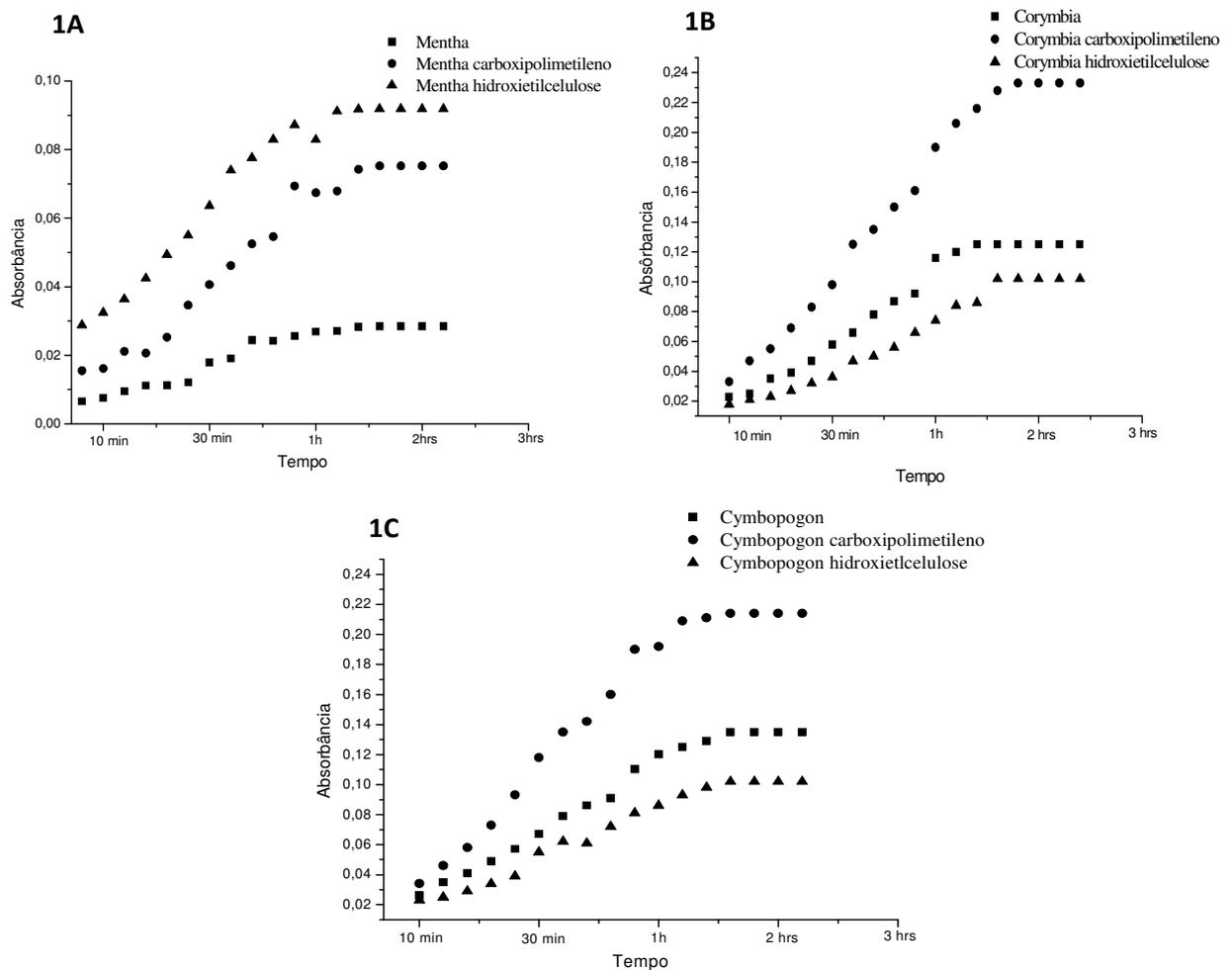


Figura 1. Liberação dos óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* e dos géis à base de hidroxietilcelulose e carboxipolimetileno incorporados com óleos essenciais pelo método de diálise.

O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou baixa liberação e essa foi finalizada com 1 hora de análise, ocorrendo assim, um equilíbrio na solução. Contudo, quando esse óleo essencial foi incorporado às bases carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose foi observada melhor liberação, sendo na base hidroxietilcelulose mais eficaz. Esses dados corroboram com os estudos de resistência à centrifugação mostrando menor número de ligações químicas do óleo essencial de *M. pulegium* com o hidroxietilcelulose. Nota-se um maior número de interações físicas, pois o óleo essencial pode ser liberado da base, sendo um fator importante para produção de antisséptico que necessita entrar em contato com a pele para apresentar efeito sobre os micro-organismos. A liberação do óleo essencial se estabilizou com aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Resultados diferentes foram evidenciados no óleo essencial de *C. citriodora*. Ocorreu menor liberação no óleo essencial incorporado à base hidroxietilcelulose, seguido do óleo essencial puro. Pode-se verificar que o óleo essencial incorporado ao carboxipolimetileno acarretou maior liberação do óleo, sendo esse estabilizado com aproximadamente 1 hora nas três amostras (Figura 1B).

Os resultados da análise do óleo essencial de *C. citratus* mostraram-se semelhantes aos observados no óleo essencial de *C. citriodora*. Ocorreu menor liberação no óleo essencial de *C. citratus*, quando incorporado à base hidroxietilcelulose, seguido do óleo essencial puro e com maior liberação para o óleo essencial incorporado à base carboxipolimetileno. A estabilização ocorreu com aproximadamente 1 hora e meia (Figura 1C). Esse efeito mostra que pode ter ocorrido interações físicas estáveis desses constituintes com o polímero hidroxietilcelulose; assim, os constituintes do óleo essencial se mantinham ligados ao polímero e não permeavam a membrana. Já no caso dos constituintes geranial e neral, tanto do óleo de *C. citriodora* como para o óleo de *C. citratus*, apesar de se ligarem e também promoverem interações com carboxipolimetileno, essas interações poderiam ser desfeitas e os óleos essenciais liberados na pele para controle de micro-organismos, como mostrado no teste de diálise.

Salienta-se que a liberação desde o momento de aplicação até tempo prolongado é o ideal para produtos antissépticos, pois reduzem a contaminação e mantêm a assepsia.

Densidade

Pelos dados descritos na Tabela 7, verificou-se que os resultados de densidade tiveram pouca variação em relação aos controles carboxipolimetileno ($1,01 \text{ g mL}^{-1}$) e hidroxietilcelulose ($1,04 \text{ g mL}^{-1}$).

Tabela 7: Densidade dos géis.

| Amostras | Densidade (g mL ⁻¹) |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| Carboxipolimetileno | 1,01 |
| Hidroxietilcelulose | 1,04 |
| Carboxipolimetileno OE <i>M. pulegium</i> | 1,03 |
| Hidroxietilcelulose OE <i>M. pulegium</i> | 1,05 |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citriodora</i> | 1,10 |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citriodora</i> | 1,08 |
| Carboxipolimetileno OE <i>C. citratus</i> | 1,06 |
| Hidroxietilcelulose OE <i>C. citratus</i> | 1,08 |

O maior valor encontrado foi para os géis de *C. citriodora* à base de carboxipolimetileno (1,10 g mL⁻¹); todos os outros géis tiveram resultados superiores a 1. Ao comparar as moléculas nos géis de *C. citriodora* à base de carboxipolimetileno, pode-se verificar que elas estão mais próximas do que as moléculas do gel carboxipolimetileno sem incorporação de óleo essencial (1,01 g mL⁻¹). Provavelmente, esses valores estão associados ao menor valor de densidade encontrado para o gel controle.

Esse efeito de aumento na densidade em todos os géis incorporados com óleos essenciais, tanto para a base carboxipolimetileno quanto para a base hidroxietilcelulose, pode-se referir às ligações dos constituintes dos óleos essenciais com os géis e das interações, tornando a proximidade das moléculas nesses géis mais efetivas, quando comparados aos controles, nos quais não são observadas essas interações; desse modo, reduzindo o volume e acarretando o aumento da densidade.

Conclusão

O gel carboxipolimetileno incorporado com óleo essencial de *C. citriodora* foi o que manteve maior estabilidade para as características de pH e espalhabilidade, apresentando boa liberação do gel, permitindo, assim, o contato do óleo essencial com a pele, além de apresentar maior rendimento de óleo essencial, tornando-o mais atraente para a produção de um novo produto.

Referências

- [1] Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (2007) Farmacognosia: da planta ao medicamento. (Ed). UFSC/UFRGS. 1- 1104 .
- [2] Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Higienização das mãos em serviços de saúde. (2007) Brasília. 1-52.
- [3] Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, **23**, 213-26.
- [4] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.. (2008) Biological effects of essential oils. *Food Chemistry Toxicology*, **46**, 446-475.
- [5] Dimitri, M. J. (1980) Enciclopédia Argentina de agricultura e jardineira. (Ed). ACME. Buenos Aires: ARG. 1- 818.
- [6] Santos VMCS, Schneider TR, Bizzo HR, Deschamps C. (2012) Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **14**, 97-102.
- [7] Reis CAF, Assis TF, Santos AM, Filho EP. (2013) *Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Embrapa. 1ed. Colombo: Documentos/Embrapa Florestas, 1- 56.
- [8] Vitti AM e Brito S. (2003) Óleo essencial de eucalipto, *Documentos Florestais*, **17**, 1-26.
- [9] Martins MBG, Martins AR, Telascrêa M, Cavalheiro AJ. (2004) Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. *Rev. bras. plantas med.*, **6**, 20-29.
- [10] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira (2010). v. 1, 198-199. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- [11] Pimentel FA, Cardoso MG, Salgado APSP, Aguiar PM, Silva VF, Morais AR, Nelson DL. (2006) A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. *Química Nova*, **29**, 374-375.
- [12] Adams RP. (2007) Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois, Carol Stream, 4v.
- [13] Queiroz, M. B. R. (2008) Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L). e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico. *Dissertação* Brasília BR. 1-121
- [14] Silva LF, Cardoso MG, Batista LR, Gomes MS, Rodrigues LMA, Rezende DACS, Teixeira ML, Carvalho MSS, Santiago JA, Nelson DL. (2015) Chemical Characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L). *American Journal of Plant Science*, **6**, 666-67.
- [15] Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, **67**, 86-95.
- [16] Tas C, Ozkan Y, Savaser A, Baykara T.. (2003) In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Farmaco*. **58**, 605- 611.
- [17] Martins R, Cortes LER, Felipe DF. (2008) Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo da Índia. *Revista Saúde e Pesquisa*, **3**, 259-263.
- [18] Borghetti GS, Knorst MT. (2006) Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. *Ver. Bras Ciênc Farm.*, **42**, 531-7.

- [19] Isaac V, Cefali LC, Chiari BG, Corrêa MA. (2008) Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 29, 81-96.
- [20] Nastruzzi C, Esposito E, Cortesi R, Gambari R, Menegatti E. Kinetics of bromocriptine release from microspheres: comparative analysis between different in vitro models. *J. Microencapsul* . 1994;11(5): 565-574.
- [21] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição, revista – Brasília : Anvisa, 2008.120 p.ISBN 978-85-88233-34-8.
- [22] FerreiraDF(2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- [23] Silva PHM, Poggiani F, Siape JL, Brito JO, Moreira RM. (2009) Produção de óleo essencial e balanço nutricional em *Corymbia citriodora* adubado com lodo de esgoto em diferentes espaçamentos. *Cerne*, 15, 346-354.
- [24] Lucena BFF, Tintino SR, Figueiredo FG, Oliveira CDM, Aguiar JJS, Cardoso EM, Aquino PEA, Andrade JC, Coutinho HDM, Matias EFF. (2015) Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 39-45.
- [25] Gobbo-Neto L, LopesNP.(2007) Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30, 374-381.
- [26] Tomaz MA, Costa AV, Rodrigues WN, Pinheiro PF, Parreira LA, Rinaldo D, Queiroz VT. (2014) Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de Eucalipto. *Biosci. J.*, 30, 475-483.
- [27]Pinto DA, Mantovani EC, MeloEdeC, SedyamaGC,Vieira GHS.(2014) Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*,DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 16, 54-61.
- [28] Bonacucina G, Martelli S, Palmieri GF. (2004) Rheological, mucoadhesive and release properties of carboxipolimetilenos gels in hydrophilic cosolvents. *International Journal. Of Pharmaceutics.*, 282, 115-130.
- [29] FerreiraAO. (2000) Guia Prático da Farmácia Magistral. Boas Práticas de Manipulação. v. 2, Pharmabooks, Juiz de Fora BR.159-197.
- [30] Merclin N, Bramer T, Edsman K.(2004) Iontophoretic delivery of 5-aminoelvilnic acid and its methtl ester using a carboxipolimetileno gel as vehicle. *Journal of Controlled Release*, 98, 57-65.
- [31] Aulton EM. (2005) Delineamento de formas farmacêuticas. Artmed, Porto Alegre BR. 56-536.
- [32] Bugnotto C, Soares G, Laporta, LV, Alves MP, Schimdt CA, Limberger JB. (2006) Estudo de estabilidade de formulações tópico contendo própolis. *Disc. Scientia*, 7, 1-12
- [33] Cordeiro MSF, Costa JKB, Lima CG, Capelo Júnior JDC, Melo AFM.(2013) Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinalles* Roscoe) *Revista Brasileira de Farmácia*, 94, 148-153.
- [34] Martins RM, Cortez LER, Felipe DF. (2008) Desenvolvimento de Formulações de Uso Tópico Empregando o Óleo Essencial Extraído do Cravo-da-Índia. *Saud. Pesq*, 3, 259-263.

Atividades biológicas de antissépticos à base de óleos essenciais

Resumo: O aumento crescente de micro-organismos resistentes, principalmente de bactérias, tem acentuado a necessidade de adotar medidas de prevenção e controle como prioridade na redução da transmissão desses patógenos. Entre as medidas preconizadas para esse controle, têm-se a higienização e a antisepsia das mãos. Na busca de alternativas seguras e eficazes, foram realizados testes biológicos de seis antissépticos naturais, comparando-os com o produto comercial álcool em gel. Os ensaios biológicos *in vitro* referentes aos géis contendo os óleos essenciais de *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus* foram de irritação cutânea, hemólise, fosfolipase, atividade fotoprotetora e antibacteriana. Foi também avaliado o controle de qualidade microbiológica dos géis preparados. Diante dos ensaios, foi possível observar que, comparados ao antisséptico comercial, os antissépticos apresentaram irritação em menor grau, e pelos testes de hemólise e degradação de fosfolipídios, não foi verificada toxicidade dos produtos. Os géis não apresentaram fator de proteção solar e a atividade antibacteriana foi significativa e maior que a do álcool em gel. Os géis mantiveram o controle de qualidade microbiológica. Os géis à base de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* apresentaram características de interesse para produção de novos produtos.

Palavras-chave: *Mentha pulegium*, *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, novos produtos

Introdução

Os antissépticos são produtos utilizados com intuito de eliminação ou inibição do crescimento dos micro-organismos na pele ou em outros tecidos vivos. Para as agências nacionais e internacionais reguladoras das práticas de saúde, a higienização das mãos é predita como essencial. Além da área da saúde, os ambientes alimentares e os locais de atendimento público são ambientes propícios aos surtos que resultam na contaminação e

mortes. A higienização das mãos é considerada a medida de controle mais importante e eficaz para prevenir a transmissão de patógenos. Mesmo essa técnica tendo implicações decisivas para reduzir/eliminar as contaminações, muitos autores mostram que esse princípio ainda é pouco utilizado (Figueiredo et al., 2013; Ho et al., 2014; Brasil, 2007). O Guia de orientação para a higiene das mãos nos serviços de saúde documentou o escopo global da limpeza das mãos. A evolução de produtos para sanitização das mãos trouxe alternativas mais eficazes, com menor nível de irritação para as mãos, reduzindo, assim, o tempo gasto para lavá-las (Whitby et al., 2007).

Abaza et al. (2010) evidenciaram que a limpeza das mãos com antisséptico é mais eficaz que a lavagem das mãos. Neste trabalho, os autores, comparando limpeza à assepsia, concluíram que esfregar as mãos com antisséptico à base de álcool é muito mais eficiente do que a lavagem tradicional das mãos. Tendo em vista os problemas decorrentes da contaminação bacteriana, buscam-se alternativas para sanar esses danos e, assim, surgem novas perspectivas à base de produtos naturais proveniente de plantas.

Perante a utilização dos óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* na perfumaria, em cosméticos, na indústria alimentícia e também para produção de medicamentos, propôs-se a verificação de propriedades biologicamente ativas de seis géis antissépticos incorporados com os óleos essenciais das plantas citadas anteriormente, para examinar o potencial de redução de micro-organismos, a investigação do potencial tóxico deles por testes biológicos, assim como a contaminação dos géis.

Material e Métodos

Coleta e extração dos óleos essenciais

As amostras de folhas de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* foram coletadas às 7 horas do mês de janeiro de 2016, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, em um dia ameno e sem precipitação. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil) 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. e 918 metros de altitude.

As folhas de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* foram pesadas e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros, por 2 horas, para obtenção do hidrolato, o qual foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206 BL) a 965 xg por 10 minutos. O óleo essencial foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocado em frasco; e mantido sob refrigeração até a utilização nas análises e produção dos géis (Farmacopéia, 2010). A extração dos óleos essenciais foi realizada em triplicata. Na determinação da umidade do material vegetal, utilizou-se o sistema de Dean Stark, que se baseia no princípio da imiscibilidade de solventes, no caso cicloexano e água. Foram utilizados 5 g de material vegetal picado, juntamente com 80 mL de cicloexano, para posterior determinação do rendimento do óleo presente na planta fresca. A determinação da umidade foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Pimentel et al. (2006).

Preparação dos géis

O gel controle de hidroxietilcelulose foi produzido segundo metodologia de Queiroz (2008) com as devidas modificações, utilizando 1,8% de hidroxietilcelulose, 0,2% de metilparabeno, 5% de propilenoglicol e 100 mL de água destilada. As substâncias foram dispersas na água até a completa gelificação e formação do gel. O gel de hidroxietilcelulose com óleo essencial foi preparado da mesma forma, adicionando 3,35% de óleo essencial (*M.*

pulegium ou *B. citriodora* ou *C. citratus*), devido a estudos realizados por Silva et al. (2015). Esses autores determinaram esta concentração inibitória para eliminar as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, empregando o óleo essencial de *M. pulegium*, que serviu como parâmetro para produção dos géis, já que esses micro-organismos são patógenos contaminantes das mãos.

Na preparação do gel controle de carboxipolimetileno, foram utilizados 0,8% de carboxipolimetileno, 0,2% de metilparabeno, 5% de propilenoglicol e 100 mL de água destilada; os produtos foram dispersos na água até a completa gelificação e formação dos géis. O gel de carboxipolimetileno com óleo essencial foi preparado da mesma forma, adicionando 3,35% de óleo essencial (*M. pulegium* ou *B. citriodora* ou *C. citratus*) segundo metodologia de Mura et al. (2008), com modificações (alteração do pH inicial do gel).

Avaliação do potencial de irritação cutânea

O ensaio de irritação cutânea foi determinado *in vitro* pela desnaturação da albumina do ovo, realizado nos períodos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a produção dos géis. Foram adicionados 10 g de claras de ovos, previamente homogeneizadas em agitador magnético por 5 minutos, a 2,5 g de cada um dos géis [Carboxipolimetileno, Hidroxietilcelulose, Álcool, Carboxipolimetileno-óleos essenciais (*M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus*), Hidroxietilcelulose -óleos essenciais (*M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus*)]. A mistura formada (ovalbumina + gel) permaneceu sob agitação por 2 minutos e, em seguida, foi realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis. A solução-controle empregada foi clara de ovo e água destilada, nas mesmas proporções das amostras testes (Lorca et al., 2008).

Avaliação do fator de proteção solar dos antissépticos (FPS)

O FPS *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986). As leituras espectrofotométricas foram realizadas assim que os géis foram adicionados à cubeta de quartzo de 1,0 cm caminho óptico, na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 minutos. Os géis controles (hidroxietilcelulose ou carboxipolimetileno) foram utilizados como branco e o experimento foi realizado em quadruplicata.

O fator de proteção solar (FPS) espectrométrico foi calculado usando os valores de absorvância na equação:

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda).$$

Em que EE (λ) representou o efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (nm); I (λ), intensidade da radiação solar no comprimento de onda (λ) nm; Abs (λ), leitura espectrofotométrica da absorvância da solução do filtro solar no comprimento de onda (nm) e CF, fator de correção igual a 10.

Avaliação das atividades hemolítica e degradação de fosfolípidios de membranas pelos géis

A análise da atividade hemolítica dos géis foi avaliada dissolvendo-se 1,3 g de ágar em 100 mL de PBS, pelo aquecimento em micro-ondas, até a obtenção de uma solução transparente. Essa solução foi resfriada até atingir a temperatura de 75 °C, acrescentando-se 1,0 mL de cloreto de cálcio. Quando a solução atingiu 60 °C, adicionou-se 0,1g de azida de sódio. Adicionou-se então 1,2 mL de eritrócitos sanguíneos, quando a temperatura atingiu 50 °C. O meio foi colocado em placas de Petri, fazendo poços no meio de 4 mm de diâmetro, as amostras de géis foram adicionadas nos poços, levando as placas à estufa a 37 °C. A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado, após 12 horas de incubação (Price; Wilkinson; Gentry, 1982).

A verificação da atividade de degradação de fosfolipídios dos géis foi realizada dissolvendo 1,3 g de ágar em 100 mL de PBS (fosfato tamponado em salina) pelo aquecimento em micro-ondas, até a obtenção de uma solução transparente. Essa solução foi resfriada até atingir a temperatura de 75 °C, acrescentando-se 1,0 mL de cloreto de cálcio. Quando a solução atingiu 60 °C, adicionou-se 0,1g de azida sódica. Adicionou-se 1,8 mL de gema de ovo, sem o envoltório membranoso quando a temperatura atingiu 50 °C, produzindo o meio para a atividade, rico em lecitinas. A solução foi vertida em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram feitos orifícios de 4 mm de diâmetro, adicionando-se as amostras de géis nos poços. As placas foram levadas à estufa a 37 °C. A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado, após 12 horas de incubação (Price; Wilkinson; Gentry, 1982).

Avaliação da atividade antibacteriana dos géis

A avaliação da atividade antibacteriana dos géis foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, após 15 dias de produção dos géis. Os micro-organismos empregados foram *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Durante o experimento, os micro-organismos foram mantidos em tubos contendo meio de congelamento sob refrigeração. Para ativação das culturas bacterianas, as estirpes foram transferidas para caldo de infusão de coração (BHI) e incubadas a 37 °C durante 24 horas para se obter o inóculo.

Após ativação da suspensão bacteriana, 300 µL do meio foram transferidos para um tubo contendo 5 mL de caldo de soja, peptona e caseína (TSB). Os tubos foram novamente incubados a 37 °C até atingirem turvação de uma solução padrão de referência de 0,5 McFarland, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1×10^8 UFC mL⁻¹. A

turbidez controle foi verificada utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 PC 1) no comprimento de onda de 625 nm, em que a absorvância ocorreu entre 0,10 e 0,8; valor esse recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCSL, 2003).

A atividade antibacteriana dos géis foi determinada por difusão em cavidade ágar utilizando Agar TSA (Ágar Tripitona Soja) (Pereira et al., 2008). Inicialmente, adicionou-se uma camada fina de ágar às placas de Petri (140 mm de diâmetro). Após solidificação, foram colocadas pérolas de vidro estéreis de 4 mm no meio sólido. Alíquotas de culturas padronizadas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram transferidas para frascos de vidro contendo 90 mL de ágar Mueller-Hinton, respectivamente, para fornecer concentrações de 10^6 UFC mL⁻¹ na cultura em desenvolvimento. O meio líquido foi vertido sobre a camada anterior.

Após a solidificação do ágar, as pérolas de vidro foram removidas com o auxílio de pinças estéreis; os géis foram aplicados às cavidades com auxílio de palitos estéreis nas cavidades. As placas foram incubadas em BOD a 37 C durante 24 horas e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em triplicata para cada tratamento. Utilizou-se gel carboxipolimetileno e hidroxietilcelulose como controles negativos, e para o controle positivo, foi utilizado álcool em gel. A sensibilidade das bactérias aos géis foi determinada a partir dos diâmetros das zonas de inibição.

Controle de qualidade microbiológico

A avaliação do controle de qualidade microbiológico dos géis foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, após 15 dias de produção dos géis.

As amostras foram avaliadas levando-se em consideração a Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa, RDC 481/99 (Brasil, 1999). No preparo das amostras, 1 g dos géis foi

diluído nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-4} em solução-tampão fosfato (pH 7,2) contendo 2% de Tween 80. A contagem do número total de micro-organismos mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras foi realizada adicionado 1 mL da amostra diluída em placa de Petri e vertido, separadamente, 15 a 20 mL de ágar caseína soja e, ágar sabouraud-dextrose, mantidos a 45 a 50 °C. Foram utilizadas duas placas para cada meio e diluição (10^{-1} ou 10^{-4}). As placas contendo ágar caseína-soja foram incubadas a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 5 dias e as placas contendo ágar sabouraud-dextrose a $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 7 dias, para determinação do número de micro-organismos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, respectivamente (Farmacopéia Brasileira, 2010). Para determinação do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, as amostras diluídas nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-4} foram transferidas para 9 mL de caldo de enriquecimento (caldo caseína-soja), com posterior homogeneização e incubação a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 24 horas. Caso houvesse crescimento no caldo, isto é, presença de turbidez característica da proliferação microbiana, seria semeada uma porção do meio para placas de Petri contendo ágar sal manitol e incubadas a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 72 horas (Farmacopéia Brasileira, 2010). Os coliformes totais e termotolerantes foram determinados utilizando as amostras diluídas nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-4} , sendo 1 mL da diluição transferido para 9 mL de caldo de enriquecimento (caldo caseína-soja), com posterior homogeneização e incubação a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 24 h. Caso houvesse crescimento no caldo, isto é, presença de turbidez característica da proliferação microbiana, 1 mL do caldo seria transferido para 100 mL de caldo MacConkey, que seria incubado a $43\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 a 48 h (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Análise estatística

Os dados da capacidade fotoprotetora, irritação cutânea e atividade antibacteriana foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira 2011) e as médias comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados de

irritação cutânea foi realizado esquema fatorial 10 x 6 [10 amostras (9 géis e a água) e 5 tempos] e para atividade antibacteriana, 9 x 2 (9 géis e 2 bactérias).

Resultados e Discussão

Os óleos essenciais apresentaram rendimento de 1,66%; 3,43% e 1,63% para *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus*, respectivamente. Os constituintes majoritários dos óleos foram pulegona (50,6%), mentol (25,2%) e mentona (23,5%) para *M. pulegium*; geranial (55,0%) e neral (38,5%) para *C. citriodora*; e geranial (58,1%) e neral (41,3%) para *C. citratus* (Silva, 2017). Os géis apresentaram características similares aos óleos essenciais que os incorporaram.

O teste de irritação cutânea mostrou que os géis à base de óleos essenciais apresentaram resultados de irritação iguais ou inferiores ao produto comercial álcool em gel utilizado. Isso mostra que a irritação que esses géis podem causar é apenas superficial, como ressecamento, verificado para utilizadores do álcool em gel. O ensaio mostrou que houve desnaturação proteica, pois, comparados ao controle negativo (água), foram verificadas variações comprovadas estatisticamente. Os géis, à base de hidroxietilcelulose foram os que apresentaram menores valores de irritação, sendo esses diferentes estatisticamente da água; contudo, diferenças menos significativas foram observadas para a base de carboxipolimetileno (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da irritação cutânea dos géis antissépticos *in vitro*.

| Tempo (dias) | Amostras (transmitância) | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
| | C | H | Al | C(M) | H(M) | C(Cd) | H(Cd) | C(Ct) | H(Ct) | Água |
| 1 | 1,80A | 66,70E | 1,66A | 1,30A | 22,80D | 5,10B | 10,34C | 6,45B | 7,79B | 93,83F |
| 7 | 4,86B | 72,35F | 1,63A | 1,70A | 50,27C | 0,75A | 57,93D | 0,56A | 67,37E | 97,23F |
| 15 | 19,96D | 91,66G | 2,43A | 4,60AB | 89,10F | 6,63BC | 82,66F | 7,35C | 72,33E | 93,86G |
| 30 | 5,10B | 55,33F | 1,23A | 1,86A | 16,03D | 7,50C | 20,67E | 7,46C | 17,83D | 63,50G |
| 60 | 4,46B | 78,06F | 1,23A | 1,83A | 51,83C | 5,20B | 67,00E | 5,56B | 58,00D | 78,23F |

C= carboxipolimetileno, H= hidroxietilcelulose, Al= álcool em gel, C(M)= carboxipolimetileno óleo essencial de *Mentha pulegium*, H(M)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *Mentha pulegium*, C(Cd)= carboxipolimetileno óleo essencial de *C. citriodora*, H(Cd)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *C. citriodora*, C(Ct)=carboxipolimetileno óleo essencial de *C.citratu*s, H(Ct)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *C. citratu*s. A estatística refere-se a cada linha, portanto cada dia foi realizada uma análise para verificar a diferença em relação ao controle negativo (água). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O ensaio *in vitro* de determinação do potencial de irritação cutânea é baseado na desnaturação da albumina do ovo, que apresenta semelhança na solubilidade desta proteína quando comparada à solubilidade das proteínas encontradas na epiderme.

Na primeira avaliação (1 dia) verificou-se que os menores valores de transmitância foram encontrados para o álcool em gel, para o gel carboxipolimetileno e para o gel carboxipolimetileno incorporado ao óleo essencial de *M. pulegium*. Como a albumina apresenta grupos ácidos em sua estrutura, provavelmente podem ter interações hidrofóbicas com os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. pulegium*, assim como interações com as hidroxilas do álcool em gel e também com os grupos ácidos do gel carboxipolimetileno. Os maiores valores para a transmitância foram verificados para água, seguido do gel hidroxietilcelulose, mostrando assim que, provavelmente, eles não interagem com a albumina. Após 7 dias, observaram-se menores valores para o álcool em gel, e para os

géis de carboxipolimetileno incorporados aos óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus*. Provavelmente, pode ter ocorrido a formação de ligações com os constituintes dos óleos de *M. pulegium*, que foram liberados do gel; outra probabilidade são interações hidrofóbicas dos constituintes majoritários com os grupos ácidos da albumina podendo desestabilizar a estrutura dessa proteína, promovendo a redução dos valores de transmitância.

Nos tempos de 15, 30 e 60 dias, os menores valores de absorvância foram observados para o álcool em gel e para o gel carboxipolimetileno incorporado ao óleo essencial de *M. pulegium*. Com esses resultados, pode-se inferir que esse óleo, ao ser liberado do gel, interage com a albumina. Entretanto, no tempo de 15 dias, a água e o gel hidroxietilcelulose proporcionaram maiores valores de transmitância, seguidos dos géis hidroxietilcelulose incorporados com os óleos essenciais de *C. citriodora* e *M. pulegium*. Em 30 dias, a água apresentou maior transmitância, seguida do gel hidroxietilcelulose e do gel hidroxietilcelulose incorporado com o óleo essencial de *C. citriodora*. Novamente em 60 dias, a água e o gel hidroxietilcelulose apresentaram maior transmitância seguida do gel hidroxietilcelulose incorporado com o óleo essencial de *C. citriodora*, mostrando menor disponibilidade dos constituintes deste óleo essencial e menores interações com a albumina, não apresentando, desse modo, efeito irritante.

Como os valores referentes aos ensaios de irritação não se mostraram estatisticamente distintos do álcool em gel, pode-se inferir que os géis produzidos não apresentam efeito de irritação cutânea, pois os efeitos observados para o álcool são apenas para esse tipo de irritação.

Quando as proteínas funcionais do corpo são desnaturadas como as proteínas que compõem a pele, elas se tornam incapazes de desempenhar seu papel fisiológico, pois o arranjo na sua superfície é fundamental para o desempenho de suas funções, assim a

desnaturação de proteínas superfícies da pele podem causar reações de desconforto no local onde o produto foi aplicado, de intensidade variada, como um leve ressecamento, manifestadas como ardor ou prurido, ou ainda podendo causar destruição do tecido.

Lorca et al. (2008) avaliaram o efeito de tenso-ativo sobre a pele em testes *in vitro* e *in vivo*. No teste "*in vitro*", os surfactantes apresentaram ação sobre as proteínas do ovo ao serem comparados com o controle, caracterizando desnaturação proteica; contudo, não foram considerados irritantes pelo teste "*in vitro*". Também não foi observado edema ou eritema na pele de nenhum dos animais submetidos ao teste. Dessa forma, como os surfactantes e os géis a base de óleos essenciais não demonstraram potencial de irritação, estes últimos podem ser considerados como uma boa alternativa de utilização nesta perspectiva.

Jäger et al. (1992) relataram que houve absorção percutânea do óleo essencial de lavanda em ensaios com seres humanos através de aplicação na pele. A partir de preparados de óleo vegetal de amendoim acrescido de 2% do óleo essencial de lavanda, traços de linalol e de acetato de linalila puderam ser detectados no sangue; após vinte minutos, foram percebidas as concentrações de 100 ng mL^{-1} de acetato de linalila e 121 ng mL^{-1} de linalol. Verificou-se também que após 90 minutos de experimentação, a maioria dos constituintes do óleo de lavanda havia sido eliminada da corrente sanguínea. Jäger et al. (1992) mostram que além de irritação, produtos à base de óleos essenciais podem ser absorvidos pela pele; dessa maneira, estudos que caracterizam a toxicidade desses produtos são essenciais para verificar a possibilidade de uso.

Os estudos de hemólise e atividade sobre fosfolipídeos são fundamentais para análises de toxicidade de produtos e o ensaio realizado com os géis à base dos óleos essenciais não mostraram potencial tóxico para células sanguíneas e para os fosfolipídeos, que são estruturas que compõem as membranas celulares. Nesses ensaios, não foram verificados a formação de

halos que evidenciam a toxicidade, inferindo que os óleos incorporados às bases podem ser utilizados sem risco até a concentração de óleo essencial testada.

Silva (2015), avaliando os testes de hemólise e o efeito sobre os fosfolípidos que compõem as membranas celulares para os óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Mentha viridis*, não observou atividade sobre os fosfolípidos para esses óleos, ao passo que para o ensaio de hemólise em meio sólido, foi possível observar que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou um efeito crescente de atividade hemolítica, iniciando-se com 5,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e sendo mais pronunciado na concentração de 87,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$; o óleo de *M. viridis* apresentou baixa atividade, sendo essa visualizada apenas nas concentrações de 43,6 e 87,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

As diferenças encontradas para os óleos essenciais nos ensaios hemolíticos podem ser decorrentes da incorporação desses óleos ao gel. Essa incorporação pode ter sido efetiva, reduzindo a liberação do óleo para o meio e, assim, não permitindo a indução de hemólise pelo óleo essencial.

Yamagushi e Veiga-Júniro (2013), estudando a atividade hemolítica do óleo essencial obtido das folhas e galhos de *Endlicheria citriodora* em eritrócitos de camundongos, nas concentrações entre 1,22 e 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não observaram hemólise, demonstrando que esse óleo possui baixa toxicidade. Como os géis incorporados com os óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* não induziram hemólise ou degradação dos fosfolípidos, pode-se inferir não toxicidade até a concentração avaliada.

Os resultados de atividade fotoprotetora mostram que os géis produzidos com os óleos essenciais de *M. pulegium*, *C. citriodora* e *C. citratus* não apresentam valores significativos de atividade fotoprotetora (Tabela 2).

Tabela 2: Análise da capacidade fotoprotetora dos géis antissépticos *in vitro*.

| Amostra | FPS |
|---------|-------|
| C(Cd) | 0,31B |
| C(M) | 0,07A |
| C(Ct) | 0,29B |
| H(Cd) | 0,47C |
| H(M) | 0,25B |
| H(Ct) | 0,59D |

C(M)=carboxipolimetileno óleo essencial de *Mentha pulegium*, H(M)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *Mentha pulegium*, C(Cd)= carboxipolimetileno óleo essencial de *C. citriodora*, H(Cd)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *C. citriodora*, C(Ct)=carboxipolimetileno óleo essencial de *C.citratius*, H(Ct) hidroxietilcelulose óleo essencial de *C.citratius*. As amostras foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade para verificar as diferenças. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos dados descritos na tabela anterior, pode-se observar que o gel que apresentou maior valor de atividade fotoprotetora foi o gel hidroxietilcelulose incorporado ao óleo de *C. citratius* (0,59). De acordo com a legislação brasileira, Resolução - RDC nº 30, de 1 de junho de 2012 (Brasil, 2012), um produto adequado para utilização em cosméticos para fotoprotetor, deve apresentar um FPS de no mínimo 6, sendo assim, nenhum dos géis testados, nas condições padronizadas, podem ser considerados com potencial fotoprotetor.

Violante et al. (2009), estudando extratos de *Macrosiphonia velame* com intuito de observar a atividade fotoprotetora de produtos naturais, observaram *in vitro* um FPS de $0,36 \pm 0,01$, resultado inferior a 6, que é exigido pela legislação; contudo, superior aos encontrados neste trabalho, exceto para gel hidroxietilcelulose incorporado ao óleo de *C. citratius*. Esse resultado mostra que alguns produtos naturais não apresentam atividade fotoprotetora.

Esse ensaio mostrou variação em relação aos polímeros em que os óleos foram incorporados. Todos os géis à base de hidroxietilcelulose incorporados com os óleos essenciais mostraram melhores resultados comprovados estatisticamente, quando comparados à base carboxipolimetileno. Esse fato pode ser decorrente das ligações e interações (eletrostáticas e dipolo-dipolo) que podem ter acontecido com os constituintes dos óleos essenciais e os grupos presentes nos polímeros, pois o carboxipolimetileno apresenta grupos ácidos e o hidroxipolimetileno, grupos hidroxila em sua estrutura, acarretando, assim, nas diferenças verificadas nos FPS, podendo ter tido interações mais efetivas, impedindo que os constituintes dos óleos essenciais pudessem exercer atividade fotoprotetora.

Os filtros solares que protegem para UVB (radiação ultravioleta com comprimento de onda entre 290 e 320 nanômetros) evitam queimaduras solares. Muitos protetores solares contêm compostos orgânicos que absorvem a luz ultravioleta ou refletem a luz ou uma combinação de ambos. Os principais ingredientes dos filtros solares são moléculas aromáticas conjugadas com grupos carbonila. Essa estrutura geral permite à molécula absorver raios ultravioleta de alta energia e liberar essa energia como raios de baixa energia, e os óleos essenciais em estudo não apresentam constituintes aromáticos em suas estruturas, justificando a ausência de proteção dos géis incorporados com os óleos essenciais (BRASIL, 2012).

Os resultados da atividade antibacteriana para os géis mostraram que eles são candidatos promissores para produção de novos antissépticos (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da atividade antibacteriana dos géis frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*

| Médias dos diâmetros dos halos de inibição (cm) | | |
|-------------------------------------------------|---------------------|-----------|
| Bactérias | Amostras | Diâmetros |
| <i>E. coli</i> | Carboxipolimetileno | 0,00Ab |
| | Hidroxietilcelulose | 0,00Ab |
| | Al | 0,80Cb |
| | C(M) | 1,07EDa |
| | H(M) | 0,50Ba |
| | C(Cd) | 1,37Fa |
| | H(Cd) | 1,15Ea |
| | C(Ct) | 0,98Da |
| | H(Ct) | 0,98Db |
| <i>S. aureus</i> | Carboxipolimetileno | 0,00Ab |
| | Hidroxietilcelulose | 0,00Ab |
| | Al | 0,80Bb |
| | C(M) | 1,27Db |
| | H(M) | 0,80Bb |
| | C(Cd) | 1,07Cb |
| | H(Cd) | 1,82Fb |
| | C(Ct) | 1,42Eb |
| | H(Ct) | 0,82Ba |

C(M)= carboxipolimetileno óleo essencial de *Mentha pulegium*, H(M)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *Mentha pulegium*, C(Cd)= carboxipolimetileno óleo essencial de *C. citriodora*, H(Cd)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *C. citriodora*, C(Ct)= carboxipolimetileno óleo essencial de *C.citratus*, H(Ct)= hidroxietilcelulose óleo essencial de *C.citratus*. As letras maiúsculas referem-se à estatística dos géis com apenas uma bactéria e as letras minúsculas refere-se referem-se a comparação dos géis com diferentes bactérias, considerando uma mesma amostra de gel.

Para o gel carboxipolimetileno *C. citriodora*, foi verificado efeito muito superior ao álcool em gel; os demais géis também apresentaram efeito significativamente superior ao

produto comercial, com exceção do gel hidroxietilcelulose *M. pulegium*, que apresentou efeito inferior para a bactéria *E. coli*. Esses efeitos podem ser decorrentes da liberação dos óleos essenciais dos géis, produzindo assim efeitos significativos contra *E. coli*. Comparando os géis para a bactéria *E. coli*, foi verificado que a incorporação da base carboxipolimetileno com os óleos essenciais de *M. pulegium* e *C. citriodora* mostrou-se mais efetiva em relação à incorporação desses óleos à base hidroxietilcelulose, já para o óleo essencial de *C. citratus* não mostrou diferença estatística quanto à inibição de *E. coli* com a mudança das bases (carboxipolimetileno ou hidroxietilcelulose). Todos os géis testados, exceto os controles e o gel hidroxietilcelulose incorporado com óleo essencial de *M. pulegium*, apresentaram efeitos superiores ao produto comercial álcool em gel.

O efeito sobre o *S. aureus* foi estatisticamente maior para o gel hidroxietilcelulose *C. citriodora*; nesse caso, os géis à base de hidroxietilcelulose incorporados com *M. pulegium* e *C. citratus* mostraram efeito semelhante ao álcool em gel. Aferindo os resultados em relação às diferentes bases dos géis para a bactéria *S. aureus*, pode-se constatar que a base carboxipolimetileno teve melhores resultados com os óleos *M. pulegium* e *C. citratus*; contudo, para o óleo essencial de *C. citriodora*, o gel mais eficaz foi o incorporado com a base hidroxietilcelulose. Ao comparar os diferentes géis frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, todos os géis mostraram melhores resultados para a bactéria *S. aureus* exceto o gel hidroxietilcelulose *C. citratus*, que mostrou melhor resultado para *E. coli*; portanto, a incorporação dos óleos essenciais aos géis pode ter influenciado na disponibilidade dos constituintes, apresentando a diferença observada.

Diferenças na atividade antibacteriana existentes entre óleos essenciais de diferentes espécies de plantas são atribuídas aos seus compostos químicos (Tajkarimi et al., 2010). A eficácia dos óleos essenciais é dependente do pH, temperatura de tratamento, das concentrações e tipo de componentes ativos. Burt (2004) afirma que bactérias Gram-positivas

têm sido menos ou igualmente sensíveis a bactérias Gram-negativas; esse fato corrobora com o presente estudo, em que foram observados melhores resultados para a bactéria *E. coli*.

O teste de contaminação dos géis antissépticos preparados neste trabalho mostrou a sua eficácia, pois não foi observado nenhum crescimento de fungo ou bactéria nos géis, mostrando, assim, que os antissépticos produzidos apresentaram características satisfatórias.

Bugno et al. (2003), avaliando a qualidade microbiológica de produtos saneantes, observaram que do total de produtos analisados, 41% apresentaram crescimento microbiano, sendo em 96% das amostras contaminadas foi possível detectar a presença de bactérias heterotróficas; em 21%, a presença de fungos; em 16%, a presença de coliformes e, em 5%, a presença de coliformes fecais.

Silva e Neto (2002) destacam a importância dos testes de contaminação microbiológica como um dos principais agentes que podem inviabilizar a produção e comercialização de uma gama de produtos. Para a obtenção de produtos de qualidade microbiológica, os autores mostram que é extremamente necessário não só a ausência de micro-organismos patogênicos, mas também a garantia de que a carga microbiana não patogênica seja a menor possível e que as concentrações dos agentes estejam dentro das concentrações legalmente permitidas.

Dessa forma, com a finalidade de garantir a segurança dos antissépticos preparados à base de óleos essenciais, foram realizados estudos das atividades biológicas dos produtos. Os testes de segurança do produto que mediram a irritabilidade evidenciou que os géis não apresentaram esse efeito irritante superior ao do produto comercial, álcool em gel. Os testes de hemólise e de atividade fosfolipásica não mostraram toxicidade dos produtos, o que indica segurança de uso deles até a concentração trabalhada. A análise de atividade fotoprotetora mostrou que os géis não apresentaram fator de proteção solar; contudo, os testes de inibição

bacteriana exibiram grande potencial antisséptico pelos géis, apresentando atividade sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. A avaliação da presença de contaminantes microbianos potencialmente nocivos, como as bactérias e os fungos, mostraram que os géis são eficazes e seguros, pois não apresentaram contaminação. Sendo assim, os géis preparados podem ser considerados alternativas promissoras em relação aos antissépticos comerciais em uso e o gel hidroxietilcelulose incorporado ao óleo essencial de *C. citriodora* foi o produto com melhores características biológicas, não apresentando potencial de irritabilidade, exibindo ação em bactérias, além de não apresentar toxicidade e contaminação.

Referências

- Abaza, A.F., Amine, A.E., Hazzah. W.A., 2010. Comparative study on efficacy of different alcohol hand rubs and routine hand wash in a health-care setting, Alexandria, Egypt. *J. Egypt Public. Health Assoc.* 85, 273-83.
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., Kleinig, D.A., McDonald, MW., Turner J.D. *Forest tress of Australia*. Austrália: CSIRO Publishing.
- Brasil. 1999. Resolução da Diretoria Colegiada nº 481, de 23 de setembro de 1999. Brasília: Anvisa.
- Brasil. 2012. Resolução -RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Brasília: Anvisa.
- Brasil. 2007. Higienização das mãos em serviços de saúde. Brasília: Anvisa.
- Bugno, A., Buzzo, A.A., Pereira, T.C., 2003. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 39, 335-340.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223-253.
- Dimitri, M.J., 1980. *Enciclopédia Argentina de agricultura e jardineira*. Buenos Aires: ACME.
- Farmacopeia brasileira. 2010. Métodos de farmacognosia, ensaios biológicos e microbiológicos. Brasília: Anvisa
- Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.

- Figueiredo, A.E., de Siqueira, S.L., Poli-de-Figueiredo, C.E., d'Avila, D.O., 2013. Hand hygiene in peritoneal dialysis patients: a comparison of two techniques. *Perit. Dial. Int.* 6, 655-61.
- Ganjewala, D., Luthra, R., 2010. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. *Nat. Prod. Commun.* 5, 163–172.
- Ho, J.D., Ansari, R.K., Page, D., 2014. Hand sanitization rates in an urban emergency medical services system. *J Emerg Med.* 2, 163-8.
- Jäger, W., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Fritzer, M., 1992. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *J Cosmet Sci.*, 43, 49-54.
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Srivastava, A., Kumar, S., 2000. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica.* 111, 121–125.
- Lorca, B.S.S., Volpato, N.M., Fonseca, L.B., Santos, E., 2008. Análise “in vitro” e “in vivo” do potencial irritante de tensoativos derivados de aminoácidos. *Rev Anal.*, 32,80-3.
- Mansur J.S., Breder., M.N.R, Mansur, M.C.A., Azulay, R.D. 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61, 121-124.
- Mansur, J.S., Breder M.V.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D. 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, 61, 121-124.
- Mura, P., Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Michelacci, I., Ghelardini, C., Rabasco, A.M., 2007. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 67, 86-95.
- National committee for clinical laboratory standards(NCCLS). 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard. EUA: Wayne.
- Pereira, A. A., Cardoso, M. G., Abreu, L. R., Morais, A. R., Guimarães, L. G. L., Salgado, A. P. S. P., 2008. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciênc. agrotec.*, 32, 887-893.
- Pimentel, F.A., Cardoso, M.G., Salgado, A.P.S.P., Aguiar, P.M., Silva, V.F., Morais A.R., Nelson, D.L., 2006. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. *Quím. Nova*, 29, 97-102.
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O., 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20, 7-17.
- Queiroz, M. B. R. 2008. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L). e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico. Brasil, 212p. Mestre Dissertação, Universidade de Brasília.

- Santos, V.M.C.S., Schneider, T.R., Bizzo, H.R., Deschamps, C., 2012. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. Rev. Bras. Pl. Med. 14, 97-102, 2012.
- Silva, C.H.P., Netto, H., 2002. Contaminação Microbiana em produtos Cosméticos e Seu Controle. Science News. 1, 05-07.
- Silva, L.F., Cardoso, M.G.C., Batista, L.R., Gomes, M. S., Rodrigues, L. M. A., Rezende, D., A. C. S. Nelson, D. L., Teixeira, M. L., Carvalho, M. S.S., Santiago, J. A. 2015, Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L.(L) American J Plant Sci., ,6,666-675.
- Silva, L. F. Produção de géis antissépticos a base de óleos essenciais de *Mentha pulegium* L., *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon citratus*: propriedades físico-químicas e atividades biológicas. Brasil, 81p. Doutora. Tese, Universidade Federal de Lavras.
- Silva, M.F.S., 2013. Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana de *Pityrocarp moniliformis* (benth) Luckon & r. w. Jobson (fabaceae). Brasil, 148p. Mestre Dissertação, Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21, 1199-1218.
- Villaverde, J.M., Sanches, L., Terra, V.A., Cecchini, R., Cecchini, A.L., Luiz, R.C., 2013. Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT) Effects of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on human melanoma (SK-MEL 147) and keratinocyte (HaCaT) cells. Biosaúde, Londrina, 15,22-36.
- Violante, I.M.P., Souza, I.M., Venturini, C. L., Ramalho, A.F.S., Santos, R.A.N., Ferrari, M., 2002. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Rev. bras. farmacogn. 19, 452-457.
- Whitby, M., Pessoa-Silva, C.L., McLaws, M.L., Allegranzi, B., Sax, H., Larson, E., Seto, W.H., Donaldson, L., Pittet, D., 2007. Behavioural considerations for hand hygiene practices: the basic building blocks. J Hosp Infect. 1,1-8.
- Yamaguchi, K. K. L., Veiga-junior, V. F., 2013. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. Quím. Nova. 36,826-830.