

Antimicrobial activity of *Cono-bea scoparioides* essential oil, and its association with synthetic preservatives.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DO ÓLEO ESSENCIAL DE CONOBEA SCOPARIOIDES E SUA ASSOCIAÇÃO COM CONSERVANTES SINTÉTICOS PARA UTILIZAÇÃO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Cristina M. T. S. Miguel¹, Cristina H. Serra¹, Marcus T. Scotti², Paulo R. H. Moreno^{1,3*}

1-Programa de Pós Graduação de Farmácia e Medicamentos – Universidade de São Paulo.

2. Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, UFPB, Campus I

3 –Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: O presente trabalho visa avaliar a composição química do óleo essencial de *Cono-bea scoparioides* Cham. & Schltdl., o seu potencial antimicrobiano e o efeito de sua associação com parabenos em bases cosméticas. Seus compostos majoritários são: éter metílico do timol (39,2%), timol (33,8 %) e α -felandreno (15,9%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial e do timol foi acessada através da concentração inibitória mínima (CIM), cujos resultados em $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial e o timol foram respectivamente: *S. aureus* 650,7 e 284,9, *E. coli* 721,5 e 271,2, *P. aeruginosa* 1748,0 e > 2.000 , *B. cepacia* 833,0 e 1.077,7, *C. albicans* 521,43 e 172,61 e *A. brasiliensis* 300,0 e 400. O efeito sinérgico da associação foi realizado através de um delineamento experimental centroide simplex para uma mistura de metilparabeno e propilparabeno e óleo essencial frente aos mesmos micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana. As concentrações obtidas em $\mu\text{g/mL}$ foram: 1120 para o metilparabeno, 350 para o propilparabeno e 675 para o óleo essencial. O óleo essencial de *C. scoparioides* apresentou um potencial antimicrobiano importante tanto sozinho como em associação com conservantes sintéticos. Estes resultados sugerem que esse óleo pode ser usado para compor um sistema conservante para formulações cosméticas contendo uma menor quantidade de sintéticos.

Palavras-chave: Conservantes. Óleos Essenciais. *Cono-bea scoparioides*. Atividade Antimicrobiana. Sinergia.

Chemical composition, antimicrobial activity of Cono-bea scoparioides essential oil and its association with synthetic preservatives for use in cosmetic formulations

Abstract: The present work aims to evaluate the chemical composition of the essential oil of *Cono-bea scoparioides* Cham. & Schltdl., its antimicrobial potential, and the effect of its association with parabens in cosmetic bases. The major oil compounds were thymol methyl ether (39.2%), thymol (33.8%) and α -phellandrene (15.9%). The antimicrobial activity of essential oil and thymol was accessed through the minimum inhibitory concentration (MIC), whose results in $\mu\text{g/mL}$ for essential oil and thymol were respectively: *S. aureus* 650,7 and 284,9, *E. coli* 721,5 and 271,2, *P. aeruginosa* 1748,0 and $>2,000$, *B. cepacia* 833,0 and 1.077,7, *C. albicans* 521,4 and 172,6, and *A. brasiliensis* 300,0 and 400,0. The synergistic effect of the association was carried out through a centroid simplex experimental design for a mixture of methylparaben, propylparaben, and essential oil against the same microorganisms previously used. The ideal concentrations obtained in $\mu\text{g/mL}$ were: 1120 for methylparaben, 350 for propylparaben and 675 for essential oil. The essential oil of *C. scoparioides* showed an important antimicrobial potential both alone and in association with synthetic

preservatives. These results suggest that this oil can be used to compose a preservative system for cosmetic formulations containing lower amounts of synthetic compounds.

Keywords: Preservatives. Essential Oils. *Conobea scoparioides*. Antimicrobial activity. Synergism

Introdução

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na demanda do mercado cosmético mundial por produtos naturais. O consumidor atual, tem se tornado cada vez mais criterioso, optando por produtos cada vez mais próximos da sua origem^{1,3}. Produtos cosméticos com componentes naturais apresentam grandes atrativos, por serem ecologicamente corretos, potencialmente mais saudáveis e voltados à responsabilidade social². Diante desse quadro, a indústria cosmética, está em busca de produtos que contenham substâncias naturais em suas formulações com propriedades fitocosméticas e/ou ação conservante, em substituição aos compostos sintéticos³.

Os conservantes apresentam dupla função numa formulação, a primeira de proteção do produto e a segunda de proteção ao consumidor. Porém de forma geral, são os componentes da formulação cosmética que podem causar alergia e dermatite de contato. Sendo assim, vem se tornando crescente a preocupação em relação à toxicidade de conservantes sintéticos, o que demonstra o interesse pela busca de produtos naturais para minimizar os efeitos tóxicos causados pelos sintéticos.

Os óleos essenciais em formulações cosméticas, além de sua função como fragrância, têm demonstrado ação inibitória no crescimento de vários patógenos tanto Gram-positivos quanto negativos⁴. Diante desse cenário vários estudos têm demonstrado a importância na utilização dos óleos essenciais no combate aos micro-organismos patogênicos devido a sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral como uma alternativa viável na preservação de produtos tanto na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética⁵.

Dentre os óleos essenciais podemos citar o óleo de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltl, popularmente conhecida como pataqueira. Esta é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica. Entre suas características mais marcantes, destacam-se os constituintes timol, éter metílico do timol e α -felandreno, presentes em seu óleo essencial, os quais possuem odores agradáveis⁶ e são de interesse para o mercado brasileiro de perfumes e cosméticos⁷. Uma outra característica importante são as propriedades antimicrobianas destes componentes.

Assim, a proposta deste estudo é avaliar o potencial antimicrobiano e o efeito sinérgico do óleo essencial de *C. scoparioides* com metil- e propilparabeno, um grupo de conservantes sintéticos.

Experimental

O óleo essencial de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltl, utilizado foi uma amostra comercial obtida da International Flavors & Fragrances (IFF) (Santana do Parnaíba, São Paulo), a qual é utilizada na indústria de cosmética.

Determinação dos perfis cromatográficos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

A identificação dos compostos foi realizada conforme o método anteriormente descrito⁸, através da comparação dos espectros de massas e índices de retenção calculados (determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos) com os espectros de massa encontrados na literatura e na biblioteca instalada no equipamento (Adams, NIST/Willey).

Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e seus compostos majoritários.

Neste trabalho foram utilizadas 6 cepas, 4 bacterianas e 2 fúngicas: *E. coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *B. cepacia* (ATCC 25416) *C. albicans* (ATCC 10231) e *A. brasiliensis* (ATCC 16404). O ensaio da atividade antimicrobiana, foi baseado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e para este foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μL ^{9,10,11}, já estabelecido no grupo¹², cuja leitura foi realizada através do leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®). Para *A. brasiliensis* o ensaio foi realizado através do método de microdiluição, porém a leitura da verificação da inibição foi feita visualmente, considerando presença ou ausência de crescimento.

Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação do óleo essencial com parabenos.

Para este experimento foi utilizado o planejamento experimental em rede simplex centroide com pontos adicionais de uma mistura de três componentes, composto por dez ensaios diferentes para determinação dos valores de todos os seus coeficientes representados na Tabela 1¹³. Para a realização do estudo das associações foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μL ^{9,10,11}. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos de superfície resposta e contorno. As variáveis selecionadas neste estudo foram as CIM's do metilparabeno e do propilparabeno pré-determinados¹⁴ juntamente com a do óleo essencial.

Tabela 1. Composições obtidas através do delineamento experimental de misturas

Composições	Metilparabeno	Propilparabeno	Óleo Essencial
Proporções dos componentes nas composições (%)			
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33	33	33
8	50	25	25
9	25	50	25
10	25	25	50

Resultados e Discussão

Após a análise de GC/MS, os principais componentes do óleo foram identificados como metil timol (39,2%) e timol (33,8%), a composição completa pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial das folhas de *Conocarpus scoparioides*.

Composto	TR ^a	IA ^b	%	Composto	TR ^a	IA ^b	%
3-octanona	11,913	993	1,9	timol metil éter	23,638	1242	39,2
alfa-felandreno	12,774	1012	15,9	timol	26,752	1311	33,8
p-cimeno	13,635	1030	4,5	alfa-trans-bergamoteno	34,523	1493	1,3
3-isopropenil-5,5-dimetil-ciclopenteno	14,689	1052	0,5	octacosano	69,036	2673	1,3
N.I.5: 93(100%), 91(54%), 77(38%), 136(36%), 79 (36%)	15,034	1060	0,9	Identificados	99,1		
linalol	17,218	1106	0,7	Não Identificados	0,9		

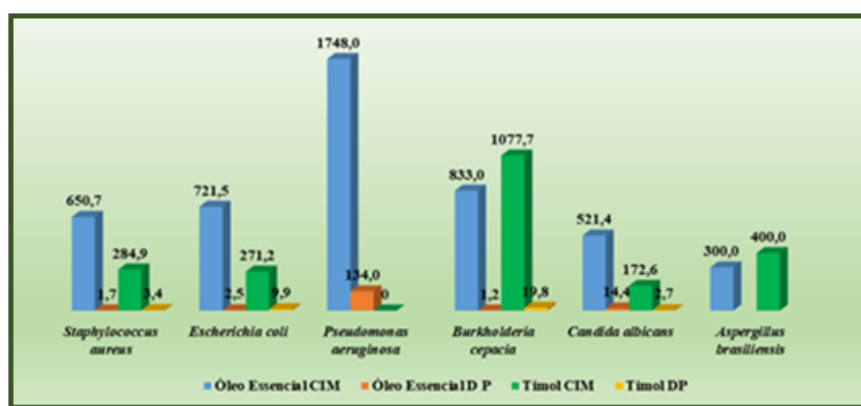
^a Tempo de retenção-coluna DB-5; ^b Índice de retenção-coluna DB-5; ^c Valores da literatura (ADAMS,2007; NIST); N.I.= não identificado.

Apesar das diferenças de composição química do óleo essencial de *C. scoparioides* encontradas na literatura, o timol sempre está entre os componentes majoritários. Assim, como vários estudos

demonstraram a ampla atividade antimicrobiana do timol¹⁵, podemos supor que esse óleo essencial poderá possuir um potencial antimicrobiano também.

As concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial variaram de 200,0 a 1748,0 µg/mL. Quanto ao timol a variação ocorreu de 172,6 à > 2000 µg/mL. Em relação às bactérias tanto para o óleo essencial quanto para o timol a mais resistente foi *P. aeruginosa*. Quanto aos fungos, *A. brasiliensis*, o bolor, foi mais sensível que a levedura *C. albicans* para o óleo essencial e mais resistente frente ao timol, conforme pode ser visto na figura 1.

Figura 1. Concentrações inibitórias mínimas determinadas para o óleo essencial de *C. scoparioides* contra *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.



A ação antimicrobiana tanto do óleo essencial quanto do timol se deve provavelmente à natureza hidrofóbica dos dois compostos a qual interfere na integridade da membrana desse micro-organismo. Um outro fator pode ser devido ao grupo hidroxila presente no timol que provoca o rompimento dos gradientes iônicos da célula bacteriana¹⁶. A concentração inibitória mínima muito elevada obtida para *P. aeruginosa* ocorreu, muito provavelmente, devido a sua capacidade de formação de biofilme, o que as tornam mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que quando encontradas em forma planctônica¹⁷. Um outro fator que leva a uma maior resistência de *P. aeruginosa*, que pode estar relacionado a membrana externa do gênero, por ser predominantemente impermeável aos compostos fenólicos do OE, devido a existência de mecanismos de bombas de efluxo e inibição junto a porina que protegem a bactéria contra a ação de óleos essenciais¹⁸.

As associações realizadas com o óleo essencial e parabenos observou-se que houve inibição do crescimento microbiano de 95 a 100% para bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas. Para a levedura *C. albicans*, observou-se uma inibição de aproximadamente 78%.

Através da análise estatística dos resultados das associações, foram calculadas as curvas contorno para a porcentagem de inibição y(x) das diferentes associações para cada micro-organismo em função das três variáveis (X_1 , X_2 , X_3) bem como sua representação em gráficos de calor. Estes resultados podem ser vistos na figura 2.

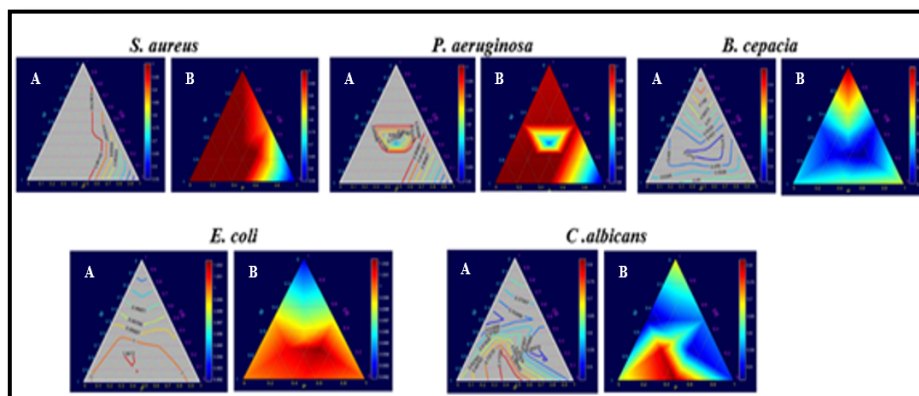
Com esses resultados podemos observar o efeito positivo da associação do óleo essencial com os parabenos, pois foi possível utilizar uma concentração abaixo da CIM de cada componente. Usando *S. aureus* como exemplo, isoladamente o metilparabeno apresenta um CIM 2000 µg/mL, porém na associação podemos ter sua inibição com 400 µg/mL, para o propilparabeno o valor obtido

na associação foi de 250 µg/mL enquanto sua CIM é de 500 µg/mL, já para o óleo essencial cuja a CIM é de 700µg/mL a inibição foi observada a partir de 560 µg/mL na mistura.

Conclusões

O óleo essencial de *C. scoparioides* apresentou o timol como um dos principais compostos que já foi testado como agente antimicrobiano. O potencial antimicrobiano do óleo essencial determinado contra contaminantes cosméticos sozinho e associado aos parabenos, indicou que esse pode ser um promissor candidato para compor uma mistura conservante, contendo um ingrediente natural, em formulações cosméticas.

Figura 2. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) das associações frente aos microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.



Agradecimentos

CAPES, International Flavors & Fragrances (IFF) e Natura Cosméticos S/A.

Referências

1. Miguel, L. M. Revista Geográfica de América Central **2011**, 1–15.
2. Flor, J. et al. Cosmetics & Toiletries **2019**, 30–36.
3. Packer; Luz, M. M. Brazilian Journal of Pharmacognosy **2007**, 102–107.
4. Barakat, H. British Journal of Applied Science & Technology **2014**, 1934–1951.
5. Santos, F.S.; Novales, M. G. Current Opinion in Biotechnology **2012**, 136–141.
6. Araújo, F.V. et al. Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química- 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia **2007**
7. Manual de Boas Práticas de Produção de Pataqueira, Natura Campus **2016**.
8. Moreno, P. R. et al. The Journal of Essential Oil Research **2009**,190-192.
9. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Sixth Edition; **2003**.
10. NCCLS. Method for Broth Dilution Tests to Determine the Antifungal Susceptibility of Filamentous Fungi; **2002**.
11. NCCLS. Method for Broth Dilution Tests to Determine the Antifungal Susceptibility of Yeasts, Second Edition; **2002**.
12. Moreno, P. R. et al. Current Topics in Medicinal Chemistry **2013**, 3040-3078.

13. Neto, B. D. et al. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, **2010**, 315-361.
14. Issa, F. Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae) **2015**.
15. Wang, Y.; Yam, K. L. Food Packaging and Shelf Life **2018** 92–96.
16. Sim, J. X. F. et al. Veterinary Dermatology **2019**, 524-530.
17. Drenkard, E. Microbes and Infection **2003**, 1213–1219.
18. Hossain, S. et al. Laboratory Animal Research **2017**,195.