



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FÁBIO CASSOLA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES
TÓPICAS EMPREGANDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O TRATAMENTO DA
DERMATITE SEBORREICA**

CAMPINAS

2023

FÁBIO CASSOLA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES
TÓPICAS EMPREGANDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O TRATAMENTO DA
DERMATITE SEBORREICA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte
Coorientadora: Dr^a Marili Villa Nova Rodrigues

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FÁBIO CASSOLA, ORIENTADO PELA DR^a MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE E COORIENTADO PELA DR^a MARILI VILLA NOVA RODRIGUES.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C274d Cassola, Fábio, 1992-
Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações tópicas empregando óleos essenciais para o tratamento da dermatite seborreica / Fábio Cassola. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Coorientador: Marili Villa Nova Rodrigues.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Antifúngicos. 2. Conservantes naturais. 3. Plantas medicinais. 4. Bioensaios. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira, 1960-. II. Rodrigues, Marili Villa Nova, 1965-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development and evaluation of the stability of topical formulations using essential oils for the treatment of seborrheic dermatitis

Palavras-chave em inglês:

Antifungal

Natural preservative

Medicinal plants

Bioassays

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Cibele Bonacorsi

Alessandra Gambero

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Paulo César Pires Rosa

Data de defesa: 27-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6117-6355>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1170053724329785>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Autor: Fábio Cassola

Orientadora: Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte

Coorientadora: Dr^a Marili Villa Nova Rodrigues

Tese aprovada em 27 de julho de 2023

Comissão Examinadora

Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte (Presidente)

Prof^a Dr^a Cibele Bonacorsi

Prof^a Dr^a Alessandra Gambero

Dr^a Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 27 de julho de 2023.

*Dedico esse trabalho (mais uma vez) aos meus pais João
(do pé de feijão) e Maria (um dom, uma certa magia) e a
todos os meus pequenos sonhadores que me ajudaram
direta ou indiretamente na construção deste sonho.*

Agradecimentos

Agradeço a Unicamp e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e por toda a sua equipe administrativa (especialmente ao Gustavo). Ao Instituto de Biologia (IB-Unicamp) durante o período de estadia no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos. Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-Unicamp) pela infraestrutura e por disponibilizar suas dependências para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (1806495; 88882.435476/2019-01). Agradeço ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX) pela concessão do auxílio financeiro (solicitação 2047/22).

À minha orientadora Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte por todos os ensinamentos, apoio e amizade. Obrigado por ser como uma mãe para mim durante esse período e até mesmo pelos puxões de orelha que foram dados quando necessário. Afinal de contas, é isso que as boas mães fazem.

À minha coorientadora Dr^a Marili Villa Nova Rodrigues pela colaboração no estudo, pelos ensinamentos e companheirismo. Por mais que a área de farmacotécnica não seja “a minha praia”, tudo ficou muito mais fácil na sua companhia.

À minha orientadora durante o mestrado Prof^a Dr^a Juliana Lischka Sampaio Mayer, por todo o apoio, parceria e ajuda proporcionada. Obrigado pela amizade ao longo desses anos “pós-mestrado” e por continuar me orientando indiretamente durante o período do doutorado. Meus sinceros agradecimentos também a todos do Laboratório de Anatomia Vegetal (IB-Unicamp) pela companhia e pelos prazerosos momentos.

À *mi hermanita* Nedy pela troca de experiência, pela ajuda constante no desenvolvimento das análises e por todos os bons momentos que tivemos juntos. Esse trabalho não teria sido concluído se não fosse todo o suporte que você me forneceu ao longo desses anos. Obrigado de todo o meu coração pela amizade, carinho e por estar sempre por perto quando eu mais precisava. *Por todos los altibajos que hemos pasado juntos, muchas gracias querida amiga, eres maravillosa!*

À minha adorável amiga Angela pela amizade, por todo auxílio durante a execução das análises no laboratório e pela alegria constante durante esse período de convívio. Você também foi parte fundamental para a conclusão deste trabalho e eu não podia ser mais grato por

ter alguém como você durante esses momentos. *Por siempre, muchas gracias por todo el amor, mi querida Yma Sumac!* 🎵

A Camila, técnica da Divisão de Microbiologia (CPQBA-Unicamp), pelo companheirismo, pelo suporte e auxílio técnico durante as análises e por todo conhecimento compartilhado a respeito da microbiologia.

Ao Zé pela amizade, por toda a ajuda durante as análises, pelas discussões enriquecedoras sobre os resultados obtidos e por sempre rir das minhas piadas ruins.

A todos os colaboradores que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Ao Benício (Divisão de Agrotecnologia, CPQBA-Unicamp) pela ajuda na extração dos óleos essenciais, a Dra. Alessandra Gambero (Centro de Ciências da Vida, PUC-Campinas) pelas análises de viabilidade celular, a Profª Drª Flávia Nogueira e ao Lucas (Laboratório de Mutagênese e Toxicidade, UNIARA-Araraquara) pelas análises de mutagênicidade (em pleno período de pandemia), ao Guilherme (*a.k.a.* Brotinho) (Laboratório de Imunometabolismo, IB-Unicamp) pelas análises da atividade anti-inflamatória dos óleos, a Érica (Laboratório de Farmacotécnica e Cuidado em Saúde, FCF-Unicamp) pelo auxílio nas análises de viscosidade do xampu e ao Dr. Rodney Rodrigues (Divisão de Química de Produtos Naturais, CPQBA-Unicamp) por disponibilizar o uso da câmara climática para o estudo de estabilidade acelerada das formulações. Muito obrigado a vocês pela ajuda e por toda a contribuição prestada.

À equipe do Departamento de Química Orgânica e Farmacêutica (CPQBA-Unicamp), pelo constante aprendizado, pela troca de experiência, por todo o suporte e pela amizade. Ao Sinésio pelas inúmeras caronas, ao Adilson por toda a ajuda nas análises cromatográficas, a Gaby pelo apoio e por toda a diversão que tivemos juntos e a Adriana por sempre me socorrer no dia-a-dia no laboratório, por ser uma profissional incrível e uma pessoa magnífica.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME-Unicamp), em especial a Denise e ao Breno, pelo uso dos equipamentos e por toda a assistência prestada durante as análises por MEV.

Aos professores e pesquisadores que colaboraram durante o processo de qualificação e de defesa. Destaco aqui o meu eterno agradecimento a Drª Ana Lúcia Ruiz, a minha “guru” como eu costumo chama-la, pelo acompanhamento durante a minha vida na pós-graduação, desde a qualificação do mestrado até a defesa do doutorado. Muitíssimo obrigado por todas as dicas, pelas explicações, por todo material disponibilizado e por ser uma pesquisadora e uma pessoa tão fantástica. Eu vou ser para sempre seu fã!

Aos docentes do departamento de Biologia Vegetal pela amizade, pelo aprendizado sobre botânica e por todo o carinho ao longo desses anos. Gostaria de agradecer em especial as professoras Dr^a Maria do Carmo Estanislau do Amaral (minha 2^a Maria do Carmo preferida) e a Dr^a Maria Fernanda Calió por todas as explicações e ensinamentos a respeito de sistemática de angiospermas. Vocês são docentes excepcionais que eu sempre vou ter como exemplo. Obrigado por me mostrarem que nem todas as plantas são Poaceae! *risos*

Aos grandes amigos que fiz no departamento de Biologia Vegetal por todos os momentos maravilhosos e divertidos que tivemos juntos. Faltam-me palavras para agradecer o quão fundamental foi a presença de cada um de vocês durante o meu período na pós-graduação. Por todas as discussões enriquecedoras, por todas as manifestações políticas, por todas as celebrações com todos os bolinhos na copa, por me mostrarem que eu posso ser amado, respeitado e acima de tudo por me permitir ser quem eu realmente sou, do fundo do meu coração, muito obrigado. Eu sou extremamente grato por ter conhecido e convivido com cada um de vocês!

A Gleicyanne (*Emma*), ao Rhaniel (*Mel C*), a Mariana (*Victoria*) e ao Edimar (*Gerî*), meus queridos amigos que eu tive o privilégio de conhecer e conviver durante o meu mestrado e que, com toda certeza, eu vou levar para sempre no meu coração. Vocês puderam acompanhar de camarote a cada *hit* de sucesso bem como todos os *flops* dessa carreira. Muito obrigado por todos os momentos que tivemos juntos! Ter a amizade de cada um de vocês é, sem sombra de dúvidas, o maior presente que eu ganhei na pós-graduação! Eu amo vocês incondicionalmente! *SPICE GIRLS FOREVER!!!* ♡

Ao Gustavo (*a.k.a.* Shimizu) por todo o auxílio na revisão dos nomes científicos das espécies. Obrigado por ser o amigo/fotógrafo particular responsável por registrar todos os momentos que eu tive durante a pós-graduação ao lado dessas pessoas incríveis. *Anata wa subarashî desu!*

Ao Diego, um dos mais queridos fãs da Lady Gaga que eu conheço, pela ajuda na confecção das pranchas deste estudo. Obrigado pela companhia, pelas bobagens ditas, pelo humor constante e por mostrar ao mundo o real significado de “*A Star Is Born*”.

A Giovanna, minha “irmã de tatuagem”, pelo companheirismo, carinho, autenticidade e amizade. Mais uma vez, muito obrigado pelas inúmeras risadas com seus incríveis comentários e, obviamente, pela companhia no ônibus em todas as turnês.

Ao Eric e ao Paulo pela amizade e pelo auxílio na elaboração e revisão do *abstract/résumé*. *Thanks a lot for the help, vous êtes merveilleux.*

Ao Guilherme (*a.k.a.* Guigo) por idealizar algumas das imagens deste estudo e também pela amizade ao longo desses anos.

Ao “meu clipe dourado” pelos momentos de felicidade proporcionados durante esse meio tempo e por ser o responsável por juntar todas as páginas da minha vida. *“Finalmente eu encontrei alguém que poderia ser a pessoa certa. Mas, eu prometi a mim mesmo que não cederia ao amor. E eu estou assustado e nervoso, não quero me machucar de novo, isso é ruim. Porque eu sei que você é a pessoa certa...”*

Aos meus pais João e Maria (aqueles dos contos de fadas), ao meu irmão Felipe, aos meus avós Milton e Judite, as pessoas mais magníficas de todo esse mundo e também aos demais familiares por toda a compreensão, amor, dedicação, confiança e incentivo incondicional. Ao meu avô Olívio, à minha avó Maria, à minha tia Amélia e a querida Mercedes (*in memoriam*) pelas extraordinárias pessoas que foram em vida terrena e que, com toda certeza, torceriam pelo meu sucesso.

A todos os meus amigos, tanto os próximos como os distantes e a todas as outras pessoas que não foram mencionadas, mas que colaboraram de alguma forma para a realização deste sonho, os meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado, mais uma vez, por estarem ao meu lado, por me verem crescer e por deixarem que os outros soubessem que vocês acreditam no que eu ainda serei.

“Se você se sentir insignificante, é melhor você pensar novamente, é melhor acordar, porque você é parte de algo muito maior. Você é parte de algo muito maior. Não apenas uma partícula no universo, não apenas algumas palavras em um versículo da bíblia, você é a palavra viva. Ah, você é parte de algo muito maior. Maior que você, maior que nós, maior que a imagem que eles nos moldaram para ver, mas agora nós vemos isso e não é segredo.”

Beyoncé – BIGGER

“Eu decidi há muito tempo a não caminhar à sombra de ninguém. Se eu fracassei, se eu fui bem-sucedido, pelo menos eu vivi como acreditava. Não importa o que eles tirem de mim, eles não podem tirar a minha dignidade. Porque o maior amor de todos está acontecendo em mim. Eu encontrei o maior amor de todos dentro de mim. O maior amor de todos, é fácil de alcançar. Aprendendo a amar a si mesmo, esse é o maior amor de todos. [...] E se, por um acaso, aquele lugar especial que você tem sonhado conduz você a um lugar solitário, procure sua força no amor.”

Whitney Houston – Greatest love of all

“A realidade é que eu não estaria aqui sem o amor sobre o qual eu me apoio. A todo momento que eu me perco no mundo, vocês sempre estarão lá para se importar e compartilhar. Na alegria e na tristeza, nosso amor não mudará. O que eu compartilho com vocês, para sempre sagrado, durará eternamente. O maior amor de todos. Eu amo vocês... E ele é puro e resistirá. O mundo não pode quebrar a nossa conexão porque o nosso amor é divino e ele inquebrável!”

Janet Jackson – Unbreakable

Resumo

A dermatite seborreica é uma doença crônica comum do tecido cutâneo, caracterizada por reação descamativa e inflamatória em regiões tipicamente colonizadas pela levedura *Malassezia furfur*. Ainda não existe um tratamento definitivo para esta doença, pois as opções terapêuticas disponíveis atualmente objetivam a diminuição dos sintomas. O uso de óleos essenciais (OEs) pode ser uma alternativa natural de tratamento, visto que estes apresentam diversas propriedades biológicas e medicinais. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade antifúngica de OEs e antifúngicos tradicionais frente a *M. furfur* e desenvolver formulações tópicas para o tratamento da dermatite seborreica. A suscetibilidade da levedura aos OEs foi avaliada pelo método da microdiluição. A partir dos resultados de concentração inibitória mínima obtidos (CIM entre 0,5–2,0 mg/mL), foram selecionados os OEs de *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson, *Mentha × piperita* L. e *Varronia curassavica* Jacq. (devido a sua propriedade anti-inflamatória) para compor uma blenda (BOEs), que foi avaliada quanto ao possível sinergismo frente a *M. furfur*. De acordo com os resultados, a BOEs promoveu efeito sinérgico e apresentou atividade fungicida contra a forma planctônica (CIM = 2,0 mg/mL) e de biofilme (inibição $\cong 80\%$; erradicação $\cong 30\%$) da levedura. Quando antimicrobianos sintéticos como anfotericina B, cloranfenicol, cetoconazol, fluconazol e nistatina foram avaliados frente ao biofilme de *M. furfur*, os resultados obtidos mostraram que a porcentagem de inibição/erradicação foi maior para o cloranfenicol ($\cong 84\%/50\%$), seguido de cetoconazol ($\cong 83\%/49\%$), nistatina ($\cong 60\%/48\%$) e anfotericina B ($\cong 13\%$). A anfotericina B não teve efeito na erradicação do biofilme, enquanto o fluconazol não causou mudanças significativas na inibição ou na erradicação do biofilme de *M. furfur*. Além da propriedade antifúngica, a BOEs apresentou atividade anti-inflamatória frente ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; ELISA) em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) e não induziu à mutagenicidade nem afetou a viabilidade celular das linhagens HaCaT e BMDMs. Em seguida, foram desenvolvidos um gel, uma loção e um xampu com incorporação da BOEs. Durante o estudo preliminar de estabilidade, a loção apresentou separação de fases, não sendo avaliada quanto à estabilidade acelerada. Para o gel, os parâmetros avaliados permaneceram inalterados durante todo o estudo de estabilidade acelerada. Para o xampu, os resultados foram semelhantes, contudo houve visualmente um leve escurecimento da amostra acondicionada em câmara climática após 90 dias. A viscosidade do xampu variou de 1000 a 3800 cP, ficando um pouco abaixo dos valores referentes a produtos comerciais. Quanto aos marcadores da BOEs, o geraniol, o mentol e o *trans*-Cariofileno se mantiveram presentes e sem variações durante todo o estudo, em ambas as formulações. Finalmente, o *Challenge test* demonstrou que a BOEs conferiu propriedades conservantes ao gel e ao xampu, uma vez que foi ativa contra os micro-organismos de importância em sistemas conservantes de formulações avaliados. Assim, o presente estudo mostrou que a BOEs foi eficaz contra *M. furfur*, principal agente etiológico da dermatite seborreica, agindo também como conservante nas formulações desenvolvidas, e que mesmo sem a adição de conservantes sintéticos estas se apresentaram estáveis durante o tempo de estudo.

Palavras-chave: *Malassezia furfur*. Antifúngico natural. Conservante natural. Plantas medicinais e aromáticas. Bioensaios.

Abstract

Seborrheic dermatitis is a common chronic disease of the skin tissue, characterized by a scaly and inflammatory reaction in regions typically colonized by the yeast *Malassezia furfur*. There is still no definitive treatment for this disease, as the currently available therapeutic options aim to reduce symptoms. The use of essential oils (EOs) can be a natural alternative treatment since they have different biological and medicinal properties. Thus, the objective of the present work was to verify the antifungal activity of EOs and traditional antifungals against *M. furfur* and to develop topical formulations for the treatment of seborrheic dermatitis. Yeast susceptibility to EOs was evaluated by the microdilution method. Based on the minimum inhibitory concentration results obtained (MIC between 0.5–2.0 mg/mL), EOs from *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson, *Mentha × piperita* L. e *Varronia curassavica* Jacq. (due to its anti-inflammatory property) were selected to compose a blend (BEOs), which was evaluated for possible synergism against *M. furfur*. The results showed that BEOs promoted a synergistic effect and fungicidal activity against the planktonic (MIC = 2.0 mg/mL) and biofilm form (inhibition $\cong$ 80%; eradication $\cong$ 30%) of the yeast. When synthetic antimicrobials such as amphotericin B, chloramphenicol, ketoconazole, fluconazole, and nystatin were evaluated against the *M. furfur* biofilm, the results obtained showed that the percentage of inhibition/eradication was higher for chloramphenicol ($\cong$ 84%/50%), followed by ketoconazole ($\cong$ 83%/49%), nystatin ($\cong$ 60%/48%) and amphotericin B ($\cong$ 13%). Amphotericin B did not affect biofilm eradication, while fluconazole did not cause significant changes in *M. furfur* biofilm inhibition or eradication. In addition to the antifungal property, BEOs showed anti-inflammatory activity against tumor necrosis factor alpha (TNF- α ; ELISA) in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and did not induce mutagenicity or affect the cell viability of HaCaT and BMDMs strains. Then, a gel, a lotion, and a shampoo incorporating BEOs were developed. The lotion showed phase separation during the preliminary stability study and was not evaluated for accelerated stability. For the gel, the evaluated parameters remained unchanged throughout the study of accelerated stability. For the shampoo, the results were similar, however, there was visually a slight darkening of the sample stored in the climatic chamber after 90 days. The viscosity of the shampoo ranged from 1000 to 3800 cP, slightly below the values for commercial products. As for the BEOs markers, geraniol, menthol, and *trans*-Caryophyllene remained present, without variations throughout the study, in both formulations. Finally, the Challenge test demonstrated that BEOs conferred preservative properties to the gel and shampoo since it was active against microorganisms of importance in preservative systems of evaluated formulations. Thus, the present study showed that BEOs were effective against *M. furfur*, the main etiological agent of seborrheic dermatitis, also acting as a preservative in the developed formulations, and that even without the addition of synthetic preservatives, these were stable during the study period.

Keywords: *Malassezia furfur*. Natural antifungal. Natural preservative. Medicinal and aromatic plants. Bioassays.

Resumé

La dermatite séborrhéique est une maladie chronique fréquente des tissus cutanés, caractérisée par des réactions desquamantes et inflammatoires dans des régions généralement colonisées par la levure *Malassezia furfur*. Il n'existe pas encore de traitement définitif pour cette maladie, car les options thérapeutiques actuellement disponibles visent à réduire les symptômes. L'utilisation d'huiles essentielles (HE) peut constituer une alternative de traitement naturel, car elles possèdent de nombreuses propriétés biologiques et médicinales. Ainsi, l'objectif de cette étude était de vérifier l'activité antifongique des HE et antifongiques traditionnels contre *M. furfur* et de développer des formulations topiques pour le traitement de la dermatite séborrhéique. La sensibilité de la levure aux HE a été évaluée par la méthode de microdilution. Sur la base des résultats de la concentration minimale inhibitrice obtenue (CMI entre 0,5 et 2,0 mg/mL), les HE de *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson, *Mentha × piperita* L. et *Varronia curassavica* Jacq. (en raison de ses propriétés anti-inflammatoires) ont été sélectionnées pour former un mélange (MHEs), qui a été évalué pour son éventuel effet synergique contre *M. furfur*. Selon les résultats, la MHEs a présenté un effet synergique et a montré une activité fongicide contre la forme planctonique (CMI = 2,0 mg/mL) et le biofilm (inhibition $\cong 80\%$; éradication $\cong 30\%$) de la levure. Lorsque des agents antimicrobiens synthétiques tels que l'amphotéricine B, le chloramphénicol, le kétoconazole, le fluconazole et la nystatine ont été évalués contre le biofilm de *M. furfur*, les résultats obtenus ont montré que le chloramphénicol avait le pourcentage d'inhibition/éradication le plus élevé ($\cong 84\%/50\%$), suivi du kétoconazole ($\cong 83\%/49\%$), de la nystatine ($\cong 60\%/48\%$) et de l'amphotéricine B ($\cong 13\%$). L'amphotéricine B n'a eu aucun effet sur l'éradication du biofilm, tandis que le fluconazole n'a pas entraîné de changements significatifs dans l'inhibition ou l'éradication du biofilm de *M. furfur*. En plus de son activité antifongique, la MHEs a présenté une activité anti-inflammatoire vis-à-vis du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α ; ELISA) dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs) et n'a pas induit de mutagénicité ni affecté la viabilité cellulaire des lignées HaCaT et L929. Ensuite, un gel, une lotion et un shampooing ont été développés en incorporant la MHEs. Lors de l'étude préliminaire de stabilité, la lotion a présenté une séparation de phases et n'a pas été évaluée en termes de stabilité accélérée. Pour le gel, les paramètres évalués sont restés inchangés pendant tout au long de l'étude de stabilité accélérée. Pour le shampooing, les résultats étaient similaires, cependant il y a eu visuellement une légère coloration plus sombre de l'échantillon stocké en chambre climatique après 90 jours. La viscosité du shampooing variait de 1000 à 3800 cP, légèrement inférieure aux valeurs des produits commerciaux. En ce qui concerne les marqueurs de la MHEs, le géraniol, le menthol et le *trans*-Carophyllène sont restés présents et stables tout au long de l'étude, dans les deux formulations. Enfin, le *Challenge test* a démontré que la MHEs a conféré des propriétés conservatrices au gel et au shampooing, car elle était active contre les micro-organismes importants dans les systèmes conservateurs des formulations évaluées. Ainsi, cette étude a montré que la MHEs était efficace contre *M. furfur*, principal agent étiologique de la dermatite séborrhéique, agissant également comme conservateur dans les formulations développées, et que même sans l'ajout de conservateurs synthétiques, elles se sont révélées stables pendant la durée de l'étude.

Mots-clés: *Malassezia furfur*. Antifongique naturel. Conservateur naturel. Plantes médicinales et aromatiques. Essais biologiques.

Sumário

Introdução geral	15
Dermatite seborreica	15
Biofilmes e distúrbios cutâneos	16
Formas de tratamento	18
Plantas medicinais e atividade antifúngica dos óleos essenciais	20
Modelo de estudo	21
Objetivo	22
 Capítulo 1: Sinergismo entre óleos essenciais e avaliação das suas atividades com enfoque no controle de <i>Malassezia furfur</i>	23
Resumo	23
Introdução	24
Material e Métodos	25
Resultados e Discussão	36
Conclusões	49
 Capítulo 2: Formulações tópicas contendo óleos essenciais: uma alternativa “verde” para o tratamento da dermatite seborreica	51
Resumo	51
Introdução	52
Material e Métodos	53
Resultados e Discussão	59
Conclusões	73
 Capítulo 3: Determinação <i>in vitro</i> da susceptibilidade do biofilme de <i>Malassezia furfur</i> a diferentes antimicrobianos de uso comercial	74
Resumo	74
Introdução	75
Material e Métodos	76
Resultados e Discussão	78
Conclusões	84
 Considerações finais	85
 Referências bibliográficas	87
 Apêndice A	107
Apêndice B	108
Apêndice C	121
Apêndice D	122
Apêndice E	126
Anexo	127

Introdução geral

Dermatite seborreica

A dermatite seborreica é uma doença inflamatória crônica comum do tecido cutâneo (SAMPAIO et al., 2011). Apresenta origem multifatorial, envolvendo diversos fatores como as alterações hormonais, alterações da microbiota da pele, estados de imunodepressão e doenças neurológicas (doença de Parkinson), psiquiátricas (depressão) e genéticas (síndrome de Down) (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013). As lesões apresentam aspecto vermelho, liso e vítreo (CHEONG et al., 2016) e ocorrem em regiões com grande quantidade de glândulas sebáceas como no couro cabeludo, rosto (dobras nasolabiais, orelhas e sobrancelhas) e tronco (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013; JOHNSON; NUNLEY, 2000). Não possui predileção racial (SAMPAIO et al., 2011) nem transmissão horizontal da patologia (MIMOUNI et al., 1995).

A sua prevalência gira em torno de 1 a 5% dos adultos (CHEONG et al., 2016) entre 30 e 60 anos de idade (SAMPAIO et al., 2011) podendo acometer também os recém-nascidos (até o terceiro mês de vida) (RAMOS-E-SILVA; SAMPAIO; CARNEIRO, 2014). No couro cabeludo dos recém-nascidos, observa-se frequentemente a presença de uma camada seborreica amarela, às vezes com eritema de fundo. Essa condição é habitualmente chamada de “capuz de berço” (BARRETT; LUU, 2017). Em indivíduos imunodeprimidos, como pacientes com órgãos transplantados, infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou pelo vírus da hepatite C, alcoólatras crônicos com pancreatite, entre outros, a incidência da doença fica em torno de 1 a 3%, com maior incidência no sexo masculino (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013).

A reação descamativa e inflamatória, característica comum da dermatite seborreica, ocorre em áreas oleosas tipicamente colonizadas por *Malassezia* (Cryptococcaceae) (DATNER, 2017). O gênero *Malassezia* está presente naturalmente na microbiota da pele do ser humano e é conhecido por apresentar, em sua maioria, leveduras lipofílicas (TRIANA et al., 2015). Das 17 espécies presentes no gênero, 10 habitam a pele humana (SPARBER et al., 2019) e dessas *Malassezia furfur* e *Malassezia globosa* são consideradas, por alguns autores, como os agentes etiológicos da dermatite seborreica (GALVIS-MARÍN et al., 2017; NAKABAYASHI; SEI; GUILLOT, 2000). Entretanto, ainda é incerto se essas espécies causam a doença agindo isoladamente ou em conjunto com outras espécies de micro-organismos pertencentes ou não ao gênero *Malassezia* (GRICE; DAWSON, 2017). Outros autores propuseram a hipótese de que *Malassezia* spp. não conseguem desencadear a doença por si só,

mas que os sintomas são produzidos em associação com a predisposição genética e as condições do hospedeiro em relação à pele (atividade das glândulas sebáceas, integridade da barreira epidérmica), ao sistema imunológico e também à sua nutrição (WIKRAMANAYAKE et al., 2019). Em decorrência da presença desses fatores predisponentes, as leveduras se multiplicam e transformam-se na sua forma parasitária de pseudo-hifa (FRAMIL et al., 2010). O metabolismo de *Malassezia* spp. induzem a alteração da composição da secreção das glândulas sebáceas (RO; DAWSON, 2005) uma vez que essas espécies não sintetizam lipídios (GRICE; DAWSON, 2017). As leveduras produzem lipases que consomem os ácidos graxos saturados, liberando ácido oleico e ácido araquidônico (ácidos graxos insaturados). Ambos os ácidos graxos insaturados têm ação irritante e descamativa sobre os queratinócitos, gerando o processo inflamatório (MOKOS et al., 2012).

Biofilmes e distúrbios cutâneos

De forma simplificada, biofilme pode ser definido como um conjunto de células microbianas organizadas de maneira tridimensional envolta por uma matriz polimérica extracelular constituída por polissacáridos, proteínas e ácidos nucleicos (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Essa estrutura pode ser formada unicamente por uma espécie bacteriana ou fúngica (biofilme mono-espécie) ou pela associação de dois tipos de micro-organismo (biofilme misto) (COSTA et al., 2019). Os biofilmes são alvo de estudo em diferentes setores como na área da saúde, na indústria de alimentos e no tratamento de resíduos, entre outros (LU; HU; REN, 2022).

Na terapia clínica, os biofilmes são a causa de várias doenças incluindo as associadas à pele como, por exemplo, a dermatite tópica (VYAS et al., 2021). As infecções cutâneas ocorrem pela presença de micro-organismos tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme sendo essa última responsável por mais de 80% das infecções microbianas do corpo humano (SCALISE et al., 2015). Em situações em que a pele está danificada e apresenta ferimentos, a ocorrência do biofilme pode intensificar o quadro da doença. As feridas fornecem condições que facilitam a formação do biofilme devido a facilidade dos micro-organismos se aderirem aos detritos da ferida e por conta da deficiência na resposta imunológica do hospedeiro (RAZDAN et al., 2022). No gênero *Malassezia*, há relatos de espécies que promoveram a formação de biofilme em dermatite seborreica canina (BUMROONGTHAI et al., 2016; FIGUEREDO et al., 2012) e humana (acompanhada de foliculite) (MARCON; POWELL, 1987) e em cateteres endovenosos (ZAREEI et al., 2018).

O processo de transição da forma planctônica para o biofilme ocorre devido à presença de diferentes fatores ambientais e fisiológicos (VLASSOVA et al., 2011) e pode ser dividida em: (1) adesão inicial das células à superfície biótica ou abiótica. A adesão microbiana a uma superfície abiótica é mediada por interações inespecíficas (hidrofobicidade, carga superficial, tensão superficial), enquanto que a adesão biótica ocorre por mecanismos moleculares específicos de ancoragem (interações entre as adesinas dos micro-organismos com as moléculas de adesão celular das células animais como integrinas, caderinas, imunoglobulinas e selectinas). (2) Formação de micro e macro colônias que se desenvolvem e (3) começam a produzir uma matriz polimérica extracelular, formando biofilmes maduros. A matriz polimérica permite que as células fiquem unidas e as protegem da ação de antibióticos, radiação ultravioleta, oxidação, secagem, etc. o que permite a sobrevivência do biofilme. (4) O biofilme começa a expandir provocando o (5) desprendimento das células que se dispersam para colonização de outras superfícies recomeçando, dessa forma, o ciclo (Figura 1) (AZEREDO; HENRIQUES; NOVELLO, 2012; CAO et al., 2019).

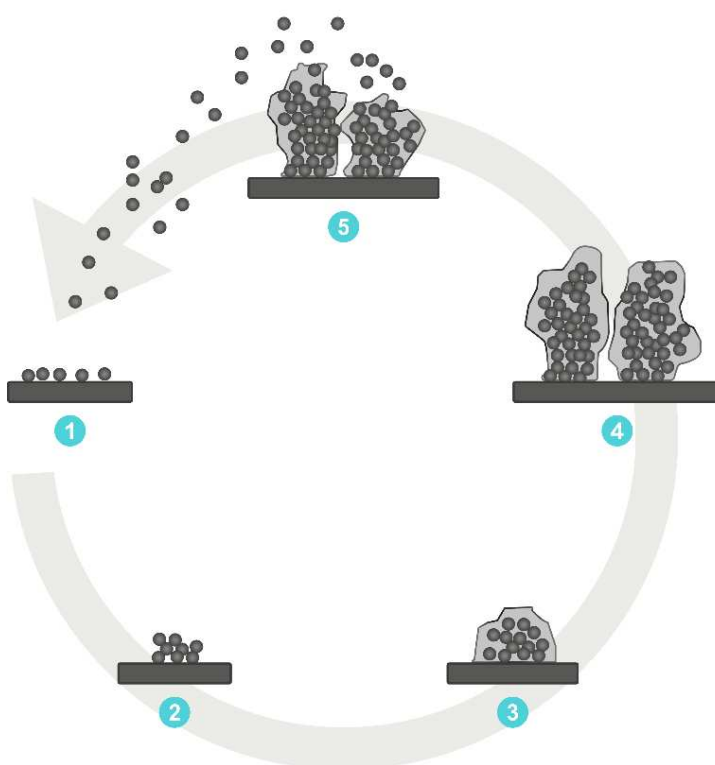


Figura 1. As etapas do desenvolvimento do biofilme: (1) adesão inicial das células planctônicas em uma superfície abiótica ou biótica (adesão reversível); (2) formação de pequenas colônias; (3) desenvolvimento do biofilme com produção da matriz polimérica extracelular (adesão irreversível); (4) maturação e por fim (5) dispersão das células. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Esse arranjo multicelular confere um sistema complexo que permite a formação de uma barreira física de difícil remoção e a sinalização intercelular, que regula o desenvolvimento e o metabolismo microbiano (FANG; PARK; HONG, 2020). Além disso, devido as constantes mutações e às trocas de material genético entre os micro-organismos (SUBRAMANIAN et al., 2020), essa estrutura apresenta mecanismos de alta resistência contra o sistema imunológico e aos antimicrobianos tornando-se um grave problema de saúde (CAO et al., 2019). A viscoelasticidade do biofilme também é um fator que contribui para a sua sobrevivência e disseminação da doença (GLOAG et al., 2020).

Formas de tratamento

Ainda não existe um tratamento definitivo para a dermatite seborreica. As opções terapêuticas disponíveis objetivam a diminuição dos sintomas e a indução de novos quadros de remissão da doença (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013). Todavia, práticas simples como a limpeza diária da pele e o uso de emolientes são benéficos durante o tratamento (STEFANAKI; KATSAMBAS, 2010).

Os medicamentos mais utilizados incluem corticosteroides, antifúngicos e queratolíticos. Também são empregados anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), hidratantes, imunossuppressores (inibidores tópicos da calcineurina) e anti-histamínicos sistêmicos (PEYRÍ; LLEONART, 2007). O uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana comprovada (GUIL-GUERRERO et al., 2016; GYAWALI; IBRAHIM, 2014) também é uma alternativa ao tratamento com medicamentos sintéticos tradicionais (BEDI; SHENEFELT, 2002; DATNER, 2017). De acordo com a literatura, os estudos realizados com formulações tópicas fitoterápicas para o tratamento da dermatite seborreica incluem o desenvolvimento de tônico (CHAIKRIPAT; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2015), loção (KHOSRAVI et al., 2009), xampu (SHREYA; KALPANA, 2018; WUTHI-UDOMLERT et al., 2011) e condicionador (LERTSATITTHANAKORN et al., 2017). As formulações foram produzidas com o extrato ou com o óleo essencial das plantas sendo as espécies do gênero *Cymbopogon* Spreng. as mais utilizadas nesses estudos.

Como geralmente a dermatite seborreica ocorre no couro cabeludo, as opções de veículos utilizados para incorporação dos princípios ativos são geralmente na forma de xampus, cremes, pomadas ou loções (STEFANAKI; KATSAMBAS, 2010). Os xampus tem a função de limpar principalmente o couro cabeludo e secundariamente o cabelo (DRAELOS, 2013) e podem ser classificados como antifúngicos, antiproliferativos (diminuem a formação das escamas), ceratolíticos (removem as escamas aderentes) e anti-inflamatórios (GOLDENBERG,

2013). Já os géis são bases amplamente utilizadas em produtos farmacêuticos devido a facilidade de manipulação e por apresentarem características que permitem a incorporação de princípios ativos com características que variam de hidrossolúveis até lipossolúveis (MELO; DOMINGUES; LIMA, 2018). Diversos medicamentos são relatados na literatura como efetivos no tratamento da dermatite seborreica (Tabela 1). A combinação das terapias ou dos princípios ativos em um mesmo produto auxilia numa maior eficácia durante o tratamento, além de reduzir a recidiva da doença (SAMPAIO et al., 2011).

Tabela 1. Principais componentes utilizados em formulações de xampus e géis para o tratamento da dermatite seborreica de acordo com os dados encontrados na literatura.

Agentes antifúngicos	▪ Cetoconazol 2% ^{[A]*} ▪ Metronidazol 1% ▪ Naftifina 1–2% ▪ Piroctona olamina** ▪ Bifonazol 1% ▪ Ciclopirox olamina 1%–1,5% ^{[B][C]} ▪ Fluconazol 2% ▪ Climbazol 0,65%
Agentes antiproliferativos	▪ Piritionato de zinco 1%–2% ^[C] ▪ Sulfeto de selênio 1%–2,5% ▪ Alcatrão de hulha (coaltar) 1%–2% ^[D]
Agentes anti-inflamatórios	▪ Propionato de clobetasol 0,05% ^[A] ▪ Fluocinonida 0,01% ▪ Acetonido de fluocinolona 0,01% ▪ Pimecrolimus 1% ▪ Tacrolimus 0,03%–0,1%
Agentes ceratolíticos	▪ Ácido lipo-hidróxido 0,1% ^[E] ▪ Ácido salicílico 2%–5 % ^{[B][D][E]} ▪ Ácido retinóico 0,01%–0,025% ▪ Ureia 5%–10% ▪ Enxofre 2%–5%

Letras iguais indicam a possibilidade de combinação dos componentes em uma mesma formulação

*Componente citado na maioria das formulações de acordo com os artigos selecionados

**A concentração não foi informada pelos autores

(Fonte: CHEONG et al., 2016; DATTNER, 2017; DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013; FORMARIZ et al., 2005; GOLD et al., 2011; GOLDENBERG, 2013; MICALI et al., 2021; MOKOS et al., 2012; SAMPAIO et al., 2011; STEFANAKI; KATSAMBAS, 2010; WIGGER-ALBERTI; KLUGE; ELSNER, 2001; YOUNG; BRODELL; COOPER, 2015).

Um estudo relatou que a terapia combinada com xampu de propionato de clobetasol (0,05%) duas vezes por semana, alternando com xampu de cetoconazol (2%) duas vezes por semana, durante quatro semanas, foi mais eficaz do que o uso do xampu de cetoconazol individualmente (ORTONNE et al., 2011). A eficácia do uso tópico de cetoconazol foi equivalente ao administrado por via oral, com a vantagem de não causar hepatotoxicidade

(GREEN; FARR; SHUSTER, 1987). Isso provavelmente ocorreu devido a sua ação estritamente local (DUQUE et al., 2013). Entretanto, em situações de disfunção hepática é recomendado a substituição do cetoconazol por miconazol ou clotrimazol (PATEL; SCHWARTZ; LAMBERT, 2017). Em outro estudo, a combinação terapêutica do uso de xampu e gel de lactamida MEA (agente hidratante) gerou uma maior diminuição nas lesões capilares quando comparado ao uso isolado do xampu (VICTOIRE et al., 2019).

Plantas medicinais e atividade antifúngica dos óleos essenciais

Entende-se como planta medicinal toda a espécie vegetal, cultivada ou não, que é utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014). Essas espécies podem ser facilmente encontradas em quintais residenciais e são amplamente comercializadas em mercados e feiras (ZANK; ÁVILA; HANAZAKI, 2016), revelando seu valor econômico que desperta interesse popular e estimula a constante busca por novas substâncias terapêuticas (GARCEZ et al., 2016).

Os óleos essenciais (OEs) são caracterizados quimicamente como misturas complexas e voláteis que são extraídos das partes ou da planta como um todo (EDRIS, 2007). Essas moléculas são classificadas de acordo com a sua concentração na mistura, sendo os constituintes majoritários de 20 a 95%, os constituintes secundários de 1 a 20% e os componentes traços abaixo de 1% (HEINZMANN; SPITZER; SANTOS, 2017). Os OEs apresentam em sua grande maioria terpenos e seus derivados, moléculas que são produzidas a partir do metabolismo secundário das plantas (SINGH; SHARMA, 2015).

Os fungos filamentosos e leveduras constituem um importante alvo de tratamento, uma vez que esses micro-organismos fazem parte do grupo de patógenos comumente associados a infecções graves em animais e humanos (principalmente os imunossuprimidos) (BAUMGARDNER, 2017; KOHLER; CASADEVALL; PERFECT, 2015). As infecções causadas por estes patógenos estão se disseminando mais rápido e, por sua vez, tornando-se crônicas dada a capacidade destes micro-organismos desenvolverem resistência frente aos tratamentos convencionais com antimicrobianos sintéticos (BLAIR et al., 2015). Infecções humanas, principalmente as que ocorrem na pele e nas mucosas, constituem um sério problema especialmente em países tropicais sendo os fungos dermatófitos e as leveduras os patógenos mais frequentes (DUARTE, 2006). A atividade de alguns OEs contra *M. furfur* tem sido relatada na literatura como artemísia (*Artemisia annua* L.) (SANTOMAURO et al., 2018), salsaão (*Apium graveolens* L.) (CHEE; LEE, 2009), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), canela (*Cinnamomum verum* J. Presl) (FERHOUT et al., 1999), entre outros (LEE; LEE, 2010; DONATO et al., 2020).

Modelo de estudo

A dermatite seborreica é uma doença crônica, recorrente e que não tem cura. Desse modo, as pessoas acometidas com essa doença precisam aprender a conviver com ela e utilizar uma forma de tratamento que seja seguro e eficaz devido a recorrência das lesões. Embora ocasionalmente cause complicações, o que mais provoca incômodo nos pacientes é o fator estético. Um estudo mostrou a correlação entre a qualidade de vida e a autoestima dos indivíduos com dermatite seborreica. Os autores verificaram que a diminuição da qualidade de vida é proporcional não só à presença da doença, principalmente se ela ocorre no couro cabeludo e na face, mas também ao grau em que ela se encontra (SZEPIETOWSKI et al., 2009).

A busca por substâncias naturais vem crescendo ao longo dos anos, principalmente em vista da resistência microbiana aos medicamentos sintéticos (MOLONEY, 2016). Além de alguns OEs serem considerados seguros para a utilização (EL-TARABILY et al., 2021) eles apresentam a vantagem de possuírem baixo valor aquisitivo e de gerarem menos danos ambientais. Em sua constituição apresentam diversas moléculas das quais destacam-se os aldeídos, fenóis e terpenóides oxigenados como os principais compostos associados à atividade antimicrobiana (JU et al., 2019). O mecanismo de ação desses compostos mostra que eles podem agir simultaneamente em diferentes regiões da célula microbiana (ARRUDA et al., 2022; TEIXEIRA; BALBINOT FILHO; BORGES, 2022). O uso dos OEs isolados ou em conjunto com os antimicrobianos sintéticos pode ser uma alternativa para a diminuição na incidência da resistência microbiana visto que, as moléculas sintéticas atuam geralmente em apenas um alvo (YAP et al., 2014).

Atualmente, existe uma tendência na substituição dos conservantes químicos por substâncias de origem natural que tenham propriedades antibacterianas e antifúngicas (NOWAK; JABŁOŃSKA; RATAJCZAK-WRONA, 2021). Os parabenos são ésteres do ácido *para*-hidroxibenzóico, com um grupo alquil (metil, etil, propil, butil ou heptil) ou grupo benzilo e são comumente utilizados como conservantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (HAMAN et al., 2015). Devido à ampla aplicação e uso dessas substâncias, problemas ambientais começam a surgir como, por exemplo, a contaminação da água (BOLUJOKO et al., 2021; HAMAN et al., 2015). Assim, o desenvolvimento de produtos com ausência de parabenos é promissor, pois auxilia na diminuição da contaminação ambiental causada por essas substâncias. Os OEs podem ser uma alternativa na substituição dos parabenos devido à sua característica antimicrobiana. Alguns estudos mostraram que essas substâncias têm a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos responsáveis pela contaminação e deterioração de produtos cosméticos (MASYITA et al., 2022). Outra vantagem na utilização

dos OEs em cosméticos provém da sua propriedade antioxidante (TIT; BUNGAU, 2023). Os OEs auxiliam na proteção dos cosméticos contra o envelhecimento prematuro causado pela oxidação e prolongam, desse modo, a vida útil dos produtos (GUO et al., 2021).

Objetivo

Objetivo geral

Verificar a atividade antifúngica de OEs e antifúngicos tradicionais contra *M. furfur*, a fim de desenvolver formulações tópicas para o tratamento da dermatite seborreica.

Objetivos específicos

O presente estudo foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo analisar a ação dos OEs isoladamente e em combinações (BOEs) sobre a viabilidade celular de *M. furfur* na forma planctônica e de biofilme, além do potencial anti-inflamatório e mutagênico da BOEs mais ativa. Com base nos resultados obtidos no primeiro capítulo, o segundo capítulo teve como objetivos desenvolver e avaliar a estabilidade de um gel, uma loção e um xampu formulados com uma BOEs e livre de parabenos. Por fim, sabendo que as informações a respeito da ação de antimicrobianos sintéticos sobre o biofilme de *M. furfur* são restritas na literatura, o terceiro capítulo teve como objetivo avaliar a ação de cinco antimicrobianos na inibição da formação e na erradicação do biofilme formado por *M. furfur*.

Capítulo 1

Sinergismo entre óleos essenciais e avaliação das suas atividades com enfoque no controle de *Malassezia furfur*

Resumo

Com o aumento da resistência microbiana a drogas, a comunidade científica iniciou uma incessante busca por alternativas visando o controle das doenças infecciosas. A dermatite seborreica é uma doença inflamatória crônica causada por espécies da levedura *Malassezia* que afeta as regiões do corpo onde as glândulas sebáceas estão presentes. O tratamento busca a melhora dos sintomas, sendo utilizados geralmente antifúngicos sintéticos, com certa recorrência. Dentre os produtos naturais oriundos de plantas medicinais e aromáticas, os óleos essenciais (OEs) se destacam pela comprovada ação antimicrobiana atribuída a sua variada composição química. O uso combinado de diferentes OEs pode aumentar seu espectro de ação. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a ação de OEs isoladamente e combinados sobre *M. furfur*, na forma planctônica e de biofilme, seu potencial anti-inflamatório (TNF- α ; IL-8) e mutagênico (teste de Ames), além dos efeitos sobre a viabilidade de células de queratinócitos humanos (HaCaT) e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). Dos 40 OEs avaliados, 22 apresentaram atividade contra *M. furfur* nas concentrações de 0,5–2,0 mg/mL. Dentre as espécies mais ativas, foi selecionada uma blenda de OEs (BOEs) composta de *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson (CIM = 0,5 mg/mL) e *Mentha $\times$ piperita* L. (CIM = 1,0 mg/mL), que apresentou efeito sinérgico contra a levedura quando avaliada através do ensaio de *checkerboard*. Com a adição do óleo de *Varronia curassavica* Jacq. à BOEs, a atividade fungicida se manteve. A BOEs apresentou atividade também na inibição da formação de biofilme ($\cong 80\%$) e na erradicação do biofilme formado ($\cong 30\%$) por *M. furfur*, sendo superior a ação do fluconazol. Além disso, não apresentou potencial mutagênico e não interferiu na viabilidade celular de ambas as linhagens celulares avaliadas. Os níveis de TNF- α foram reduzidos pelos OEs individualmente, exceto por *V. curassavica*, entretanto essa propriedade se manteve quando avaliada a BOEs. A BOEs não apresentou efeito sobre os níveis de IL-8. De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, a BOEs de *C. martini*, *M. $\times$ piperita* e *V. curassavica* mostrou ser eficaz no controle de *M. furfur*, apresentando também atividade anti-biofilme e anti-inflamatória, sem afetar a viabilidade de células HaCaT e BMDMs. Desse modo, essa BOEs pode ser indicada para tratamentos alternativos contra a dermatite seborreica.

Palavras-chave: óleos essenciais; dermatites; atividade antimicrobiana; *Cymbopogon martini*; *Mentha $\times$ piperita*; *Varronia curassavica*.

Introdução

A composição da pele humana varia de acordo com a fisiologia da região do corpo e dos fatores intrínsecos a cada indivíduo. Essas variações fisiológicas ocorrem em função dos diferentes níveis de umidade, temperatura e concentração de lipídios presentes na superfície da pele (PREDA-NAUMESCU; ELEWSKI; MAYO, 2021). Em relação à presença de micro-organismos, os fungos estão naturalmente presentes no ambiente, bem como na microbiota da pele. Contudo, problemas relacionados ao sistema imunológico podem alterar a homeostase cutânea ocasionando o aparecimento de infecções (PATHAKUMARI; LIANG; LIU, 2020).

Dermatomicoses ocorrem comumente em toda a população mundial, sendo os agentes etiológicos mais comuns *Candida albicans* e *Malassezia* spp. (HAU et al., 2015). Embora algumas espécies patogênicas de *Malassezia* tenham sido reportadas em casos de infecções sistêmicas, as leveduras desse gênero não causam danos graves, mas estão associadas a diversas doenças cutâneas como a foliculite, dermatite seborreica, dermatite atópica, psoríase, entre outras (PEDROSA; LISBOA; RODRIGUES, 2014). *Malassezia* é conhecida como um grupo de leveduras lipofílicas que proliferam em regiões do corpo com acúmulo de sebo, um fator determinante para o desenvolvimento da dermatite seborreica (MONIR; SCHOCH, 2022) e *Malassezia furfur* é considerada como o agente etiológico dessa patologia (GALVIS-MARÍN et al., 2017; NAKABAYASHI; SEI; GUILLOT, 2000).

A dermatite seborreica é uma doença inflamatória que acomete as regiões do corpo onde as glândulas sebáceas estão presentes como, por exemplo, a face e o couro cabeludo (MONIR; SCHOCH, 2022). Embora seja uma doença que dificilmente cause graves complicações, as pessoas acometidas pela dermatite seborreica acabam desenvolvendo problemas emocionais e até mesmo sociais devido ao fator estético (PEYRÍ; LLEONART, 2007). Como forma de tratamento são utilizados xampus e outras soluções tópicas formuladas com agentes antifúngicos (cetoconazol, miconazol, terbinafina, ciclopirox olamina, etc.) às vezes em associação com anti-inflamatórios (pimecrolimo). A incorporação de outros fármacos em xampus, como o ácido salicílico, auxilia na diminuição da descamação do couro cabeludo (DEL ROSSO, 2011).

Com o aumento da resistência microbiana às drogas, a busca por novos antimicrobianos tem se mostrando cada vez mais necessária. Esta representa um grave problema de saúde pública a nível mundial, não só dificultando a forma de tratamento, mas também promovendo um aumento no número de óbitos causados por infecções (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Especificamente sobre os antifúngicos sintéticos, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos não tiveram um progresso significativo nos

últimos anos (CUI et al., 2022). Desse modo, os produtos naturais se mostram uma alternativa promissora para a busca de novas terapêuticas na tentativa de evitar a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (YAP et al., 2014).

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos majoritariamente por terpenos e são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas. São líquidos insolúveis em água e solúveis em gordura, geralmente translúcidos, com aroma pronunciado e que apresentam instabilidade quando expostos à altas temperaturas (OMAR et al., 2022). Essas substâncias agem rompendo a parede celular do micro-organismo, facilitando a penetração dos terpenos devido à sua característica hidrofóbica e ao seu baixo peso molecular (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ; BARRAJÓN-CATALÁN; MICOL, 2020). A combinação de diferentes OEs e seus componentes pode ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento de um produto com a finalidade de impedir a resistência microbiana (SANTANA et al., 2022). A associação dessas substâncias promove o aumento do seu espectro de ação sem ser necessário, eventualmente, aumentar a sua concentração (EL ATKI et al., 2019). Os OEs têm a sua atividade pela atuação dos compostos majoritários em associação sinérgica com os compostos minoritários. Um exemplo é o *p*-Cimeno que, embora não apresente atividade antimicrobiana isoladamente, quando combinado com o carvacrol facilita o transporte do carvacrol para o interior do micro-organismo (POMBO et al., 2018). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a ação dos OEs isoladamente e em combinações (BOEs) sobre a viabilidade celular de *M. furfur* na forma planctônica e de biofilme, além do potencial anti-inflamatório e mutagênico da BOEs mais ativa.

Material e Métodos

Material vegetal e obtenção dos OEs

A extração dos OEs foi realizada na Divisão de Agrotecnologia (DAGRO) e na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

As espécies selecionadas para o presente estudo encontram-se listadas na Tabela 1. Foram utilizadas 40 espécies, sendo 18 nativas e 22 exóticas, 27 destas pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA/UNICAMP e 13 amostras de OEs obtidas do comércio local. Os OEs das espécies da CPMA foram obtidos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, usando-se aproximadamente 500 g da parte selecionada da planta (raízes, caules, folhas ou inflorescências) em 4,5 L de água destilada. A água foi aquecida até atingir o ponto de ebulição, permanecendo em fervura por um período de 4 h. Após a extração,

as amostras foram coletadas com o auxílio de uma pipeta, transferidas para frascos âmbar e mantidas em freezer (-6 °C) até o momento das análises.

O projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o código A362580 (Anexo).

Tabela 1. Espécies medicinais e aromáticas selecionadas para este estudo (nomes populares e suas respectivas origens em relação ao Brasil)

Espécie	Família	Nome popular	Parte utilizada	Origem	Voucher
<i>Achyrocline saturejoides</i> (Lam.) DC.	Asteraceae	Macela	Inflorescência	Nativa	CPMA 10
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook.) Tronc.	Verbenaceae	Alfazema-do-Brasil	Inflorescência	Nativa	CPMA 714
<i>Artemisia annua</i> L.	Asteraceae	Artemísia	Folha	Exótica	CPMA 25
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Asteraceae	Vassourinha	Folha	Nativa	CPMA 787
<i>Baccharis crispa</i> Spreng.	Asteraceae	Carqueja	Folha	Nativa	UEC 184154
<i>Bixa orellana</i> L.	Bixaceae	Urucum	Semente	Nativa	CPMA 252
<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl	Lauraceae	Canela-da-China	Caule	Exótica	Comercial
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Lauraceae	Canela-do-Ceilão	Caule	Exótica	Comercial
<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle.	Rutaceae	Lima-da-Pérsia	Fruto	Exótica	Comercial
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Fabaceae	Copaíba-vermelha	Caule	Nativa	Comercial
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	Coentro	Semente	Exótica	Comercial
<i>Corymbia citriodora</i> (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson	Myrtaceae	Eucalipto-cidró	Folha	Exótica	Comercial
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae	Capim-limão	Folha	Exótica	CPMA 503
<i>Cymbopogon martini</i> (Roxb.) Will. Watson	Poaceae	Palmarosa	Folha	Exótica	UEC 127115
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor	Poaceae	Citronela	Folha	Exótica	UEC 121414
<i>Cyperus articulatus</i> L.	Cyperaceae	Priprioca	Raiz	Nativa	UEC 121396
<i>Elionurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze	Poaceae	Capim-corona	Folha	Nativa	CPMA 1701
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	Eucalipto-comum	Folha	Exótica	CPMA 315
<i>Eucalyptus staigeriana</i> F. Muell. ex F.M. Bailey	Myrtaceae	Eucalipto-cidreira	Folha	Exótica	Comercial
<i>Eugenia florida</i> DC.	Myrtaceae	Guamirim-cereja	Folha	Nativa	UEC 206641
<i>Eugenia</i> sp.	Myrtaceae	-	Folha	Nativa	UEC 207435
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Pitanga	Folha	Nativa	UEC 184194

<i>Illicium verum</i> Hook. f.	Illiciaceae	Anis-estrelado	Fruto	Exótica	Comercial
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson	Verbenaceae	Alecrim-do-campo	Folha	Nativa	CPMA 467
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Verbenaceae	Alecrim-pimenta	Folha	Nativa	UEC 184171
<i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers.	Lauraceae	Pimenta-chinesa	Fruto	Exótica	Comercial
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	Myrtaceae	Árvore-do-chá	Folha	Exótica	Comercial
<i>Mentha arvensis</i> L.	Lamiaceae	Hortelã-japonesa	Folha	Exótica	UEC 186858
<i>Mentha × piperita</i> L.	Lamiaceae	Hortelã-pimenta	Folha	Exótica	Comercial
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano	Folha	Exótica	UEC 188713
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Wardlew.	Rutaceae	Jaborandi	Folha	Nativa	CPMA 320
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Apiaceae	Erva-doce	Folha	Exótica	Comercial
<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass.	Asteraceae	Arnica-paulista	Folha	Nativa	CPMA 1847
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Asteraceae	Santolina	Inflorescência	Exótica	CPMA 1812
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Anacardiaceae	Pimenta-rosa	Folha	Nativa	CPMA 1707
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Myrtaceae	Cravo-da-Índia	Inflorescência	Exótica	UEC 111549
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Tomilho	Folha	Exótica	Comercial
<i>Varronia curassavica</i> Jacq.	Boraginaceae	Erva-baleeira	Folha	Nativa	UEC 184696
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Annonaceae	Pimenta-de-macaco	Folha	Nativa	UEC 121302
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Gengibre	Caule	Exótica	CPMA 533

CPMA: Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP; UEC: Herbário da Universidade Estadual de Campinas; Comercial: amostras de óleo essencial obtidas do comércio local

Composição química

A análise cromatográfica dos OEs foi realizada no Laboratório de Instrumentação (LINST) do CPQBA/UNICAMP.

A caracterização química dos OEs foi realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um cromatógrafo Agilent 6890, com detector de massas 5975, injetor automático 7683B acoplado a uma coluna capilar HP5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25µm). As condições de análise foram temperatura do injetor a 220 °C, detector a 250 °C, coluna a 60 °C, (3 °C/min.) até 240 °C; gás de arraste (He super seco) a 1,0 mL/min, sendo as amostras dissolvidas em acetato de etila na concentração aproximada de 20 mg/mL. Os compostos foram identificados em comparação com os padrões de fragmentação da biblioteca NIST 2011 acoplada ao equipamento e da literatura de Adams (2007). Para o cálculo do índice de retenção, foi realizada a co-injeção de um padrão de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) que foram injetados nas mesmas condições cromatográficas utilizadas.

Diluição das amostras

Para uso nos testes biológicos, uma solução estoque de cada óleo essencial (OE) foi preparada através da diluição de 80 mg de OE para um volume final de 10 mL. Os OEs foram dispersados em uma mistura com aproximadamente 2,5 mL de uma solução 0,1% de Tween 80 e até 0,5 mL de DMSO, podendo variar de acordo com o óleo. Após isso, foi adicionado o meio RPMI-1640 suplementado (CESA et al., 2019; ROJAS et al., 2014; VELEGRAKI et al., 2004).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM)

Em microplacas estéreis de 96 poços foram depositados 100 µL do meio RPMI-1640 suplementado (g/L): extrato de malte 5; peptona 10; Tween 20 5; Tween 80 0,5; glicerol 10; bile bovina 5; glicose 18 e 100 µL das amostras de OEs no primeiro poço de cada coluna. Diluições seriadas foram realizadas através da homogeneização do material contido no primeiro poço, seguido da transferência de 100 µL para o segundo poço e assim sucessivamente até o último poço sendo os 100 µL finais desprezados. A faixa de concentração avaliada foi entre 0,03–2,0 mg/mL. Em seguida foram adicionados 100 µL do inóculo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello), cuja densidade ótica (Abs) foi acertada entre 0,08 e 0,1 em espectrofotômetro a 530 nm, seguido da diluição para uma concentração final de 10³ células/mL (CLSI, 2018). Foram adicionados aos ensaios o controle de esterilidade do meio de cultura, das amostras e do inóculo. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e após esse período foi observado se houve mudança de coloração

do meio que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo.

As amostras testadas foram também avaliadas quanto a CFM através do plaqueamento em meio sólido (extrato de malte 36; peptona 36; Tween 80 10; glicerol 5 g/L) do material contido nos poços da CIM e das concentrações inibitórias acima desta. As placas foram incubadas à 37 °C durante 48 h e avaliadas quanto ao crescimento de colônias. A menor concentração na qual não houve crescimento da levedura foi considerada como fungicida, ou seja, a concentração capaz de matar 99,9% das células. No caso de haver concentrações onde ocorreu a inibição parcial do crescimento fúngico, estas foram consideradas como fungistáticas. As análises de CIM e CFM foram feitas em triplicata.

Efeito sinérgico da mistura de OEs

Para verificar o sinérgismo da atividade antifúngica pela combinação dos OEs das diferentes plantas medicinais, as espécies foram escolhidas de acordo com o valor da CIM (maior atividade antifúngica) e o rendimento em óleo. Essas amostras foram analisadas através da técnica de *checkerboard* para determinação da concentração inibitória fracionada (CIF).

Foram utilizadas soluções dos OEs de acordo com as respectivas CIM, em concentrações de CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8. As amostras foram pesadas individualmente em frascos estéreis nas respectivas concentrações e diluídas da mesma forma, conforme mencionado anteriormente. Em microplacas estéreis de 96 poços, foram depositados 100 µL das soluções de OEs (CIM/8 até CIM×8) nos sete primeiros poços da primeira linha no sentido vertical, para uma das amostras de OE (A) e nos sete primeiros poços da primeira linha no sentido horizontal para a outra amostra de óleo (B). Em seguida foram adicionados, da primeira até a sétima coluna, 50 µL das soluções mantendo a concentração fixa no sentido vertical e horizontal, de tal maneira que houvesse uma mistura dos dois OEs em todas as combinações possíveis. Por fim, 100 µL do inóculo de *M. furfur* contendo 10³ células/mL foram adicionados em cada um dos poços e as placas incubadas por 48 h à 37 °C. Foram incluídos nos testes controles de esterilidade do meio de cultura, das amostras e do inóculo.

A interpretação dos resultados foi baseada no cálculo da CIF das amostras onde: $CIF\ A = (CIM\ de\ A\ na\ presença\ de\ B) / (CIM\ de\ A)$ e $CIF\ B = (CIM\ de\ B\ na\ presença\ de\ A) / (CIM\ de\ B)$. Para determinar o valor do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi considerada a soma da CIF de A + CIF de B. O ICIF permite determinar a atividade da mistura,

e é classificado em sinérgico (ICIF < 1,0), aditivo (ICIF = 1,0), indiferente (ICIF entre 1,0 e 2,0) ou antagônico (ICIF > 2,0) (FRATINI et al., 2017).

Uma vez determinado o efeito sinérgico, o OE de *V. curassavica* foi adicionado à BOEs selecionada. Essa espécie foi selecionada devido aos relatos da literatura quanto à sua propriedade anti-inflamatória (MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021). Para verificar se a atividade antifúngica se mantinha na BOEs com a adição do OE de *V. curassavica*, o óleo foi incorporado em três proporções diferentes: 90/10, 75/25 e 50/50 (BOEs com atividade antifúngica/OE de *V. curassavica*). Cada uma das misturas foi testada na faixa entre 0,5–2,0 mg/mL, sendo a CIM e a CFM determinadas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Inibição da formação de biofilme

Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U” foram testados os OEs selecionados, individualmente e em mistura, na faixa entre 0,008–2,0 mg/mL quanto à inibição da formação de biofilme por *M. furfur*. As análises foram realizadas de acordo com o método de microdiluição, conforme descrito anteriormente, com diferença na concentração do inóculo utilizado (10^6 células/mL). Foram incluídos controles do meio de cultura, dos OEs e do inóculo. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico fluconazol (0,008–0,25 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e, passado o período de incubação, o meio de cultura contido nos poços foi retirado, seguido de lavagem dos poços com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para remoção das células planctônicas e de secagem em estufa a 60 °C por 1 h. O biofilme formado foi corado com solução de Cristal Violeta (0,4%) por 15 min e, após lavagem com água corrente, foi solubilizado com DMSO (200 µL/poço). Após 1 h, foi realizada leitura de absorbância das placas em leitor de microplaca (GloMax) a 540 nm (LIZCANO, 2015). As análises foram feitas em triplicata.

Erradicação do biofilme formado

Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U”, foram depositados apenas o meio de cultura, seguido do inóculo de *M. furfur* a 10^6 células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e, passado o período de incubação, o meio de cultura contido nos poços foi retirado, permanecendo apenas o biofilme formado. Sobre essa camada de biofilme foi realizada a microdiluição das amostras, conforme descrito anteriormente, nas mesmas concentrações especificadas (0,008–2,0 mg/mL) seguido da re-incubação das placas a 37 °C por 48 h. Os controles foram os mesmos em ambas as análises. Passado o período de incubação, foi realizado

o mesmo processo utilizado no ensaio sobre a ação na formação do biofilme, ou seja, lavagem com solução salina estéril, aplicação de Cristal Violeta, solubilização e leitura em leitor de microplaca. As leituras foram convertidas em porcentagens correspondentes a quantidade de biofilme inibido ou erradicado segundo a fórmula: $[(\text{absorbância do poço com amostra} - \text{absorbância do controle}) \times 100] / \text{absorbância do controle do micro-organismo} - \text{absorbância do controle da placa}$ (LIZCANO, 2015). As análises foram feitas em triplicata.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise do biofilme por MEV foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do IB/UNICAMP.

Para a análise do biofilme foram utilizados fragmentos de vidro (4 x 8 mm) esterilizados previamente em autoclave (121 °C, 15 min). Esses fragmentos foram adicionados nos compartimentos das placas de 96 poços, tanto para os testes com os OEs quanto para os controles. Os fragmentos foram retirados dos poços, lavados rapidamente com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para remoção do excesso de meio de cultura e das células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos de microcentrífuga contendo 1,0 mL de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) para fixação, por 24 h. Após este período, o material foi lavado com solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) duas vezes por 20 min e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% (v/v) em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) por 1 h. Depois, as amostras foram lavadas com solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) duas vezes por 20 min e desidratadas em gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, sendo que na última concentração as amostras foram lavadas três vezes), por 10 min em cada concentração (SILVEIRA, 2015). Finalmente, as amostras presentes nos fragmentos de vidro foram secas pela técnica do ponto crítico de CO₂ no equipamento Balzers - modelo CPD 030. Os fragmentos foram montados em *stubs* de alumínio e recoberto com ouro coloidal por 200 seg no equipamento Bal-Tec - modelo SCD 050. A análise e o registro eletromicrográfico foram realizados no microscópio eletrônico de varredura JEOL - modelo JSM-5800LV, operado a 20 kV.

A medida do diâmetro das células foi gerada utilizando a barra de escala das eletromicrografias, juntamente com as ferramentas do programa ImageJ. Quando possível, foram selecionadas 10 células por amostra/tratamento para a realização da aferição.

Linhagens celulares e condições de manutenção

Células HaCaT, linhagem celular imortalizada de queratinócitos humanos (homem, 62 anos), foram doadas pelo Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus (IB/UNICAMP). A linhagem foi cultivada em meio DMEM (Gibco) com alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B, em frascos T-75 a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO₂.

Células L929, linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (macho), foram doadas pelo Prof. Dr. José Carlos Alves-Filho (FMRP/USP, Ribeirão Preto). Células L929 foram cultivadas em placas de 15 mm, em 20 mL de meio RPMI suplementado com 1% penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (RPMIc). O meio foi trocado a cada 2 dias até as células adquirirem a confluência próxima de 100%. Nesse ponto, o meio foi trocado por 50 mL de RPMIc e as células foram cultivadas por 14 dias em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período, o meio condicionado foi coletado e filtrado em membrana de 20 µm para remover artefatos celulares. O meio condicionado foi então testado em diferentes concentrações para avaliar a eficiência em diferenciar células da medula em macrófagos (definidos como células que expressam as proteínas de membrana F4/80⁺ e CD11b⁺). É definida a menor concentração de meio condicionado por L929 para induzir a maior diferenciação de macrófagos, isto é, a capacidade do meio de induzir a expressão de F4/80 e CD11b.

Avaliação in vitro da atividade anti-inflamatória e influência sobre a viabilidade celular

HaCaT

As análises sobre a linhagem celular HaCaT foram realizadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do CPQBA/UNICAMP e no Laboratório de Biotecnologia Celular da PUC-Campinas.

As análises foram realizadas pelo método do MTT, sobre a linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Os OEs foram diluídos na proporção de 1,0 mg de OE para 10 µL de DMSO. Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10⁴ células/poço), com meio de cultivo DMEM em volume final de 200 µL. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionadas as amostras de OEs (individualmente e em mistura) na faixa de concentração entre 1,0–1000 µg/mL e as células foram incubadas novamente por 24 h. Após este período, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, a 22 °C por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao material celular foi adicionado 90 µL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) acrescida de 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich)

em cada poço. Após 3 h de incubação, a solução de MTT foi removida e em cada poço foi adicionado 100 μ L de isopropanol conforme ISO 10993-18 (THANGARAJU; VARTHYA, 2022). A placa foi agitada por 15 min e a leitura foi feita em leitor de microplaca (GloMax) a 560 nm.

Para quantificação de IL-8, as placas foram montadas conforme descrito anteriormente. As células foram incubadas com a BOEs e depois de 30 min foram adicionados o TNF- α e INF- γ (10 ng/mL cada). A BOEs foi analisada nas concentrações de 0,03–1,0 μ g/mL e, após 24 h de incubação, a quantificação de IL-8 foi realizada empregando o sobrenadante por ELISA conforme as recomendações do fabricante.

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

As análises sobre os BMDMs foram realizadas no Laboratório de Imunometabolismo (LIM) do IB/UNICAMP.

Para obtenção dos BMDMs, foram utilizados animais C57BL/6J, advindos do Biotério de Camundongos do DGEMI e DBBT (IB/UNICAMP). Após eutanásia, as células do fêmur e tíbia foram isoladas e cultivadas em placas de 48 poços, na densidade 10^5 células/poço. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C e diferenciadas por 5 dias em 500 μ L de meio RPMI-1640 suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, Cat. #P4333-100ML), 1% de vitamina (Sigma-Aldrich, Cat. #M6895-100ML), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, Cat. #M7145-100ML), 1% piruvato (Sigma-Aldrich, Cat. #S8636-100ML) e 10% de soro bovino fetal (Cultilab). Para diferenciação das células em macrófagos foi utilizado 10% do sobrenadante da linhagem celular L929. No quinto dia, o meio RPMI-1640 acrescido de 10% de L929 foi renovado. No sexto dia, as células foram tratadas de acordo com a finalidade do experimento. Os BMDMs foram estimulados com 100 ng/mL de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, Sigma-Aldrich, Cat. #L4391-1MG,) por 6 h, na presença ou não dos OEs (200 ng/mL). Os OEs foram diluídos na proporção de 1,0 mg de OE para 10 μ L de DMSO. Como controle negativo foram utilizados macrófagos tratados apenas com PBS ou com os respectivos OEs. Ao final dos respectivos tratamentos, o sobrenadante foi coletado.

A quantificação de TNF- α secretada no sobrenadante foi realizada por ELISA (BioLegend, Cat. #430204), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas na proporção 1:50 em diluente de ensaio. Para verificar a viabilidade celular, o sobrenadante dos BMDMs foi removido, as células foram lavadas com 200 μ L de PBS e ressuspendidas em 100 μ L de meio Krebs. Desse volume, 10 μ L foram diluídos em 90 μ L de

Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Cat. T8154-100ML) diluído em PBS na proporção 1:1. A contagem do número de células mortas e do total de células foi realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade foi calculada pela porcentagem obtida pela relação do número de células mortas sobre o número total de células.

Ensaio de mutagenicidade

A análise de mutagenicidade foi realizada no Laboratório de Mutagênese e Toxicidade da Universidade de Araraquara (LAMUT/UNIARA).

De acordo com a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Maron e Ames (1983), cinco diferentes concentrações das amostras foram avaliadas (6,25; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 µg/placa). O estudo foi realizado com as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*. Com auxílio de alça de inoculação, uma pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada em estufa a 37 °C, por 14–16 h, em incubadora tipo *shaker* (37 °C – 100 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ células/mL. Às concentrações das amostras foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M e 0,1 mL de cultura de bactérias, seguido de incubação a 37 °C por 20 a 30 min. As concentrações foram determinadas a partir de testes preliminares de toxicidade usando a linhagem TA100. Os testes foram iniciados com 8,0 mg/placa de cada amostra, no entanto devido à toxicidade evidenciada pela ausência total de revertentes His+ nas placas teste de ágar mínimo, foi necessário diminuir até encontrar o limite máximo de toxicidade. Decorrido o tempo de incubação; 2,0 mL de “*top agar*” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “*top agar*”, as placas foram incubadas por 48 h, a 37 °C. Ao final desse período foi realizada manualmente a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa foram 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102. O controle negativo foi DMSO (100 µL/placa) solvente/veículo das amostras. Os meios de cultura e soluções necessárias para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula: IM = número de revertentes; placa com o composto-teste (revertentes induzidas) / número de revertentes; placa

com o controle (solvente) negativo. A amostra é considerada mutagênica quando houver relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos, e/ou quando o IM for $\geq 2,0$ em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Análise estatística

A comparação estatística dos resultados quantitativos foi verificada usando o teste ANOVA de duas vias considerando a média e o desvio padrão da média por meio do programa GraphPad Prism 8.0. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para a análise de mutagenicidade, foi utilizado o software SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*; U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA).

Resultados e Discussão

Atividade antifúngica dos OEs

Quanto a atividade antifúngica das espécies, dos 40 OEs testados, 22 mostraram atividade contra *M. furfur* nas concentrações entre 0,5–2,0 mg/mL. Não foram observadas atividades nas concentrações abaixo de 0,5 mg/mL. Das espécies que apresentaram atividade contra *M. furfur*, quatro são representantes das famílias Lamiaceae (*M. arvensis*, *M. × piperita*, *O. vulgare* e *T. vulgaris*) e Poaceae (*C. citratus*, *C. martini*, *C. winterianus* e *E. muticus*). Essas famílias são conhecidas por apresentarem propriedades antifúngicas contra a forma planctônica (VERMA et al., 2019; WALLER et al., 2017) e de biofilme (ERHABOR; ERHABOR; MCGAW, 2019; FERRAZ DE MELO et al., 2022; ORTEGA-CUADROS et al., 2018; PROŠKOVCOVÁ et al., 2021) de diferentes micro-organismos. Também existem relatos da atividade de algumas das espécies pertencentes a essas famílias contra a forma planctônica (NÓBREGA; ANDRADE-JÚNIOR; CARMO, 2019; VINCIGUERRA et al., 2018) e de biofilme (RHIMI et al., 2022) de *M. furfur*.

Rendimento e composição química dos OEs estudados

Os rendimentos em OEs das espécies que apresentaram atividade, bem como os resultados de CIM e CFM obtidos no presente trabalho estão apresentados na Tabela 2. Os demais rendimentos são mostrados no “Apêndice A”. Os menores rendimentos em OEs foram de *X. aromatica* (0,06%) e *E. uniflora* (0,07%) enquanto os maiores foram de *L. origanoides* (2,73%) e *S. aromaticum* (4,69%).

Tabela 2. Rendimento e atividade antimicrobiana (CIM e CFM) dos OEs das plantas medicinais e aromáticas estudadas

Espécie	Parte utilizada	Rendimento (%) *	CIM (mg/mL)	Atividade **
<i>A. saturejoides</i>	Inflorescência	0,17	1,0	Fc
<i>B. dracunculifolia</i>	Folha	0,80	1,0	Fc
<i>C. cassia</i>	Caule	-	0,5	Fc
<i>C. verum</i>	Caule	-	1,0	Fc
<i>C. citratus</i>	Folha	1,12	1,0	Fc
<i>C. martini</i>	Folha	1,05	0,5	Fc
<i>C. winterianus</i>	Folha	1,48	0,5	Fc
<i>C. articulatus</i>	Raiz	0,23	1,0	Fc
<i>E. muticus</i>	Folha	1,11	2,0	Fc
<i>Eugenia</i> sp.	Folha	0,56	1,0	Fc
<i>E. uniflora</i>	Folha	0,07	1,0	Ft
<i>L. origanoides</i>	Folha	2,73	1,0	Fc
<i>L. cubeba</i>	Fruto	-	2,0	Ft
<i>M. arvensis</i>	Folha	0,35	2,0	Fc
<i>M. × piperita</i>	Folha	-	1,0	Fc
<i>O. vulgare</i>	Folha	1,50	2,0	Fc
<i>P. rudérale</i>	Folha	0,22	1,0	Fc
<i>S. terebinthifolia</i>	Folha	1,90	2,0	Ft
<i>S. aromaticum</i>	Inflorescência	4,69	0,5	Fc
<i>T. vulgaris</i>	Folha	0,65	0,5	Fc
<i>X. aromatica</i>	Folha	0,06	2,0	Fc
<i>Z. officinale</i>	Caule	1,20	0,5	Fc

* Relação massa de planta (g) / massa de óleo essencial (g)

** A concentração fungicida/fungistática foi semelhante à CIM

Fc: atividade fungicida; Ft: atividade fungistática

Os OEs que apresentaram atividade antifúngica foram analisados por CG-EM. Os respectivos cromatogramas estão apresentados no “Apêndice B”. Como observado na Tabela 3, a maioria das espécies teve mais de 90% dos seus compostos identificados, com exceção de *B. dracunculifolia* (87,96%), *C. articulatus* (53,01%), *E. uniflora* (32,91%) e *X. aromatica* (54,78%). Os monoterpenos ocorreram em maior proporção do que os sesquiterpenos em quase todas as espécies, menos em *A. saturejoides*, *B. dracunculifolia*, *Eugenia* sp., *E. uniflora* e *X. aromatica*. Em menor proporção, foram identificados hemiterpenos em *E. uniflora* (0,28%) e *X. aromatica* (0,14%) e diterpenos em *Eugenia* sp. (0,80%), *X. aromatica* (0,41%) e *Z. officinale* (2,53%). Os compostos majoritários mais frequentes entre os OE foram o α -pineno, geranial, eugenol, mentol e timol. Embora *V. curassavica* não tenha apresentado efeito inibitório contra *M. furfur*, observou-se que o OE era composto por 28,26% de monoterpenos, 60,09% de sesquiterpenos e o composto majoritário foi α -Santaleno (28,85%).

Os monoterpenos são hidrocarbonetos com uma grande variedade molecular utilizados comumente como agentes aromatizantes na indústria cosmética, farmacêutica e também alimentar (PAULINO et al., 2022). Além disso, diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à esses compostos incluindo efeitos analgésico, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antidepressivo, anti-Alzheimer, anti-Parkinson, antimicrobiano (SALAKHUTDINOV; VOLCHO; YAROVAYA, 2017), dentre outras. O potencial antimicrobiano e antioxidante dos monoterpenos pode ser determinado por certas características estruturais como a presença de grupos hidroxila e a quantidade de ligações duplas (monoterpenos acíclico), ligações duplas conjugadas e grupos fenólicos (monoterpenos monocíclicos) e grupos carbonila constituinte de aldeídos ou cetonas (monoterpeno bicíclico) (PAULINO et al., 2022). Algumas espécies como *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *S. aromaticum* e *C. citratus* têm reconhecida atividade antifúngica oriunda da presença dos monoterpenos em seus OEs (DEHSHEIKH et al., 2020).

Tabela 3. Compostos majoritários e porcentagem relativa da área das substâncias (CG-EM) presentes nos OEs que apresentaram atividade antifúngica contra *M. furfur*. Hemi: hemiterpenos, mono: monoterpenos, sesqui: sesquiterpenos e di: diterpenos

Espécie	Composto majoritário *	Hemi (%)	Mono (%)	Sesqui (%)	Di (%)	Total (%)
<i>A. saturojoides</i>	α -Pineno	-	32,89	65,20	-	98,09
<i>B. dracunculifolia</i>	<i>trans</i> -Nerolidol	-	7,01	80,95	-	87,96
<i>C. cassia</i>	<i>trans</i> -Cinamaldeído	-	99,19	0,36	-	99,55
<i>C. verum</i>	Eugenol	-	85,77	11,51	-	97,28
<i>C. citratus</i>	Geranial	-	89,21	5,00	-	94,21
<i>C. martini</i>	Geraniol	-	93,70	2,23	-	95,93
<i>C. winterianus</i>	Citronelal	-	84,31	11,37	-	95,68
<i>C. articulatus</i>	α -Pineno	-	30,52	22,49	-	53,01
<i>E. muticus</i>	Geranial	-	94,62	4,29	-	98,91
<i>Eugenia</i> sp.	Biciclogermacreno	-	2,00	90,18	0,80	92,98
<i>E. uniflora</i>	Curzereno	0,28	1,71	30,92	-	32,91
<i>L. origanoides</i>	Timol	-	79,35	17,76	-	97,11
<i>L. cubeba</i>	Neral	-	93,07	1,07	-	94,14
<i>M. arvensis</i>	Mentol	-	96,69	0,29	-	96,98
<i>M. × piperita</i>	Mentol	-	96,17	0,87	-	97,04
<i>O. vulgare</i>	<i>p</i> -Timol	-	89,51	3,66	-	93,17
<i>P. ruderales</i>	<i>trans</i> - β -Ocimeno	-	96,86	-	-	96,86
<i>S. terebinthifolia</i>	α -Pineno	-	60,41	31,12	-	91,53
<i>S. aromaticum</i>	Eugenol	-	90,94	8,18	-	99,12
<i>T. vulgaris</i>	Timol	-	95,68	-	-	95,68
<i>X. aromatica</i>	Gleenol	0,14	1,49	52,74	0,41	54,78
<i>Z. officinale</i>	Geranial	-	71,53	24,05	2,53	98,11

* Compostos com % relativa $\geq$ a 90%

Desenvolvimento da BOEs e atividade anti-biofilme

A partir dos resultados, foram selecionados dois OEs a fim de verificar uma possível ação sinérgica contra *M. furfur*. Os OEs foram escolhidos de acordo com o rendimento e o odor para eventual incorporação em formulações tópicas para o tratamento da dermatite seborreica. Dessa forma, espécies como *S. aromaticum* (GOMES et al., 2018; KHUNKITTI; VEERAPAN; HAHNVAJANAWONG, 2012; PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2006), *C. cassia* e *C. verum* (BICKERS et al., 2005; COCCHIARA et al., 2005) não foram selecionadas devido aos relatos na literatura de citotoxicidade e alergias causadas na pele humana. Outras espécies como *C. winterianus*, *L. origanoides*, *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *X. aromatica* não foram escolhidas por não serem habitualmente incorporadas em produtos cosméticos. Desse modo, foram selecionados os OEs de *C. martini* e *M. × piperita*. De acordo com a CIF da mistura obtida no ensaio *checkerboard* foi possível observar que nas concentrações estabelecidas, o sinérgismo ocorreu a partir da concentração de 0,25 mg/mL para ambos os OEs (Figura 1).

		<i>M. × piperita</i> (mg/mL)						
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,13
<i>C. martini</i> (mg/mL)	4	16	12	10	9	8,5	8,25	8,13
	2	12	8	6	5	4,5	4,25	4,13
	1	10	6	4	3	2,5	2,25	2,13
	0,5	9	5	3	2	1,5	1,25	1,13
	0,25	8,5	4,5	2,5	1,5	1	0,75	0,63
	0,13	8,25	4,25	2,25	1,25	0,75	0,50	0,38
	0,06	8,13	4,13	2,13	1,13	0,63	0,38	0,25

Figura 1. Valores de concentração inibitória mínima fracionada obtidos através da mistura dos OEs de *C. martini* e *M. × piperita* frente a levedura *M. furfur*, utilizados no ensaio de *checkerboard*. Região em rosa: efeito sinérgico (ICIF < 1,0), região em verde: efeito aditivo (ICIF = 1,0), região em azul: indiferente (ICIF entre 1,0 e 2,0), região em cinza: antagônico (ICIF > 2,0).

Após confirmação do efeito sinérgico da mistura dos OEs de *C. martini* e *M. × piperita* sobre *M. furfur*, foram realizados ensaios independentes com o OE de *V. curassavica* devido ao seu potencial anti-inflamatório (MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021). A adição do OE de *V. curassavica* ocasionou uma mudança na CIM de 0,5–1,0 mg/mL

para 2,0 mg/mL, na proporção de 90% da mistura com atividade antifúngica acrescida de 10% do OE de *V. curassavica*. Mesmo com essa mudança na CIM, a mistura continuou apresentando atividade fungicida. Nas demais proporções analisadas (75/25 e 50/50), a mistura não apresentou atividade.

Sobre a composição química da BOEs (Tabela 4), pode-se observar a presença das mesmas substâncias que foram identificadas separadamente em *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica*. Foram identificados 96,77% dos compostos, sendo que desses 87,00% são monoterpenos e 9,77% são sesquiterpenos. O composto majoritário foi o geraniol (29,27%) seguido de mentol (16,86%), mentona (12,39%), acetato de geranila (5,45%), isomentona (5,32%), cariofileno (4,99%), α -pineno (3,87%), acetato de mentila (3,51%) e eucaliptol (3,02%). Esses compostos majoritários foram os mesmos identificados em outros estudos com estas espécies (GHOLAMIPOURFARD; SALEHI; BANCHIO, 2021; ÖNEM, 2022; TONIAL et al., 2020).

Uma vez selecionados os OEs de *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica*, as amostras foram testadas individualmente e em mistura quanto a sua ação na inibição da formação e na erradicação do biofilme. Os resultados estão apresentados na Figura 2. A porcentagem de inibição foi maior para a BOEs e, individualmente, a ação dos OEs foi semelhante. A BOEs apresentou atividade na faixa de concentração de 1,0–2,0 mg/mL ($\cong 82\%$), diminuiu a partir de 0,5 mg/mL ($\cong 26\%$) e não apresentou atividade abaixo desta concentração. Quanto a erradicação do biofilme (Figura 2B), a BOEs apresentou atividade na faixa de 0,5–2,0 mg/mL. A maior porcentagem de erradicação ocorreu em 2,0 mg/mL ($\cong 30\%$), decaindo a partir desta concentração. Individualmente, as amostras tiveram uma ação semelhante, sendo o óleo de *C. martini* o que apresentou melhor atividade de erradicação ($\cong 25\%$). O fluconazol não teve ação inibitória sobre a formação do biofilme nem na erradicação do biofilme formado.

Outras espécies que apresentaram atividade contra a forma planctônica de *M. furfur* (*A. saturojoides*, *C. articulatus*, *E. uniflora* e *S. aromaticum*) também apresentaram efeito na inibição e na erradicação do biofilme. Esses resultados podem ser observados no “Apêndice C”.

Tabela 4. Composição química da BOEs formada por *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica* (CG-EM), com índice de retenção (IR) e porcentagem de área, bem como proposta de identificação por comparação com a biblioteca NIST 2011

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
1	5,01	α -Tujeno	0,16	926	924
2	5,19	α -Pineno	3,87	933	932
3	5,53	Canfeno	0,07	947	946
4	6,25	β -Pineno	0,89	974	974
7	7,38	α -Terpineno	0,09	1016	1014
8	7,63	<i>o</i> -Cimeno	0,18	1024	1022
9	7,78	D-Limoneno	1,32	1028	1024
10	7,85	Eucaliptol	3,02	1030	1026
11	8,04	β - <i>cis</i> -Ocimeno	0,17	1036	1032
12	8,39	β - <i>trans</i> -Ocimeno	0,58	1046	1044
13	8,75	τ -Terpineno	0,17	1057	1054
14	9,04	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0,12	1066	1065
15	9,79	Terpinoleno	0,07	1088	1086
16	10,24	Linalol	0,86	1101	1095
17	12,38	Mentona	12,39	1155	1148
18	12,72	<i>iso</i> -Mentona	5,32	1164	1158
19	13,00	Mentol	16,86	1171	1167
20	13,53	<i>neois</i> -Mentol	0,30	1184	1184
22	13,81	α -Terpineol	0,24	1191	1186
23	15,73	Pulegona	0,89	1238	1233
24	15,81	Neral	0,19	1240	1235
25	16,33	Piperitona	0,37	1252	1249
26	16,37	Geraniol	29,27	1253	1249
27	17,06	Geranial	0,43	1270	1264
29	18,12	Acetato de mentila	3,51	1295	1294
32	19,82	Acetato de terpinila	0,21	1336	1346
33	21,38	α -Copaeno	0,10	1374	1374
34	21,88	Acetato de geranila	5,45	1386	1379
35	22,08	β -Elemeno	0,17	1390	1389
37	23,04	α - <i>cis</i> -Bergamoteno	0,15	1414	1411
38	23,20	<i>trans</i> -Cariofileno	4,99	1418	1417
39	24,51	α -Humuleno	0,57	1451	1452
40	24,70	<i>trans</i> - β -Farneceno	0,26	1455	1454
41	24,80	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,85	1458	1458
42	25,62	Germacreno D	0,76	1478	1480
44	26,29	Biciclogermacreno	0,51	1495	1500
45	26,55	γ -Patchouleno	0,21	1502	1502
46	26,76	β -Bisaboleno	0,32	1507	1505
47	27,31	δ -Cadineno	0,26	1521	1522
50	28,79	Butanoato de geranila	0,10	1560	1562
51	29,51	Óxido de cariofileno	0,52	1579	1582

#: número do pico; tR (min): tempo de retenção em minutos; IR cal.: índice de retenção calculado com base em uma série de *n*-alcanos; IR lit.: índice de retenção com base na literatura (ADAMS, 2007)

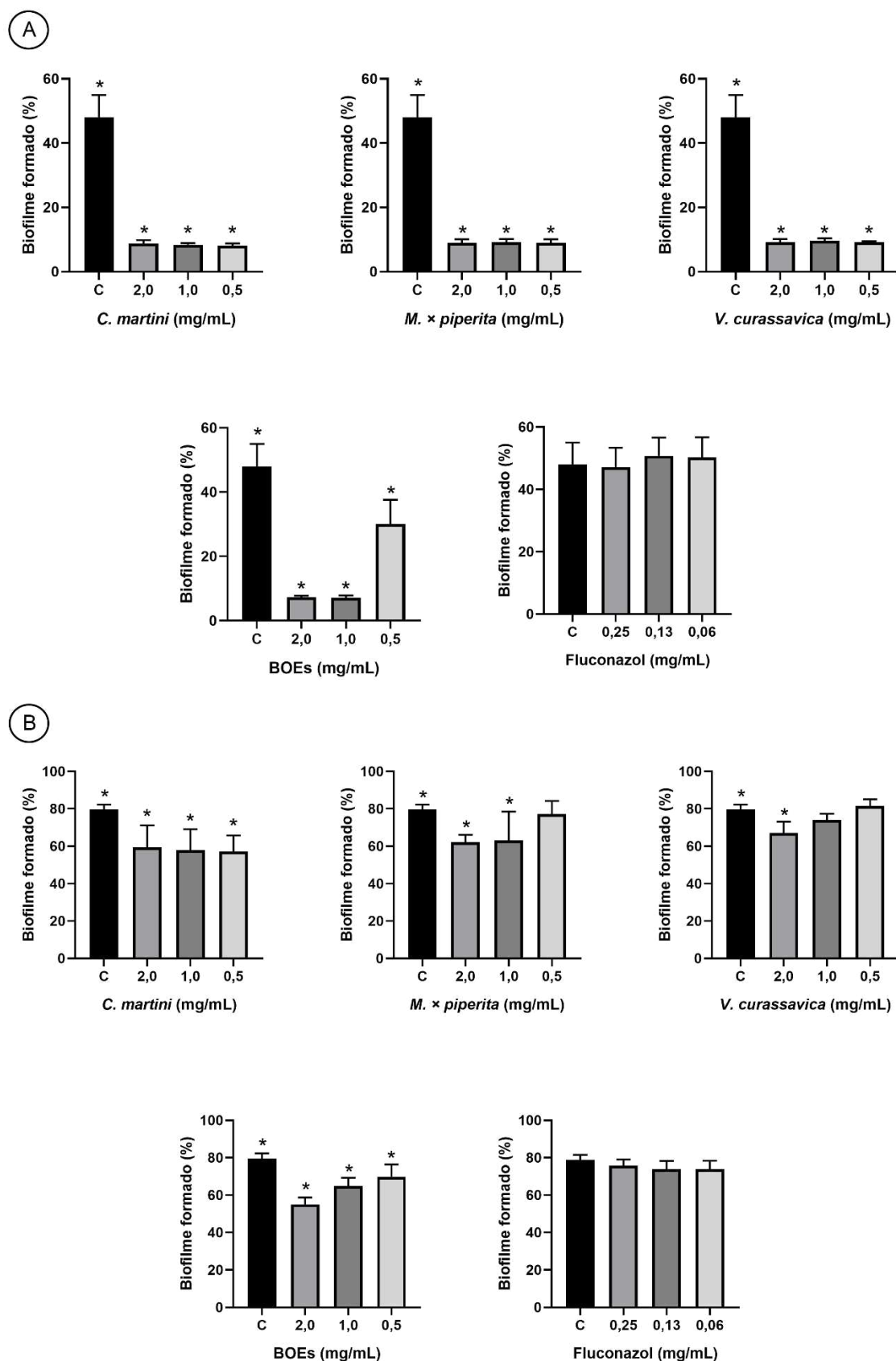


Figura 2. Porcentagem de inibição da formação (A) e erradicação (B) do biofilme de *M. furfur* pelos OEs de *C. martini*, *M. × piperita*, *V. curassavica*, individualmente e na BOEs, em comparação com o fluconazol. Todas as concentrações foram comparadas em relação ao controle (C), ou seja, células sem tratamento com as amostras de OEs/fluconazol. *: diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$).

Nas imagens por MEV (Figura 3) é possível notar que nas condições controle (Figura 3A, B) e tratamento com a BOEs na erradicação do biofilme (Figura 3E), as células mantiveram o seu formato oval ou globoso original. O diâmetro das células parece não ter sofrido alterações notáveis em função destes tratamentos, apresentando um diâmetro médio de $4,9906 \times 10^{-4}$ mm ($\pm 0,07$). No biofilme sem nenhum tratamento (Figura 3B) pode ser observado um aglomerado de células recobertas e unidas umas às outras pela matriz polimérica extracelular.

Os resultados do ensaio de inibição da formação do biofilme na presença da BOEs (Figura 3C) mostram que a quantidade de células foi extremamente reduzida em relação ao controle (Figura 3A, B). São notadas poucas células planctônicas dispersas (Figura 3C, seta) e artefatos oriundos do processamento das amostras (Figura 3C, D, asterisco), além de uma massa amorfa formada, aparentemente, de células e da matriz polimérica extracelular. Apesar da ausência do biofilme no ensaio com fluconazol (Figura 3D), a inibição causada por esse antifúngico não foi significativa (Figura 2A).

Por outro lado, através dos resultados obtidos no ensaio de erradicação do biofilme pode ser visivelmente observado que houve uma redução no número de células no biofilme exposto à presença da BOEs (Figura 3E) em relação ao controle (Figura 3A). Ainda, a quantidade de células observadas no tratamento com a BOEs (Figura 3E) foi visivelmente menor quando comparada com o tratamento com fluconazol (Figura 3F), o que indica que houve maior erradicação do biofilme na presença dos OEs.

Embora o fluconazol tenha reconhecida ação contra a forma planctônica de *M. furfur* (CAFARCHIA et al., 2015; IATTA et al., 2016; SHARMA; RABHA; AHMED, 2017), a estrutura do biofilme é mais resistente à ação de agentes químicos e físicos devido à dificuldade de penetração e difusão através da matriz polimérica extracelular, a forte expressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas capazes de degradar essas moléculas (PARRINO et al., 2019).

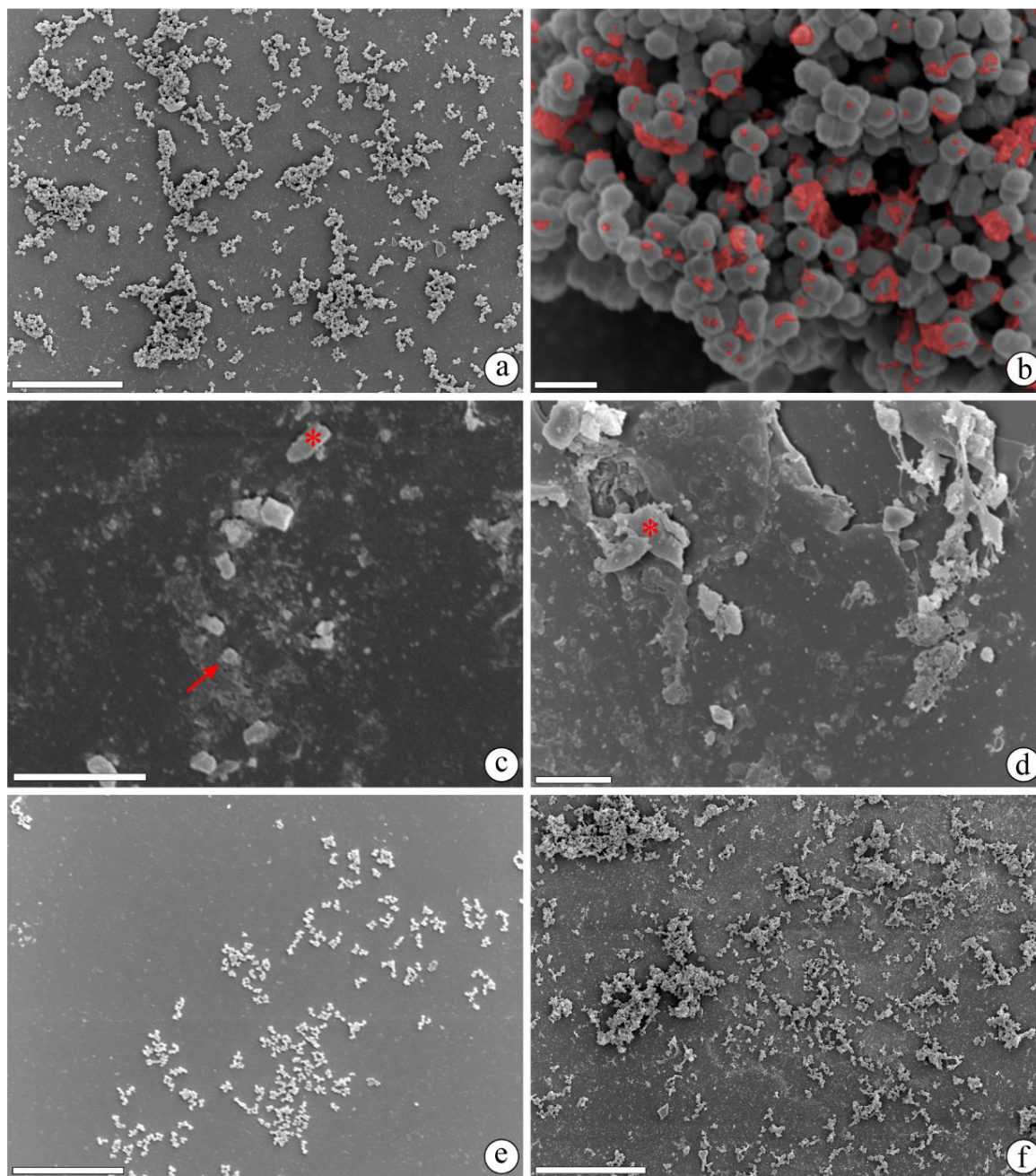


Figura 3. Eletromicrografias de varredura do biofilme de *M. furfur*. Biofilme sem tratamento mostrando diversos aglomerados celulares (A, B) com células unidas e recobertas pela matriz polimérica extracelular (B, colorido artificialmente). Ensaio de inibição do biofilme tratado com a BOEs (C) e com fluconazol (D) evidenciando células planctônicas (seta) em meio a artefatos (asterisco). Ensaio de erradicação do biofilme tratado com a BOEs (E) e com fluconazol (F). Barras: A, E, F = 50 μm ; C, D = 5 μm , B = 2 μm .

Os OEs, por sua vez, apresentam diversas moléculas na sua composição capazes de agir simultaneamente em diferentes estruturas nas células microbianas (SIENKIEWICZ et al., 2017). Isso acontece devido a característica hidrofóbica dos OEs, que permite a interação com a membrana celular do micro-organismo, alterando sua permeabilidade e permitindo a saída de íons e outros conteúdos celulares. Além disso, esses compostos podem atuar lesando a parede

celular, causando alterações mitocondriais, disfunção nos ribossomos, danos ao DNA, dentre outras (ARRUDA et al., 2022; TEIXEIRA; BALBINOT FILHO; BORGES, 2022). Esses diferentes mecanismos e alvos de ação podem incorrer definitivamente na morte celular, diminuindo a resistência microbiana, sendo a ação dos OEs mais vantajosas do que a das drogas sintéticas que atuam, na sua maioria, em apenas um alvo específico nas células. Terapias que promovam a combinação entre antimicrobianos podem evitar o desenvolvimento da resistência, além de melhorar a eficácia do tratamento devido ao seu amplo espectro de ação (DRAGO et al., 2007).

Efeitos na viabilidade celular, capacidade mutagênica e atividade anti-inflamatória

Na análise de viabilidade celular (Figura 4), observa-se que o óleo de *M. × piperita* não afetou a viabilidade de células HaCaT em nenhuma das concentrações testadas (1,0–1000 µg/mL). Já para os OEs de *C. martini* e *V. curassavica*, a perda da viabilidade celular ocorreu apenas na concentração mais alta (1000 µg/mL). Entretanto, quando analisada a BOEs, a viabilidade celular não foi afetada. Em relação a avaliação da mutagenicidade frente a *S. typhimurium* (Tabela 5), as amostras não foram mutagênicas nas condições experimentais.

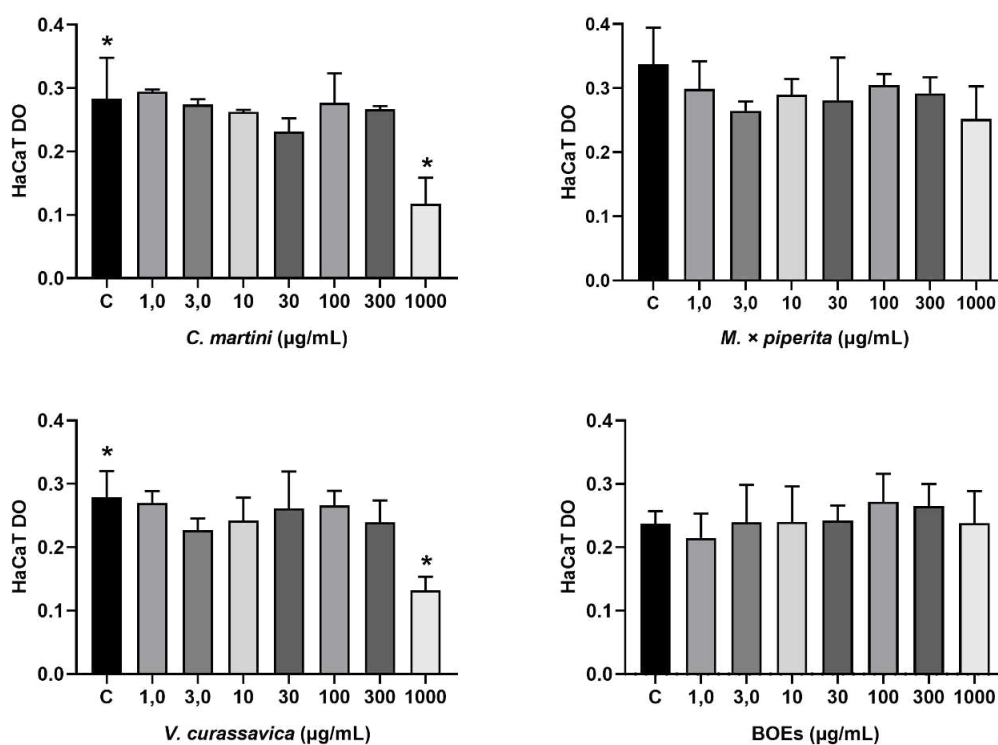


Figura 4. Avaliação da viabilidade celular dos OEs de *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica* e da BOEs em queratinócitos humanos (HaCaT). Todas as concentrações foram comparadas em relação ao controle (C); células sem tratamento com as amostras de OEs. *: diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$).

Tabela 5. Atividade mutagênica expressa através da média e do desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM; valores entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com os OEs de *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica*

Número de revertentes (M ± DP) / placa e IM				
Tratamentos	TA98	TA100	TA102	TA97a
C -	41 ± 8	119 ± 18	316 ± 34	139 ± 12
C +	827 ± 66 ^{a,*}	1039 ± 82 ^{b,*}	1672 ± 101 ^{d,*}	1282 ± 63 ^{c,*}
<i>C. martini</i> (µg/placa)				
6,25	43 ± 6 (1,05)	148 ± 16 (1,24)	313 ± 26 (0,99)	134 ± 18 (0,97)
12,5	40 ± 2 (0,96)	140 ± 13 (1,18)	350 ± 41 (1,11)	154 ± 18 (1,11)
25,0	46 ± 1 (1,11)	119 ± 6 (1,00)	347 ± 37 (1,10)	156 ± 16 (1,13)
37,5	41 ± 4 (0,99)	123 ± 14 (1,03)	365 ± 32 (1,15)	133 ± 13 (0,96)
50,0	36 ± 7 (0,88)	128 ± 8 (1,07)	360 ± 46 (1,14)	131 ± 13 (0,95)
<i>M. × piperita</i> (µg/placa)				
6,25	44 ± 9 (1,07)	128 ± 15 (1,08)	298 ± 12 (0,94)	152 ± 8 (1,09)
12,5	50 ± 1 (1,22)	119 ± 12 (1,00)	321 ± 25 (1,01)	149 ± 13 (1,08)
25,0	41 ± 2 (0,99)	121 ± 26 (1,02)	308 ± 36 (0,97)	136 ± 17 (0,98)
37,5	43 ± 4 (1,04)	119 ± 16 (1,00)	315 ± 29 (1,00)	135 ± 8 (0,97)
50,0	40 ± 7 (0,98)	99 ± 8 (0,83)	255 ± 26 (0,81)	124 ± 9 (0,89)
<i>V. curassavica</i> (µg/placa)				
6,25	37 ± 6 (0,89)	115 ± 7 (0,97)	318 ± 18 (1,01)	129 ± 12 (0,93)
12,5	38 ± 3 (0,91)	98 ± 11 (0,82)	326 ± 25 (1,03)	125 ± 18 (0,90)
25,0	43 ± 4 (1,04)	115 ± 16 (0,97)	305 ± 46 (0,97)	135 ± 6 (0,97)
37,5	40 ± 8 (0,96)	105 ± 10 (0,88)	303 ± 20 (0,96)	120 ± 11 (0,86)
50,0	36 ± 1 (0,87)	92 ± 7 (0,77)	259 ± 34 (0,82)	109 ± 9 (0,79)

* $p < 0,05$ (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; Controle negativo (C-): DMSO 100 µL/placa; Controle positivo (C +): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a); ^bAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102)

As análises de viabilidade celular de células HaCaT e de mutagenicidade frente a *S. typhimurium* mostraram que os OEs utilizados não apresentaram propriedades que reduzam a viabilidade celular ou que promovam mutações. No caso dos agentes antifúngicos recomenda-se, idealmente, que estes apresentem certas características como ter o mínimo de efeitos adversos, apresentar atividade de amplo espectro contra diferentes fungos, ter preferencialmente um efeito fungicida, entre outros (CUI et al., 2022). Em geral, as doses efetivas dos OEs apresentam uma janela terapêutica segura em humanos e agem de forma diferente dos antifúngicos convencionais (VENTUROSIO et al., 2011).

A viabilidade para os BMDMs também não foi afetada pelos OEs (Figura 5). O OE de *C. martini* diminuiu significativamente os níveis de TNF- α , contudo os OEs de *M. × piperita* e *V. curassavica* não apresentaram nenhum efeito para esse modelo. Quanto a atividade da BOEs, também foi verificada uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α . Ou seja,

mesmo com diferentes atividades, quando analisada a BOEs eles não apresentaram um efeito antagônico. Não houve redução nos níveis de IL-8 pela BOEs (Figura 6).

O TNF- α é uma das principais citocinas presente nos processos inflamatórios, atuando na resposta imune e na manutenção da homeostase celular. Essa citocina também é responsável por regular a sinalização envolvida no processo de sobrevivência e/ou morte celular (BLASER et al., 2016). Durante a inflamação, o TNF- α é liberado e estimula a resposta imune através do recrutamento e posterior ativação de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação (VITALE; RIBEIRO, 2007). No processo de apoptose celular, essa citocina pode vir a ser uma estratégia para o tratamento do câncer devido a sua seletividade em induzir a apoptose em células tumorais primárias, sem afetar as células normais adjacentes (NAIMI et al., 2018). A inflamação por *Malassezia* spp. é causada pela produção de fosfolipases pela levedura, que provocam a liberação de ácido araquidônico pelas células epiteliais gerando uma ação irritante na pele (BEN SALAH et al., 2010). Além disso, as lipases têm a função de incorporar ácidos graxos à membrana de *Malassezia* spp. promovendo a criação de uma parede celular hidrofóbica que facilita a adesão e o desenvolvimento de biofilme (PINTAS; QUAVE, 2019). Esse processo desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α (DOLENC-VOLJČ, 2017). Especificamente sobre *M. furfur*, há relatos da indução da formação *in vitro* de citocinas como IL-6 (ZHANG et al., 2019), IL-8 (SUZUKI et al., 2000), IL-10 e TNF- α (HAU et al., 2015) na presença deste micro-organismo.

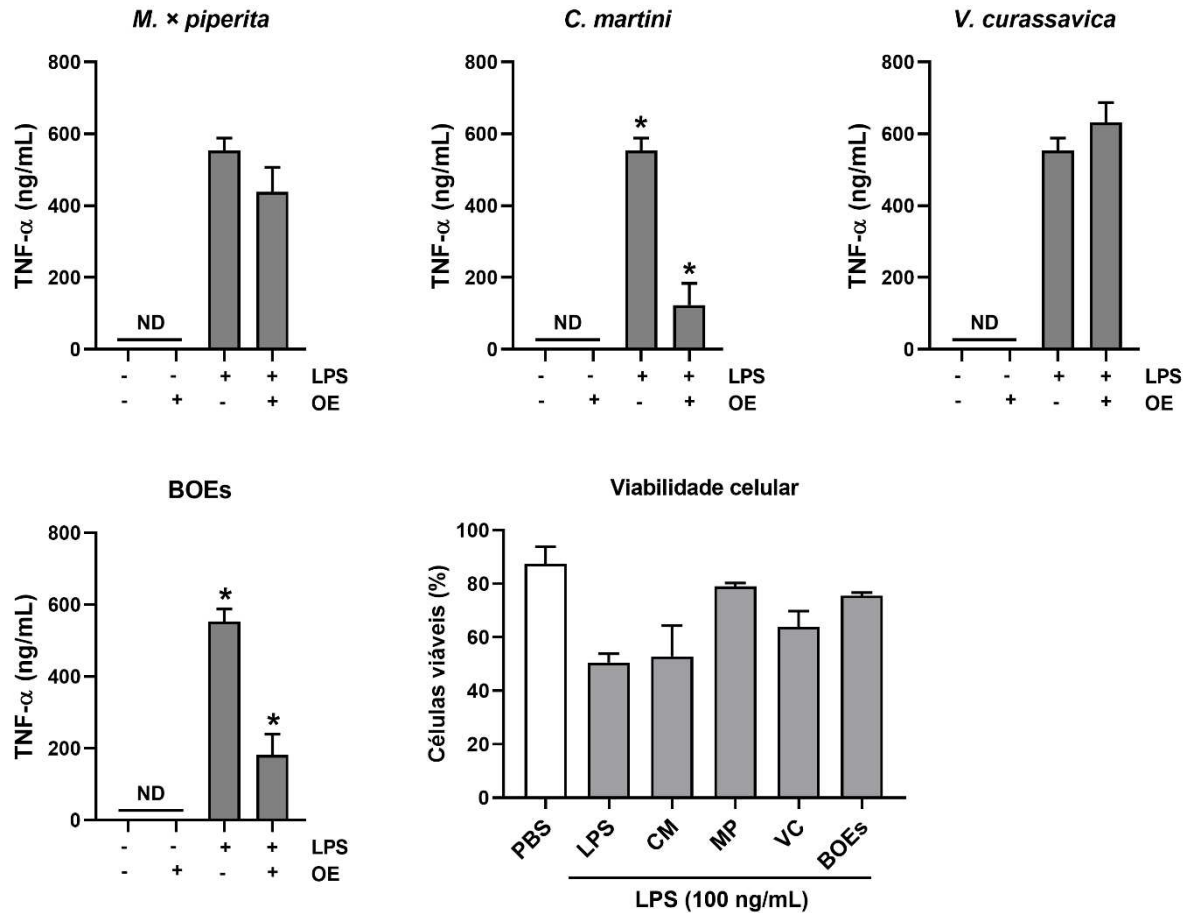


Figura 5. Efeito dos OEs de *C. martini* (CM), *M. x piperita* (MP), *V. curassavica* (VC) e da BOEs (200 ng/mL) na viabilidade celular e na redução da concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), após 6 h da indução por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). Controle negativo: PBS (solução salina tamponada com fosfato). *: diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$); +: presença e -: ausência da substância em questão.

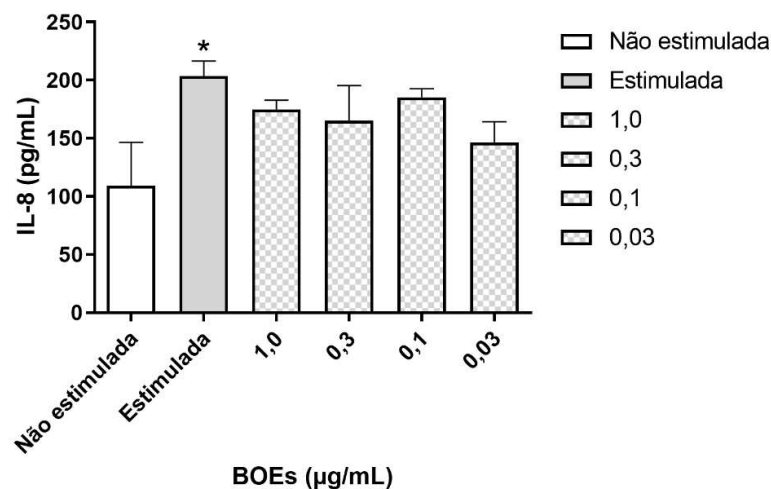


Figura 6. Efeito da BOEs na redução da concentração de IL-8 em células HaCaT após 24 h de exposição a TNF- α e INF- γ . Todas as concentrações foram comparadas em relação às células não estimuladas. *: diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$).

Alguns estudos relatam a atividade anti-inflamatória do geraniol contra citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α (CHEN; VILJOEN, 2022). No trabalho desenvolvido por Andrade *et al.* (2014) o OE de *C. martini* também não apresentou efeitos citotóxicos nos monócitos humanos e, embora não tenha apresentado efeitos sobre os níveis de TNF- α , o geraniol teve uma ação anti-inflamatória, aumentando a produção de IL-10. De acordo com os mesmos autores, o geraniol parece ser o responsável pela atividade imunomoduladora do OE de *C. martini*. A atividade anti-inflamatória de *M. $\times$ piperita* sob o TNF- α é relatada tanto no extrato etanólico (LI *et al.*, 2017) quanto no OE (MODARRESI; FARAHPOUR; BARADARAN, 2019). Os compostos majoritários mentol (ROZZA *et al.*, 2021) e mentona (CHENG *et al.*, 2008; SU; LIN, 2022) têm sido relacionados como moduladores da resposta inflamatória. Embora *V. curassavica* não tenha diminuído significativamente a concentração de TNF- α , de acordo com a literatura a atividade anti-inflamatória do OE provém da ação conjunta de α -Humuleno e seus isômeros (BASTING *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2021; MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021; PASSOS *et al.*, 2007; PIMENTEL *et al.*, 2012). Provavelmente, a amostra utilizada tenha uma menor concentração desses compostos e, conseqüentemente, a atividade anti-inflamatória não tenha sido significativamente expressiva. No estudo desenvolvido por Basting *et al.* (2019), o teor de *trans*-Cariofileno e α -Humuleno no OE de *V. curassavica* foi de, respectivamente, 4,03% e 1,23% comparados a 3,69% e 0,63% no presente estudo.

Embora não tenha sido observado efeito da BOEs nos níveis de IL-8 no modelo empregado, a literatura também mostra o efeito do α -Humuleno (VIVEIROS *et al.*, 2022), geraniol (EL AZAB *et al.*, 2022; FU *et al.*, 2022) e mentol (MAGOUZ *et al.*, 2021) sobre essa citocina. Os relatos da ação de *C. martini* (OLIVEIRA *et al.*, 2021; TSAI *et al.*, 2011) e *M. $\times$ piperita* (KIM; PARK; YANG, 2020; TAFRIHI *et al.*, 2021) na redução de IL-8 são reportados tanto para a forma de extrato quanto no OE.

Conclusões

De um total de 40 OEs estudados, os óleos de *C. martini* e *M. $\times$ piperita* foram selecionados em função da melhor atividade anti-*M. furfur* para compor a BOEs, juntamente com o OE de *V. curassavica*. A inclusão do OE de *V. curassavica* como anti-inflamatório não alterou a atividade antifúngica da BOEs, o que é importante frente à necessidade de tratamento concomitante da inflamação causada pela *M. furfur*. A ação da BOEs sobre a forma planctônica e sobre o biofilme de *M. furfur*, foi superior à do fluconazol. De acordo com as análises de MEV foi possível observar que as células de *M. furfur* tratadas com a BOEs mantiveram sua

morfologia, contudo, houve uma redução no número de células do biofilme nessas condições. As análises de viabilidade celular frente a HaCaT e BMDMs e de mutagenicidade frente a *S. typhimurium* mostraram que os OEs, tanto isoladamente quanto em mistura, não interferiram na viabilidade celular dessas linhagens celulares e não apresentaram citotoxicidade. Embora o OE de *V. curassavica* não tenha reduzido os níveis de TNF- α , quando analisada a BOEs foi verificada atividade anti-inflamatória, demonstrando que os mesmos podem ser utilizados em conjunto. Observado os efeitos antifúngico, anti-inflamatório e a segurança para as linhagens celulares testadas, a BOEs proposta apresenta bom potencial para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas visando o tratamento da dermatite seborreica.

Capítulo 2

Formulações tópicas contendo óleos essenciais: uma alternativa “verde” para o tratamento da dermatite seborreica

Resumo

A busca por produtos livres de conservantes sintéticos vem crescendo consideravelmente nos últimos anos devido à demanda dos consumidores por produtos naturais que não sejam prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. A dermatite seborreica é uma doença sem cura e seu tratamento busca a diminuição dos sintomas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar a estabilidade de um gel, uma loção e um xampu elaborados com uma blenda de óleos essenciais (BOEs) e sem a adição de parabenos, visando o tratamento da dermatite seborreica. A composição química da BOEs, composta pelos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson, *Mentha × piperita* L. e *Varronia curassavica* Jacq., foi avaliada por CCD e CG-EM. Durante o estudo preliminar da estabilidade, a loção apresentou separação de fases e não foi avaliada quanto à estabilidade acelerada. As características organolépticas, separação de fases, pH e espalhabilidade do gel permaneceram inalteradas durante o estudo. Para o xampu os resultados foram semelhantes, contudo, houve um leve escurecimento da amostra acondicionada em câmara climática após 90 dias. A viscosidade do xampu variou de 1000 a 3800 cP no estudo de estabilidade, ficando um pouco abaixo dos valores referentes a produtos comerciais. Os marcadores da BOEs (geraniol, mentol e *trans*-Cariofileno) se mantiveram presentes e sem variações durante todo o estudo, em ambas as formulações. Através do *Challenge test* foi observado que a BOEs conferiu propriedades conservantes aos produtos, uma vez que apresentou atividade contra micro-organismos de importância em sistemas conservantes de formulações. Os resultados mostraram que o gel e o xampu desenvolvidos com a BOEs apresentaram estabilidade durante todo o prazo de validade e serão, oportunamente, avaliadas *in vivo*.

Palavras-chave: fitoterápicos, gel, xampu, *Challenge test*, óleos essenciais

Introdução

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos vem se mostrando uma alternativa promissora para o tratamento de diversas doenças. Fatores como o valor econômico (HUGHES et al., 2015) e a menor incidência de efeitos colaterais, quando comparados aos medicamentos sintéticos (NISAR; SULTAN; RUBAB, 2018), promovem a adesão da população a essa prática terapêutica. No entanto, é importante ressaltar que, assim como os medicamentos sintéticos, a produção de medicamentos fitoterápicos deve seguir rigorosos controles de qualidade, visando garantir a eficácia e segurança do produto final (BALEKUNDRI; MANNUR, 2020).

O uso de plantas medicinais é uma prática sustentável, já que sua produção não gera poluentes e muitas vezes pode ser feita por meio de agricultura familiar, beneficiando assim a economia local (SINGH et al., 2022). Os óleos essenciais (OEs) são uma classe de compostos naturais extraídas de plantas aromáticas e se destacam devido as suas diversas propriedades terapêuticas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Além disso, essas substâncias podem também ser empregadas como conservantes em formulações cosméticas. Atualmente, existe um estímulo para a adição de produtos naturais em cosméticos, visto que esses produtos podem ser uma opção segura para os consumidores e o meio ambiente, em comparação aos parabenos (NOWAK; JABŁOŃSKA; RATAJCZAK-WRONA, 2021). Os parabenos são ésteres do ácido *para*-hidroxibenzóico, com um grupo alquil (metil, etil, propil, butil ou heptil) ou grupo benzilo e são comumente utilizados como conservantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (HAMAN et al., 2015).

Doenças como a dermatite seborreica podem ser um alvo de estudos para os medicamentos fitoterápicos, uma vez que as opções terapêuticas disponíveis objetivam a diminuição dos sintomas e de novos estados de remissão da doença (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2013). A dermatite seborreica é caracterizada por uma doença inflamatória crônica da pele ocasionada por leveduras do gênero *Malassezia* com destaque para *M. furfur*, espécie considerada, em associação com outros fatores, o agente etiológico dessa patologia (CURI, 2022).

As formulações fitoterápicas desenvolvidas para o tratamento da dermatite seborreica incluem xampus (SHREYA; KALPANA, 2018; WUTHI-UDOMLERT et al., 2011), loções (KHOSRAVI et al., 2009) e cremes (LERTSATITTHANAKORN et al., 2017) podendo, eventualmente, estar em associação com antimicrobianos tradicionais (SIVASANKAR et al., 2017). Atualmente, o piritionato de zinco tem sido o antifúngico mais comum para incorporação em formulações tópicas (MANGION et al., 2023). Em relação aos produtos fitoterápicos,

espécies de *Cymbopogon* spp. (CARMO et al., 2013; CHAISRIPIPAT; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2015; LERTSATITTHANAKORN et al., 2017; WUTHI-UDOMLERT et al., 2011) e *Mentha* spp. (NARDONI et al., 2014; VU et al., 2021) têm sido relatadas como efetivas no controle da dermatite seborreica e na estimulação do crescimento do cabelo (OH; PARK; KIM, 2014; PRASAD et al., 2009). Assim, o presente estudo teve como objetivos desenvolver e avaliar a estabilidade de um gel, uma loção e um xampu formulados com uma blenda de óleos essenciais (BOEs) e livre de parabenos para o tratamento da dermatite seborreica.

Material e Métodos

Desenvolvimento farmacotécnico das formulações

Aplicação da BOEs como princípio ativo e conservante

A BOEs foi incorporada em formulações base de gel, loção e xampu na concentração mínima inibitória determinada em ensaios anteriores, ou seja, 2,0 mg/mL. A partir desse valor foi preparada uma mistura à 1,0% m/m contendo 45% dos OEs de *Cymbopogon martini* (Roxb.) Will. Watson, *Mentha × piperita* L. e 10% do OE de *Varronia curassavica* Jacq.

Gel hidroalcoólico

O gel hidroalcoólico (Tabela 1) foi produzido por dispersão da “Fase B” nos componentes da “Fase A” previamente misturados com a BOEs. Após total incorporação, o gel permaneceu em repouso até a completa dispersão do polímero (cerca de 24 h). Passado esse período, o pH foi medido, corrigido para pH 6,0 com solução aquosa de trietanolamina (50%) quando necessário e envasado em frascos plásticos opacos. É recomendado que o pH dos géis estejam próximos da neutralidade, na faixa de pH 5,5–6,5 (BRASIL, 2011). Em seguida, o gel foi envasado em frascos plásticos opacos.

Tabela 1. Composição do gel hidroalcoólico

	Componente	Função	Concentração (%)
BOEs	<i>C. martini</i> , <i>M. × piperita</i> e <i>V. curassavica</i>	Princípio ativo	1,0
Fase A	EDTA dissódico	Quelante	0,1
	Glicerina	Hidratante	5,0
	Álcool etílico 70%	Solvente	qsp
Fase B	Carbômero 980	Espessante	1,0
Fase C	Trietanolamina 50%	Ajuste de pH	0,6

qsp = para 100 g

Loção-creme

Para a produção da loção-creme (Tabela 2) os componentes da fase oleosa foram aquecidos a 75 °C e os da fase aquosa a 80 °C. Após completa solubilização, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sendo a mistura homogeneizada até resfriamento (± 25 °C). Após atingir a temperatura ambiente, a BOEs foi adicionada à formulação e o pH corrigido para pH 6,0 (BRASIL, 2011) com solução aquosa de trietanolamina (50%). Em seguida, a loção foi envasada em frascos plásticos opacos.

Tabela 2. Composição da loção-creme

	Componente	Função	Concentração (%)
BOEs	<i>C. martini</i> , <i>M. × piperita</i> e <i>V. curassavica</i>	Princípio ativo	1,0
Fase oleosa	Ácido esteárico	Surfactante	4,8
	Álcool cetílico	Emulsificante	1,2
	Miristato de isopropila	Lubrificante	2,0
	Vitamina E	Antioxidante	0,16
Fase aquosa	EDTA dissódico	Quelante	0,04
	Propilenoglicol	Emoliente	0,4
	Trietanolamina	Ajuste do pH	0,3
	Água destilada	Solvente	qsp

qsp = para 100 g

Xampu

O xampu foi preparado através da mistura dos ingredientes da “Fase A” aos componentes da “Fase B” (Tabela 3), com agitação lenta. A “Fase C” foi aquecida a 50 °C até completa fusão, e foi então adicionada à mistura anterior. Após resfriamento, a BOEs foi adicionada à mistura com homogeneização até total incorporação. O xampu foi deixado em repouso por alguns minutos e o pH foi corrigido com solução aquosa de trietanolamina (50%) até próximo da neutralidade (pH 5,5–6,5) (BRASIL, 2011). Em seguida, o xampu foi envasado em frascos plásticos opacos.

Tabela 3. Composição do xampu

	Componente	Função	Concentração (%)
BOEs	<i>C. martini</i> , <i>M. × piperita</i> e <i>V. curassavica</i>	Princípio ativo	1,0
Fase A	EDTA dissódico	Quelante	0,1
	Água purificada	Solvente	qsp
Fase B	Lauril éter sulfato de sódio	Tensoativo	35,0
	Cocoamidopropil betaína	Tensoativo	4,0
Fase C	Lauril glicosídeo	Surfactante	5,0

qsp = para 100 g

Avaliação da estabilidade preliminar

Amostras de gel, loção e xampu foram armazenadas em estufa (40 °C) e em geladeira (± 8 °C) por um período de 15 dias e em ciclos alternados de 24 h com aquecimento em estufa (50 °C) e resfriamento em freezer (± 6 °C) por 12 dias (6 ciclos) (BRASIL, 2008). Como parâmetros, foram avaliadas as características organolépticas, o pH e a espalhabilidade (gel e loção). Todos os testes iniciais foram realizados 24 h após o preparo das formulações em triplicata.

Avaliação da estabilidade acelerada

Os testes foram conduzidos em condições que aceleram mudanças que podem ocorrer na estabilidade dos produtos, afim de determinar o tempo de vida útil das formulações. Os parâmetros selecionados foram avaliados em um prazo de 90 dias em intervalos de 30 dias (t0, t30, t60 e t90 dias). As amostras foram fracionadas em frascos transparentes (BRASIL, 2005) e armazenadas nas seguintes condições: em geladeira (± 8 °C), sob iluminação (lâmpada LED branca; 11W), em temperatura ambiente (± 25 °C) e em câmara climática (40 °C; 75% umidade) (BRASIL, 2008). Foram avaliadas as características organolépticas, centrifugação, pH, espalhabilidade (gel), viscosidade (xampu) e o teor da BOEs.

Parâmetros avaliados durante o estudo da estabilidade acelerada

Os ensaios de avaliação físico-química foram realizados de acordo com as recomendações contidas nos compêndios farmacêuticos (BRASIL, 2004, 2008, 2011, 2019a). Todas as análises, incluindo as que não foram feitas durante o estudo de estabilidade, foram realizadas com as formulações e com seus respectivos controles (formulação sem a adição da BOEs).

1. Características organolépticas

Foram observados visualmente o aspecto, cor e odor das amostras, afim de verificar se essas características permaneciam íntegras ao longo de todo o estudo.

2. Centrifugação

Um total de 500 mg das amostras formuladas foram pesadas em tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 10000 rpm, durante 15 min a 25 °C (centrífuga refrigerada Hettich® - Rotina 420R). Após a centrifugação, as amostras foram observadas visualmente para verificar se havia precipitação e/ou separação de fases.

3. *pH*

O pH foi determinado por método potenciométrico, após aferição do eletrodo de um pHmetro digital com as soluções tampão de referência. Para a análise, as amostras foram diluídas na proporção 1:10 com água destilada em tubos de centrífuga.

4. *Espalhabilidade*

Em uma folha de papel milimetrado foram traçados os lados de uma lâmina de vidro para microscopia (26 × 76 mm) e as diagonais do retângulo formado, a fim de indicar o ponto central. Com a lâmina posicionada sob esse desenho, aproximadamente 25 mg do gel formulado com a BOEs foram colocados no centro da lâmina, que foi coberta por outra lâmina ($\cong$ 5 g) do mesmo tamanho e o diâmetro foi anotado. Após 1 min, foram adicionados diferentes pesos sobre a lâmina de 2 g, 5 g, 10 g e 20 g que foram trocados sucessivamente a cada 1 min, sendo anotados cada um dos diâmetros da circunferência. A espalhabilidade do gel foi calculada a partir da média dos raios obtidos, através da fórmula de cálculo de área do círculo: $A = \pi \times r^2$ onde A: área, π : pi ($\cong$ 3,14) e r: raio.

5. *Viscosidade*

As análises da viscosidade do xampu formulado com a BOEs foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica e Cuidado em Saúde (LAFATECS) da FCF/UNICAMP.

A viscosidade foi avaliada em viscosímetro rotativo (Brookfield, modelo LV-T), com rotação de 1,5 rpm por 30 seg usando o *spindle* número 62. O *spindle* foi mergulhado diagonalmente na amostra ($\cong$ 15 mL em tubo de centrífuga) até a marca da haste, com ausência de bolhas e sem que o *spindle* encostasse na parede do tubo. A leitura da viscosidade foi realizada a temperatura ambiente (25 °C) e o resultado foi expresso em centipoise (cP).

6. *Análise quantitativa dos marcadores da BOEs por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)*

Em um tubo de centrífuga foi pesado 1,0 g das amostras do gel formulado com a BOEs, as quais foram diluídas em uma solução com 2,0 mL de água destilada e adicionados 2,0 mL de hexano para extração líquido-líquido. A mistura foi colocada no vortex durante 1 min. Após a partição dos solventes, a porção hexânica foi recolhida e transferida para um balão volumétrico de 5 mL. O processo foi repetido mais uma vez e 2 mL de hexano foram acrescentados à fase aquosa. Ao final da análise, o balão volumétrico foi avolumado com

hexano e a amostra foi analisada por CG-EM. A validação do método analítico para quantificação dos ativos da formulação foi realizada e está descrita no “Apêndice D”.

A quantificação dos marcadores nos extratos foi realizada por padronização externa através das análises de CG-EM em um cromatógrafo Agilent 6890, com detector de massas 5975, injetor automático 7683B acoplado a uma coluna capilar HP5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25µm). As condições de análise foram temperatura do injetor a 220 °C, detector a 250 °C, coluna a 60 °C, (3 °C/min.) até 240 °C; gás de arraste (He super seco) a 1,0 mL/min.

7. Análise qualitativa dos marcadores da BOEs

7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O ensaio por CCD foi escolhido como teste de identificação por ser um ensaio de simples execução, rápido, de baixo custo e que não requerer instrumentação especial. Além disso, essa análise é extensivamente empregada em análises qualitativas (identificação) nas Farmacopeias vigentes (BRASIL, 2019a).

Para verificar a efetividade do processo, os extratos foram analisados previamente por CCD, utilizando-se cromatoplasas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Foram aplicados 20 µL de cada extrato em banda com o auxílio de uma microseringa de 10 µL. As placas foram eluídas com diclorometano, observadas em luz UV a 254 nm seguida de aplicação de solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 100:2:1 v/v/v) com aquecimento em estufa Orion modelo 515 a 100 °C por 5 min (WAGNER; BLADT, 1996). A Figura 1 apresenta a cromatoplasa já revelada contendo algumas substâncias a serem avaliadas como possíveis marcadoras, os OEs utilizados e a BOEs.

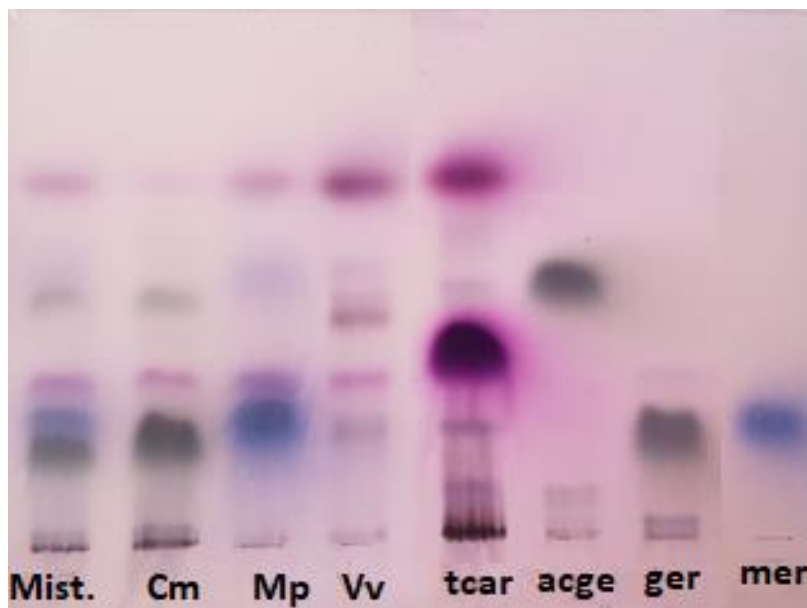


Figura 1. Cromatoplate contendo a BOEs (Mist.), os OEs de *C. martini* (Cm), *M. × piperita* (Mp), *V. curassavica* (Vv) e os compostos *trans*-Cariofileno (tcar), acetato de geranila (acge), geraniol (ger) e mentol (men). Fase móvel: diclorometano; fase estacionária: sílica gel 60 F254; revelador: anisaldeído.

7.2 Headspace

Cerca de 10 mL das amostras de xampu ($\cong 9,48$ g) foram pesados em frascos de 38 mL, com 10 mL de solução saturada de NaCl. Os frascos foram devidamente vedados e aquecidos em banho-maria a 80 °C, sob agitação, por 40 min. Após este período, 1,0 mL do *headspace* foi injetado no CG-EM. As condições analíticas do equipamento foram as mesmas descritas anteriormente.

Índice de formação da espuma do xampu

A formação de espuma foi determinada a partir de uma solução de 10 mL de água destilada com 10 mL de xampu. As amostras foram colocadas em tubos de centrifuga e centrifugadas por 1 min a 24.000 rpm. Foi realizada a medição da altura de espuma com uma régua no tempo inicial e após 5 e 10 min de repouso da solução.

Densidade do xampu

Para determinação da densidade do xampu foi utilizado um picnômetro de vidro que foi pesado vazio e, em seguida, pesado após a adição de água destilada. O xampu foi colocado no picnômetro com cuidado para não ocorrer formação de bolhas e, depois de seco, foi novamente pesado. A determinação da densidade (d) foi calculada através da fórmula: $d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$ onde: M_0 = massa do picnômetro vazio (g); M_1 = massa do picnômetro com água purificada (g) e M_2 = massa do picnômetro com a amostra (g).

Teste de eficácia do sistema conservante (“Challenge test”)

Os micro-organismos *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram cultivados e incubados conforme as recomendações da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019a). Passado o período de incubação, 50 g das formulações foram pesados em frascos estéreis e inoculados com alíquotas correspondentes a uma concentração final de células entre 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia). Os frascos de cada uma das amostras foram homogeneizados e incubados na temperatura adequada para cada micro-organismo. Após a inoculação, alíquotas foram retiradas em cinco momentos distintos, ou seja, nos tempos t0, t7, t14, t21 e t28 dias, diluídas e semeadas em placas para contagem. Conforme preconiza a legislação (BRASIL, 2010), para formulações tópicas é recomendado que as bactérias tenham redução ≥ 2 logs até a contagem do 14º dia em relação ao t0 e que não ocorra aumento na contagem de 28 dias em relação 14º dia. Para as leveduras, não deve haver aumento na contagem com 14, 21 e 28 dias quando comparado ao t0.

Análise estatística

Os resultados foram comparados usando o teste *t* de Student e ANOVA considerando o nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism 8.0.

Resultados e Discussão

Estabilidade preliminar das formulações

A primeira etapa do estudo de estabilidade preliminar mostrou que as características organolépticas (cor, aspecto e odor) e o pH do gel (Figura 2A) e do xampu (Figura 2C) mantiveram-se sem alterações. A espalhabilidade do gel (Figura 2D) também se manteve estável ao longo de todo o estudo, aumentando proporcionalmente à adição dos pesos.

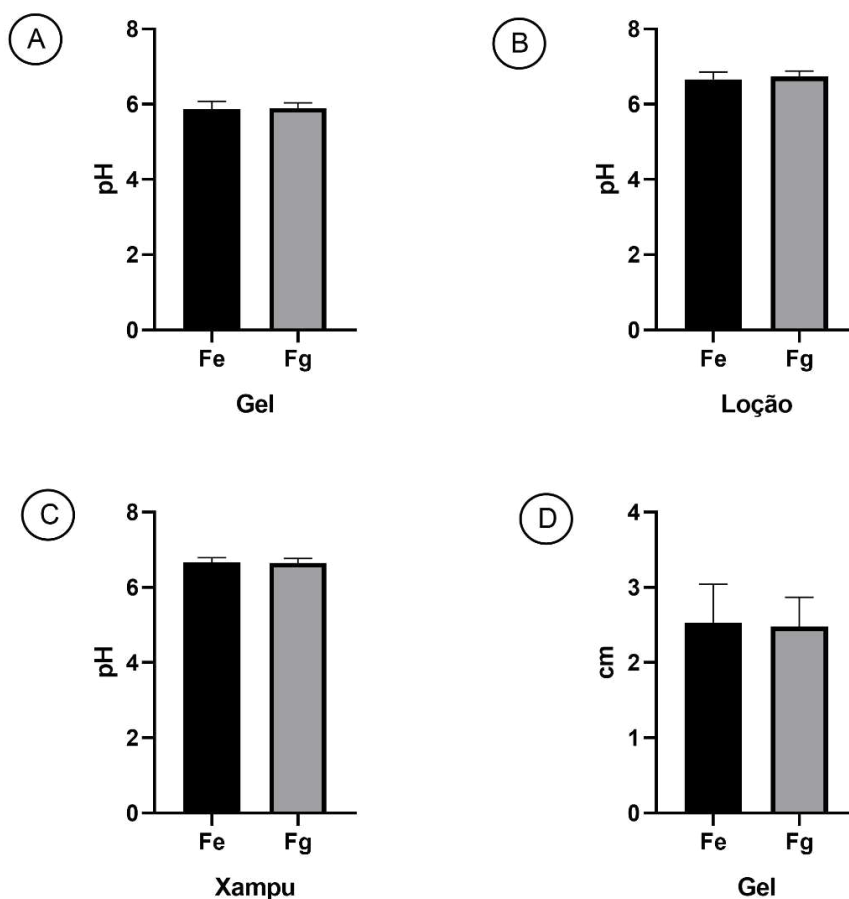


Figura 2. Variação do pH (A–C) e da espalhabilidade (D) das formulações que foram submetidas a aquecimento em estufa (Fe) e resfriamento em geladeira (Fg) durante o teste de estabilidade preliminar. *: diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Quanto à loção, esta apresentou instabilidade ao longo do estudo. Embora a coloração e o odor não tenham sofrido alterações, o aspecto foi intensamente modificado a partir do segundo dia de estudo. A loção passou a apresentar um aspecto mais líquido em relação a seu aspecto original, permanecendo dessa forma até o sexto dia. Foi observado a separação de fases (Figura 3A), caracterizada pela separação da BOEs na superfície da formulação (Figura 3B, asterisco). A separação de fases da loção afetou diretamente sua espalhabilidade, que não pôde ser mensurada. Porém, não houve alterações nas medidas de pH das amostras (Figura 2B). Os resultados foram idênticos para todas as formulações na etapa realizada em ciclos de aquecimento/congelamento (Tabela 4). Em vista desses resultados, a loção não foi incluída nos estudos de estabilidade acelerada. Além disso, o gel pode ser empregado com a mesma finalidade que a loção. A análise prévia da estabilidade tem como objetivo verificar possíveis incompatibilidades dos componentes da formulação através do emprego de variações extremas de temperatura por um curto prazo (BRASIL, 2008). Essa avaliação é imprescindível, visto que,

embora não estime a vida útil do produto, é uma análise fundamental na triagem e eventual correção das incompatibilidades que possam ocorrer na formulação (CASTELI et al., 2008).

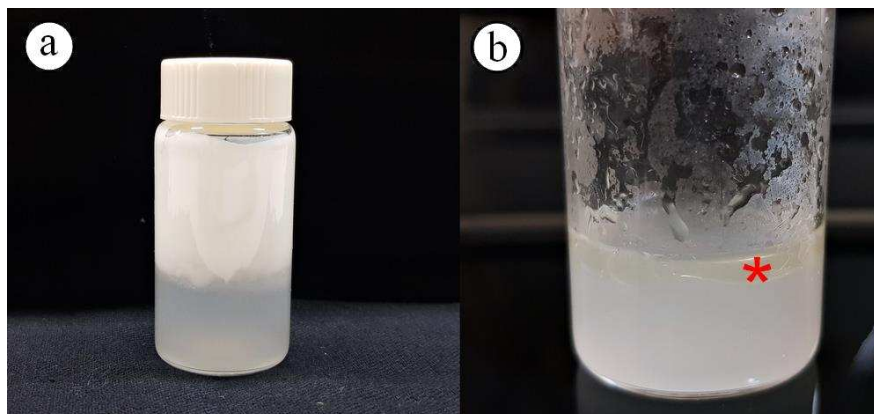


Figura 3. Comportamento da loção-creme durante o estudo da estabilidade preliminar. Formulação após o sexto dia de estudo evidenciando separação de fases (A) com consequente separação da BOEs da formulação (B, asterisco).

Tabela 4. Avaliação das formulações que foram submetidas a ciclos de aquecimento/congelamento durante o estudo da estabilidade preliminar

	Características organolépticas	pH	Espalhabilidade
Gel	Sem alteração de cor, aspecto e odor	5,69 ± 0,04	2,57 ± 0,2 cm
Loção	Sem alteração de cor e odor, aspecto intensamente modificado	6,62 ± 0,06	—
Xampu	Sem alteração de cor, aspecto e odor	6,23 ± 0,09	—

M ± DP: média e desvio padrão

Caracterização química da BOEs

Em termos analíticos, o trabalho envolvendo OEs é mais complexo do que a utilização de um composto padrão, pois o OE em si é uma mistura complexa de vários constituintes químicos entre os quais vários isômeros (LIANG et al., 2023). Neste estudo, a complexidade atingiu patamares maiores porque envolveu não apenas um OE, mas sim uma mistura de três OEs para atingir sua eficácia terapêutica. Portanto, para monitoramento da estabilidade química das formulações desenvolvidas era imprescindível o estabelecimento de marcadores que evidenciassem a presença dos OEs envolvidos, ou seja, *C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica*.

O ideal é considerar como marcadores químicos as substâncias responsáveis pela atividade terapêutica do OE, mas isto nem sempre é possível, considerando a complexidade destas misturas que compõem cada OE e o possível sinergismo destas substâncias (LANGEVELD; VELDHUIZEN; BURT, 2014). Neste estudo, sabe-se que os marcadores ativos da atividade anti-inflamatória do OE de *V. curassavica* são o *trans*-Cariofileno e o α -

Humuleno (BASTING et al., 2019; FERNANDES et al., 2007; LEITE et al., 2021; MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021; PIMENTEL et al., 2012). Entretanto, para os demais OEs, foram considerados marcadores os compostos característicos presentes em maior intensidade nos cromatogramas obtidos por CG-EM.

A análise individual dos OEs por CG-EM (ver Capítulo 1) mostrou que os compostos mais abundantes no óleo essencial de *C. martini* foi o geraniol (79,12% em área) e o acetato de geranila (10,12% em área). Para a *M. × piperita*, o mentol foi o principal constituinte (64,71% em área) e para *V. curassavica* sabe-se que seus marcadores ativos são o *trans*-Cariofileno e o α -Humuleno, porém com intensidade de pico muito baixa (< 0,6% em área). Sequencialmente a análise em CG-EM, foi desenvolvida uma CCD com o objetivo de verificar se os marcadores selecionados (mentol, geraniol, acetato de geranila e *trans*-Cariofileno) eram detectáveis na BOEs utilizada. Os compostos presentes na BOEs podem ser observados no Capítulo 1.

Análise das formulações

Análise por CCD

A análise cromatográfica por CCD permitiu a identificação de pelo menos um marcador de cada OE, podendo ser empregado como um teste de identificação para avaliar a presença dos principais marcadores no princípio ativo das formulações (BOEs). Como observado anteriormente, a BOEs mostra claramente (em ordem ascendente) a presença de uma banda verde correspondente ao geraniol (marcador do OE de *C. martini*), uma banda azul correspondente ao mentol (marcador do OE de *M. × piperita*) e uma mancha rosa correspondente ao *trans*-Cariofileno. O *trans*-Cariofileno é um composto presente no OE de *V. curassavica*, porém encontra-se presente também nos outros OEs. Dessa forma, sua banda na BOEs corresponde à soma da concentração de *trans*-Cariofileno presente nos três OEs. O α -Humuleno não pode ser monitorado devido à sua baixa concentração (0,63% em área) no OE de *V. curassavica* e na BOEs, a qual é formulada com apenas 10% deste OE. Para *C. martini*, tanto o geraniol quanto o acetato de geranila são compostos característicos deste OE, porém decidiu-se estabelecer apenas um marcador para cada OE. Desse modo, foi selecionado o geraniol devido à sua maior concentração.

O passo seguinte foi desenvolver o ensaio de CCD nas formulações desenvolvidas, utilizando um controle de cada formulação (sem a BOEs) e a formulação final. A imagem da CCD obtida está apresentada na Figura 4.

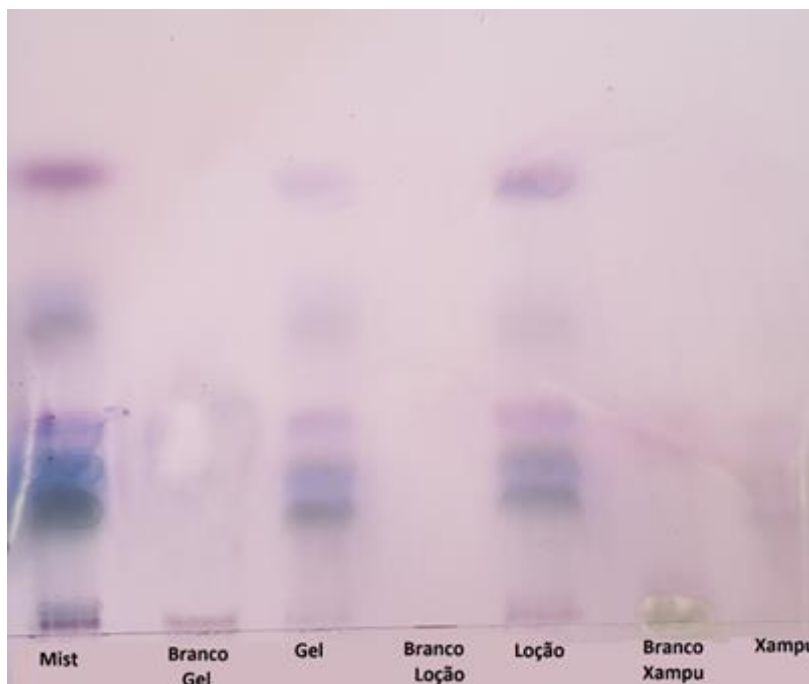


Figura 4. Cromatoplaça contendo o padrão da BOEs (Mist), em comparação com a extração realizada a partir das formulações controle (sem a BOEs) e das formulações desenvolvidas (gel, loção e xampu). Fase móvel: diclorometano; fase estacionária: sílica gel 60 F254; revelador: anisaldeído.

A Figura 4 mostra as bandas características da BOEs (geraniol, mentol e *trans*-Cariofileno) nas formulações de gel e loção e sua ausência nos respectivos controles. Entretanto, para a análise do xampu, a CCD não pode ser empregada devido à alta concentração de surfactantes na formulação que impedem a extração da BOEs por extração líquido-líquido. Dessa forma, o ensaio por CCD pode ser utilizado como uma alternativa simples e de baixo custo para realização do ensaio qualitativo das formulações de gel e loção desenvolvidas neste estudo, detectando pelo menos um marcador de cada um dos OEs empregados.

Análise por headspace/CG-EM

Para a análise de voláteis presentes nas formulações, a cromatografia gasosa é a técnica mais indicada. Neste estudo foi utilizada a cromatografia gasosa com detecção por massas (CG-EM), devido às vantagens do emprego do detector de massas, que pode ser utilizado para fins quantitativos e qualitativos simultaneamente.

A análise por *headspace* foi empregada na avaliação qualitativa do xampu, considerando os principais marcadores dos OEs e alguns compostos abundantes dentro da BOEs. Nesta técnica, a formulação é adicionada juntamente com solução saturada de NaCl em um frasco, o qual é lacrado e submetido ao aquecimento sob agitação constante. Os voláteis entram em equilíbrio entre o “espaço morto” (*headspace*) do frasco e a solução contida no

frasco (GOBATO; LANÇAS, 2001; SORIA; GARCÍA-SARRIÓ; SANZ, 2015). A análise cromatográfica é realizada com a captura dos gases presentes no *headspace* do frasco utilizando uma seringa apropriada para captura de gases (*gastight*) e feita a injeção manual no CG-EM.

Esta técnica foi utilizada para análise das formulações de xampu e gel. O cromatograma obtido com a injeção do *headspace* do frasco contendo os voláteis presentes no xampu está apresentado na Figura 5.

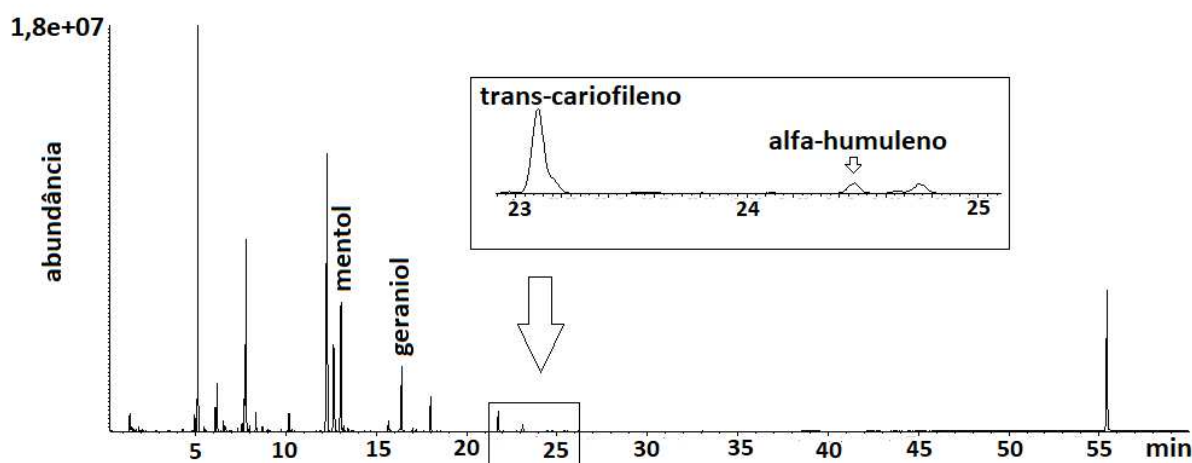


Figura 5. Cromatograma do *headspace* do xampu formulado com a BOES indicando a presença dos marcadores químicos selecionados: mentol (tR = 13,00 min) e geraniol (tR = 16,37 min). Acima, a janela expandida mostrando a eluição do *trans*-Cariofileno (tR = 23,20 min) e do α -Humuleno (tR = 24,51 min).

No cromatograma apresentado na Figura 5, os marcadores de *C. martini* (geraniol) e de *M. $\times$ piperita* (mentol) foram facilmente detectados. Todavia, os marcadores ativos da *V. curassavica* estão presentes em quantidades mínimas (Figura 5, destaque).

No desenvolvimento das condições de análise por *headspace* o objetivo era, a princípio, empregar esta técnica tanto para fins qualitativos quanto quantitativos. Entretanto, os resultados obtidos com a precisão para o xampu não foram satisfatórios para quantificação (ausência de repetição). À esta baixa precisão é atribuído o fato de que a técnica foi empregada manualmente, o que requer do operador uma grande habilidade analítica, além dos marcadores da BOEs serem encontrados em baixos teores na formulação. Desta forma, seu emprego só foi validado para fins qualitativos, onde foi possível a constatação da presença dos marcadores selecionados para a BOEs (Figura 5).

Análise quantitativa dos marcadores presentes no gel por CG-EM

As amostras de gel foram submetidas à extração líquido-líquido anteriormente à análise por CG-EM e o método foi devidamente validado (mostrando linearidade para o intervalo de concentração estudado, seletividade, precisão e exatidão). Foram determinadas apenas as concentrações de mentol (*M. × piperita*) e geraniol (*C. martini*). Os marcadores de *V. curassavica* (*trans*-Cariofileno e α -Humuleno) não puderam ser monitorados devido às suas baixas concentrações (Figura 5) e do *trans*-Cariofileno não ser um marcador exclusivo deste OE. A Tabela 5 apresenta um resumo das técnicas analíticas empregadas nas análises qualitativas e quantitativas das formulações.

Tabela 5. Resumo dos ensaios químicos utilizados e resultados da estabilidade preliminar

Formulações	Marcadores	Ensaio qualitativo	Ensaio quantitativo	Estabilidade preliminar
Gel	Geraniol e mentol	CCD	CG-EM	Estável
Loção		CCD	Não realizado	Instável
Xampu		Headspace/CG-EM	–	Estável

Estabilidade acelerada das formulações

Considerando a falta de estabilidade da formulação da loção nos ensaios preliminares de estabilidade, os ensaios de estabilidade seguiram com as formulações de gel e xampu. Na avaliação da estabilidade acelerada, as características organolépticas (cor, aspecto e odor) do gel hidroalcoólico mantiveram-se estáveis. Em relação ao xampu, a amostra mantida na câmara climática apresentou um leve escurecimento após 90 dias (Figura 6). O uso de agentes antioxidantes pode ser uma solução para a manutenção da cor da formulação (ISAAC et al., 2008).

O pH e a análise de centrifugação de ambas as formulações não apresentaram variação ao longo dos 90 dias de estudo. O pH se manteve dentro da faixa de 5,5–6,5 (Tabela 6), valores preconizados pela legislação brasileira (BRASIL, 2011). A pele apresenta um pH levemente ácido (4,6–5,8) podendo variar, além de outros parâmetros, entre pessoas do gênero masculino e feminino (RAHROVAN et al., 2018). A manutenção do pH da pele é necessária uma vez que esse caráter levemente ácido auxilia na proteção contra micro-organismos patogênicos. Dessa forma é necessário o desenvolvimento de produtos tópicos adequados para que não haja perturbação do pH cutâneo, além de outros fatores (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). Do ponto de vista farmacotécnico, alterações no pH ao longo do prazo de

validade de um medicamento podem causar degradação do princípio ativo com consequente perda da atividade farmacológica (KOUASSI; GRISEL; GORE, 2022).

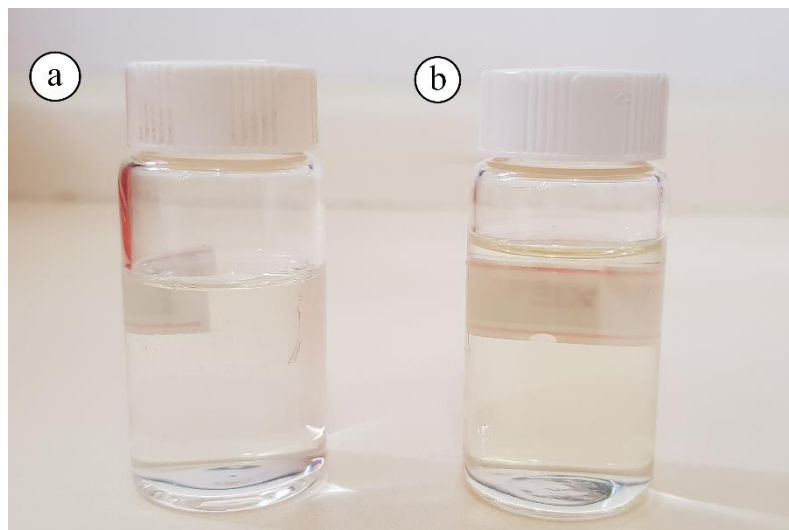


Figura 6. Comportamento do xampu durante o estudo da estabilidade acelerada. Formulação controle (A) e formulação com a BOEs mantida em câmara climática (40 °C; 75% umidade) (B) apresentando um leve escurecimento após 90 dias de estudo.

Tabela 6. Variação média do pH das amostras de gel e xampu ao longo de 90 dias do estudo de estabilidade acelerada

	Gel	Controle gel	Xampu	Controle xampu
Ambiente	5,70 ± 0,11	5,60 ± 0,23	6,30 ± 0,14	6,32 ± 0,11
Câmara climática	5,71 ± 0,07	5,58 ± 0,03	6,30 ± 0,10	6,12 ± 0,08
Geladeira	5,61 ± 0,02	5,72 ± 0,10	6,51 ± 0,19	6,36 ± 0,08
Iluminação	5,65 ± 0,09	5,68 ± 0,08	6,46 ± 0,11	6,13 ± 0,06

M ± DP: média e desvio padrão; *: diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

O processo de centrifugação gera um estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, o que pode auxiliar na verificação e correção de possíveis instabilidades que a formulação pode sofrer durante o tempo de prateleira, como precipitação do constituintes, separação de fases (geralmente emulsões), entre outros (ISAAC et al., 2008). De acordo com Lopes *et al.* (2019), amostras de xampus de cetoconazol apresentaram instabilidades após o processo de centrifugação, caracterizadas pela separação das fases e formação de sedimentos.

Sobre a espalhabilidade do gel (Tabela 7), foi observado que este parâmetro também não apresentou nenhuma variação ao longo do estudo. A espalhabilidade é definida como a expansão de uma formulação semissólida sobre a pele, após um determinado período de tempo, quando submetida a uma determinada força (BORGHETTI; KNORST, 2006). Essa avaliação reproduz as condições de esforço necessárias para aplicação da formulação na pele e está diretamente relacionada com a viscosidade de um produto (SILVA et al., 2019). Os géis

são caracterizados por apresentar boa espalhabilidade, além de serem formulações de fácil aplicação (ROMANHOLE et al., 2020). Entretanto, alterações na espalhabilidade de um produto podem causar rejeição pelo consumidor, visto que a aparência e a sensação pelo contato inicial com a pele são fatores que influenciam na escolha (MILAN et al., 2007). Emulsões formuladas com extrato seco de resveratrol apresentaram aumento na consistência da formulação, com consequente diminuição na espalhabilidade, devido ao armazenamento em baixas temperaturas (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Tabela 7. Variação média do perfil de espalhabilidade das amostras de gel ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade acelerada

	Gel (cm)	Controle (cm)
Ambiente	2,31 ± 0,08	2,43 ± 0,09
Câmara climática	2,84 ± 0,54	2,78 ± 0,34
Geladeira	2,47 ± 0,27	2,51 ± 0,19
Iluminação	2,67 ± 0,42	2,56 ± 0,19

M ± DP: média e desvio padrão; *: diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

A viscosidade do xampu foi menor na formulação, onde variou de 1000 a 3800 cP (Figura 7A) quando comparada com a amostra controle, que variou entre 2200 e 4600 cP (Figura 7B). Importante salientar que a adição da BOEs durante a manipulação do xampu promoveu aumento da viscosidade, dispensando a adição de NaCl ou de outro espessante. Entretanto, para o controle a viscosidade foi conferida pela adição de NaCl, o que explica a diferença de valores entre o controle e a formulação final.

A viscosidade é definida como uma medida de resistência ao fluxo, onde quanto maior for a viscosidade de um produto, maior será a força necessária para produzir o fluxo (MARRIOTT, 2016). A avaliação desse parâmetro ao longo do prazo de validade auxilia na verificação de certos fatores como a estética do produto, forma de escoamento pela embalagem, capacidade de espalhamento, entre outros (ALQUADEIB et al., 2018). Segundo Oliveira *et al.* (2013), é recomendado que xampus possuam viscosidade de pelo menos 2000 cP e que comercialmente a viscosidade varia entre 2000 e 5000 cP. Valores de viscosidade acima ou abaixo desse valor podem interferir na escolha do consumidor (dependendo da finalidade do uso), ou afetar a saída do produto da embalagem. Contudo, podem ser modificados com ajustes na formulação. Ao longo do estudo de estabilidade, foi observada uma diminuição significativa na viscosidade apenas na formulação mantida em câmara climática (Figura 7A). Possivelmente, o valor encontrado esteja abaixo do sugerido pela literatura por conta do estresse causado pelo armazenamento em altas temperaturas, como reportado por outros autores (BOAROLLI;

BENDER, 2019). Desse modo, para uma melhor estabilidade do produto, é recomendado o seu armazenamento em temperatura ambiente.

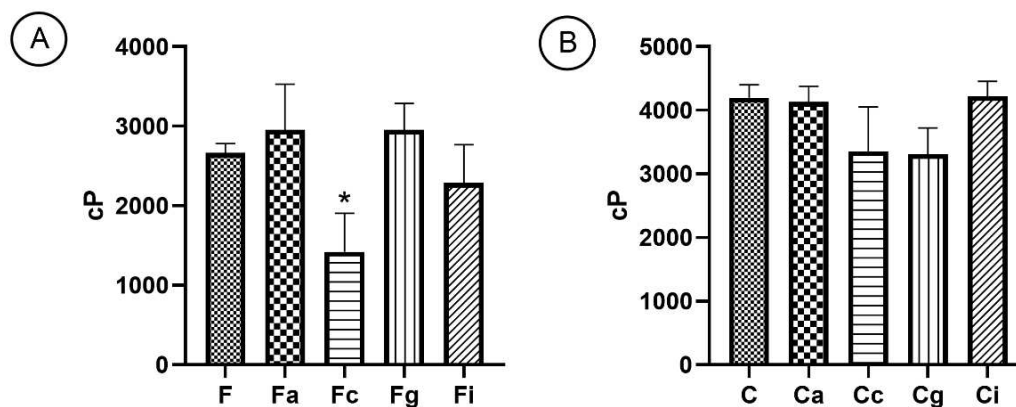


Figura 7. Valores médios do perfil de viscosidade do xampu formulado com a BOEs (A) e o controle (B) ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade. Condições de armazenamento: F: formulação (t0); C: controle; Fa/Ca: temperatura ambiente; Fc/Cc: câmara climática; Fg/Cg: geladeira; Fi/Ci: iluminação. *: diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$).

Análise dos marcadores nas formulações

No ensaio de estabilidade acelerada, foi observado que a concentração de geraniol e mentol se manteve estável ao longo do estudo (Figura 8A, B). Desse modo, a verificação da presença do *trans*-Cariofileno foi feita por CCD, onde foi possível verificar a banda correspondente a este composto durante todo o estudo de estabilidade (Figura 8C).

As análises quantitativas do gel foram realizadas através da determinação do teor de mentol (*M. × piperita*) e geraniol (*C. martini*). Sobre os demais marcadores da mistura quantificados por CG-EM, foi observado que as concentrações de geraniol e mentol também se mantiveram estáveis ao longo do estudo de estabilidade (Figura 8A, B). Cabe salientar que, para o OE de *V. curassavica*, os resultados preliminares de validação para determinação de *trans*-Cariofileno não foram satisfatórios, devido à baixa concentração do analito nas formulações e pelo fato do mesmo não ser um marcador exclusivo deste OE.

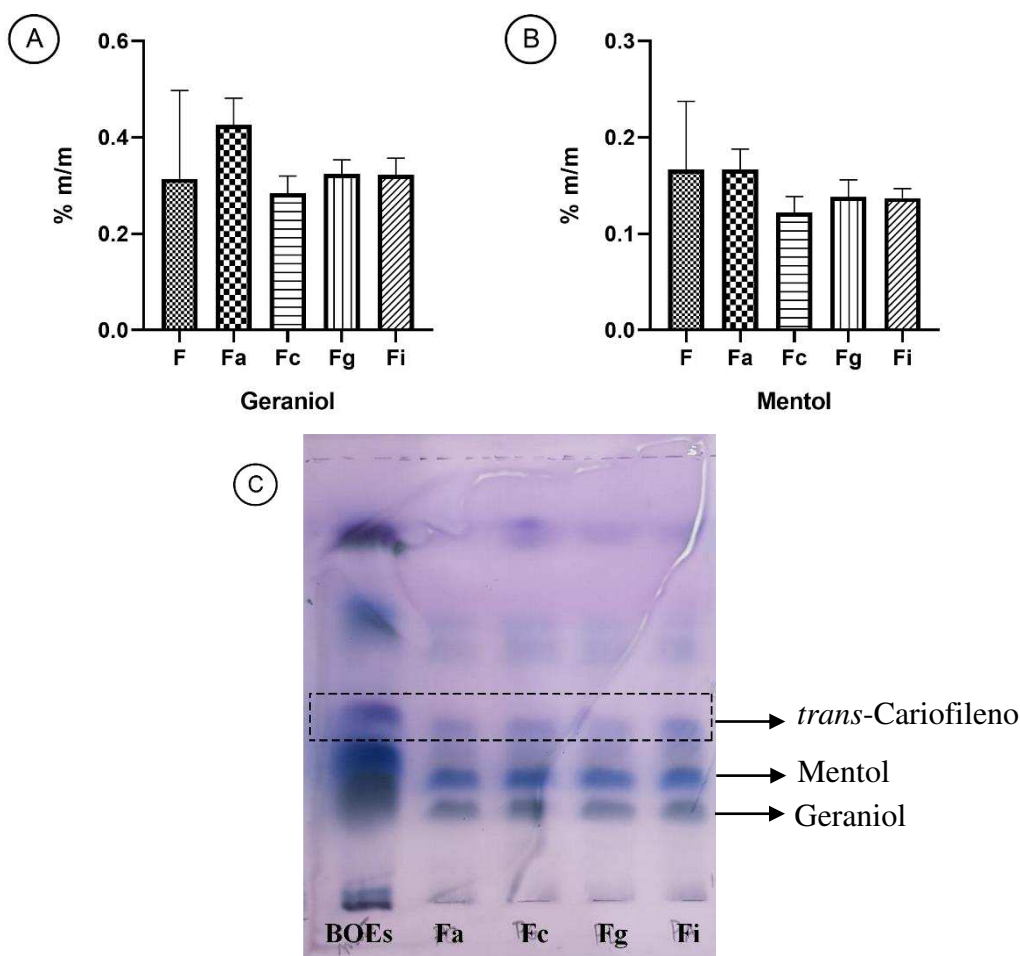


Figura 8. Quantificação por CG-EM das concentrações de geraniol (A) e mentol (B) nas amostras de gel durante o estudo de estabilidade. Cromatoplaça com aplicação da BOEs e formulação de gel armazenada por 90 dias (C). Fase móvel: diclorometano; fase estacionária: sílica gel 60 F254; revelador: anisaldeído. Condições de armazenamento: F: formulação (t0); Fa: temperatura ambiente; Fc: câmara climática; Fg: geladeira; Fi: iluminação. *: diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$).

As análises qualitativas realizadas por *headspace* no xampu também mostraram que, através da % de área dos cromatogramas, os compostos permaneceram estáveis em todas as condições estabelecidas (Figura 9). É sabido que fatores como o aumento da pressão e da temperatura afetam diretamente a composição química dos OEs (TUREK; STINTZING, 2013) dentro da formulação. No estudo de estabilidade do creme desenvolvido por Baptista (2015), o autor relata que houve uma perda na concentração de eugenol (13,1%) na avaliação feita por CG. Na legislação brasileira (BRASIL, 2019b) são consideradas mudanças significativas no teor de medicamentos fitoterápicos quando há 10% de perda do princípio ativo vegetal ou perda de peso $\geq 5\%$ em um período de três meses. O resultado verificado no presente trabalho mostrou que as concentrações dos compostos quantificados no gel estão de acordo com o valor

estabelecido e que os mesmos se mantiveram presentes no xampu ao longo de todo o estudo de estabilidade.

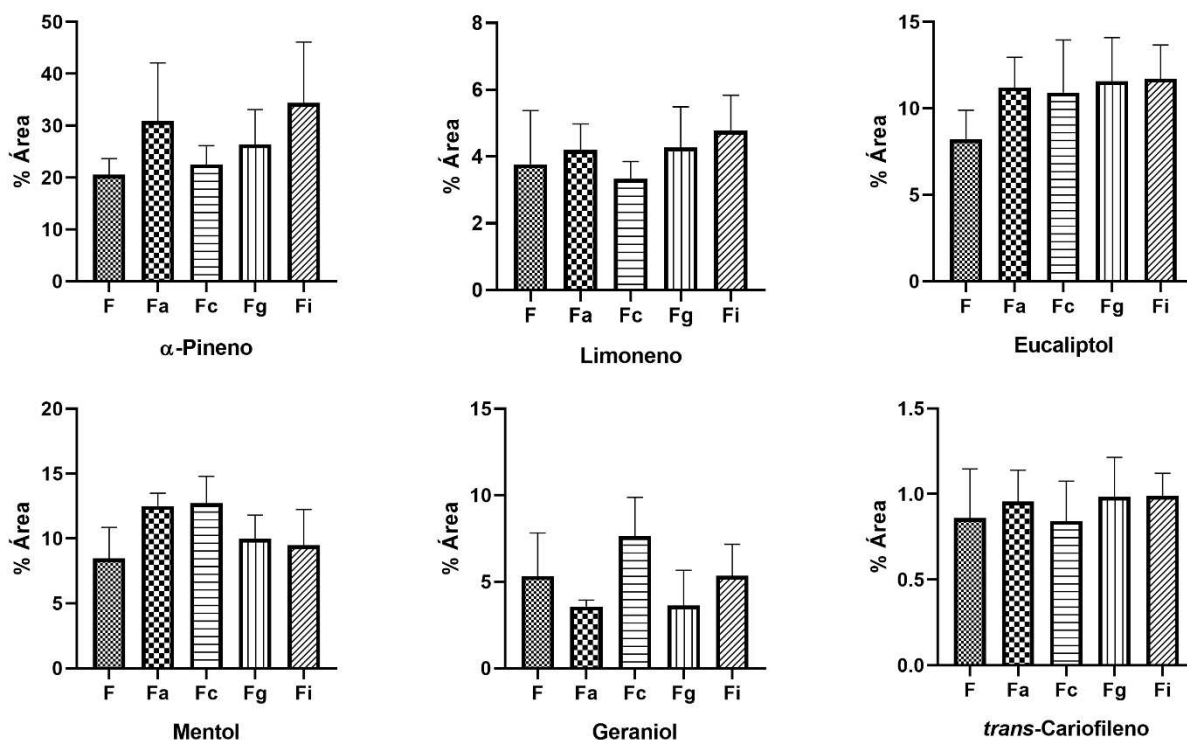


Figura 9. Valores médios da área dos picos obtidos por *headspace* nas amostras de xampu ao longo do estudo de estabilidade. Condições de armazenamento: F: formulação (t0); Fa: temperatura ambiente; Fc: câmara climática; Fg: geladeira; Fi: iluminação. *: diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$).

Densidade e índice de espuma do xampu

O xampu formulado com a BOEs apresentou uma densidade de 1,026 g/mL e índice de espuma de 5,6 cm e não apresentou variação com o controle. A determinação da densidade de um xampu é importante, pois esse parâmetro auxilia na verificação da perda de ingredientes voláteis, como os OEs, ou da incorporação de ar na formulação (PEREIRA et al., 2020). A densidade ideal dos xampus líquidos encontra-se na faixa de 1,010–1,020 g/mL (LOURENÇO; LYRA, 2015). Entretanto, valores de densidade diferentes dessa faixa não influenciam diretamente na qualidade e eficácia dos produtos como mostrou o trabalho desenvolvido por Silva et al. (2018) em que os valores de densidade variam de 1,030 a 1,080 g/mL. De acordo com Pereira et al. (2020), o xampu desenvolvido com óleo essencial de *Salvia rosmarinus* Spenn., apresentou densidade entre 1,003–1,019 g/mL, indicando que a adição do óleo essencial à formulação não ocasionou alterações na densidade do produto final. O mesmo foi relatado

por Scacheti *et al.* (2011) no desenvolvimento de xampus com extrato hidroalcoólico de *Capsicum frutescens* L.

O poder espumante de um xampu é a principal característica observada pelo consumidor na hora da compra, embora a capacidade de limpeza do xampu não esteja diretamente associada a quantidade e persistência da espuma produzida (RAJ, 2016). Embora esse seja o fator determinante na hora da compra, um excesso na produção de espuma pode ser um problema, pois dificulta a retirada do xampu além dos surfactantes sintéticos causarem irritação caso entrem em contato com os olhos (AL BADI; KHAN, 2014). Esses fatores devem ser levados em consideração durante o desenvolvimento de um xampu terapêutico, pois a viscosidade e o tempo de permanência da espuma no couro cabeludo, influenciam na eficácia terapêutica. Por exemplo, para um xampu antimicrobiano, é recomendado que o tempo de permanência da formulação seja de no mínimo cinco minutos antes do enxágue (FERREIRA, 2010). O xampu desenvolvido apresenta uma espuma densa e estável o que, como comentado anteriormente, é o esperado para um xampu com a finalidade terapêutica. Lima e Comarella (2012) sugerem a utilização de uma formulação desenvolvida com tensoativos hipoalergênicos para o tratamento da dermatite seborreica; a qual foi adaptada no presente estudo para uma formulação fitoterápica sem conservantes. A formulação livre de tensoativos é descrita no “Apêndice E”.

Avaliação do sistema conservante de formulações – Challenge test

O *Challenge test* consiste na contaminação proposital das formulações com diferentes micro-organismos. As amostras são avaliadas em intervalos de tempo definidos afim de verificar se a concentração dos conservantes está adequada ao produto final, uma vez que esse deve garantir a proteção e a manutenção da estabilidade do produto durante todo o seu prazo de validade (MELO; DOMINGUES; LIMA, 2018).

Os resultados obtidos através da análise realizada pelo *Challenge test* para o gel e o xampu formulados (Tabelas 8 e 9) mostraram que a BOEs também conferiu propriedade conservante às formulações, visto que a mesma foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos utilizados no teste. Os valores obtidos nas análises estão de acordo com o preconizado pela legislação (BRASIL, 2019a).

Tabela 8. Resultados obtidos nas análises de contagem microbiana para o gel e o xampu após incubação por tempos de contato (UFC/mL)

Micro-organismos	t0	t7	t14	t21	t28
<i>A. brasiliensis</i>	t0: $6,0 \times 10^5$	<10	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i>	t0: $8,0 \times 10^5$	<10	<10	<10	<10
<i>E. coli</i>	t0: $1,3 \times 10^6$	<10	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i>	t0: $1,8 \times 10^6$	<10	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	t0: $1,1 \times 10^6$	<10	<10	<10	<10

Tabela 9. Log de redução (RD) com base na contagem inicial nas amostras de gel e xampu por tempos de contato (UFC/mL)

Micro-organismos	t0	t7	t14	t21	t28
<i>A. brasiliensis</i>	RD: 5,8	RD: >4,8	RD: >4,8	RD: >4,8	RD: >4,8
<i>C. albicans</i>	RD: 5,9	RD: >4,9	RD: >4,9	RD: >4,9	RD: >4,9
<i>E. coli</i>	RD: 6,1	RD: >5,1	RD: >5,1	RD: >5,1	RD: >5,1
<i>P. aeruginosa</i>	RD: 6,2	RD: >5,2	RD: >5,2	RD: >5,2	RD: >5,2
<i>S. aureus</i>	RD: 6,0	RD: >5,0	RD: >5,0	RD: >5,0	RD: >5,0

Devido à ampla aplicação dos parabenos, problemas ambientais começaram a surgir como, por exemplo, a contaminação da água (BOLUJOKO et al., 2021; HAMAN et al., 2015). Além disso, foram relatadas correlações entre o acúmulo de parabenos em tumores metastáticos de mama (DOWNS et al., 2023). O desenvolvimento de produtos livres de parabenos é promissor, pois, além de não afetarem a saúde dos usuários, auxiliam na diminuição da contaminação ambiental e colaboram com o principal objetivo da chamada “química verde” (CONSTABLE, 2021). A utilização dos OEs como substituinte dos conservantes sintéticos em formulações é promissora, visto que essas substâncias são amplamente conhecidas por suas propriedades antimicrobianas e, em alguns casos, sua baixa toxicidade (DREGER; WIELGUS, 2013). De acordo com Herman *et al.* (2013), a atividade antimicrobiana dos OEs de *Lavandula officinalis* Chaix, *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e *Cinnamomum verum* J. Presl foi superior quando comparada com ação do metilparabeno contra os micro-organismos utilizados no *Challenge test*. Outros estudos (GAJIC; BOSKOV; SAVIC, 2021; GONTAR; HERMAN; OSINSKA, 2021; KACZMARCZYK et al., 2015; MUYIMA et al., 2002) também mostraram a eficácia de diferentes OEs em formulações de creme contra o grupo de micro-organismo utilizados nessa análise. Os autores mencionam que, a partir desses resultados, as espécies medicinais e aromáticas podem ser recomendadas como conservantes naturais em cosméticos.

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostraram que as formulações de gel e xampu desenvolvidas com uma BOEs composta de *C. martini* e *M. × piperita*, ativos contra *M. furfur*, e do OE anti-inflamatório de *V. curassavica* permaneceram estáveis ao longo de todo o estudo de estabilidade. Embora o xampu tenha apresentado uma leve mudança na cor e na viscosidade, esses fatores não interferiram na estabilidade final da formulação. Através do *Challenge test*, realizado para ambos os produtos, foi possível demonstrar que a BOEs foi apta a inibir os micro-organismos utilizados no teste, atuando de maneira eficaz como único conservante nas formulações. Assim, além da atividade anti-*M. furfur* apresentada pela BOEs, o emprego da mesma pode também ser sugerido como conservante natural em cosméticos, em substituição aos sintéticos. O uso de um ingrediente natural ativo em formulações de gel capilar e xampu representa uma poderosa ferramenta no tratamento da dermatite seborreica, sem agressões químicas aos usuários e também ao meio ambiente.

Capítulo 3

Determinação *in vitro* da susceptibilidade do biofilme de *Malassezia furfur* a diferentes antimicrobianos de uso comercial

Resumo

Os biofilmes são aglomerados celulares complexos e de difícil remoção, que geram problemas em diversos setores. No âmbito da saúde, essas estruturas são conhecidas por gerar complicações nos quadros clínicos das patologias como, por exemplo, colonizando cateteres endovenosos. Devido a sua morfologia e fisiologia diferenciada, a ação de agentes antimicrobianos é extremamente dificultada. *Malassezia furfur* é uma levedura conhecida como o agente etiológico da dermatite seborreica e por causar, em casos mais graves, complicações em pacientes imunocomprometidos pela formação de biofilme em cateteres endovenosos. Os relatos na literatura quanto a ação dos antimicrobianos sobre o biofilme de *M. furfur* ainda são escassos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação de cinco diferentes antimicrobianos (anfotericina B, cloranfenicol, cetoconazol, fluconazol e nistatina) sobre a inibição da formação e na erradicação do biofilme formado por *M. furfur*. De acordo com os resultados obtidos, a porcentagem de inibição foi maior para o cloranfenicol ($\cong 84\%$), seguido de cetoconazol ($\cong 83\%$), nistatina ($\cong 60\%$) e anfotericina B ($\cong 13\%$). Quanto ao efeito na erradicação do biofilme formado, a maior porcentagem de foi a do cloranfenicol ($\cong 50\%$), seguido por cetoconazol ($\cong 49\%$) e nistatina ($\cong 48\%$). A anfotericina B não teve efeito na erradicação do biofilme, enquanto o fluconazol não causou mudanças significativas na inibição ou na erradicação do biofilme de *M. furfur*. Portanto, com exceção do fluconazol, todos os antimicrobianos avaliados apresentaram efeitos inibitórios sobre o biofilme de *M. furfur*, seja na sua formação e/ou erradicação. Embora os resultados alcançados com o cloranfenicol tenham se destacado, ainda são necessários estudos complementares *in vitro* e *in vivo* para a inclusão deste fármaco na terapêutica da dermatite seborreica devido à sua toxicidade, em especial sobre a medula óssea.

Palavras-chave: cloranfenicol; leveduras; biofilme; susceptibilidade *in vitro*; antifúngicos.

Introdução

Os biofilmes são aglomerados celulares complexos e estruturados como forma de sobrevivência dos micro-organismos a ambientes que prejudicam o seu desenvolvimento (TRETER; MACEDO, 2011). A formação do biofilme se dá através da adesão das células a uma superfície (biótica ou abiótica) gerando, ao longo da sua maturação, agregados celulares que são visíveis a olho nu (TRUBENOVÁ et al., 2022). Essas comunidades podem ser formadas por uma ou várias espécies de micro-organismos (WADE et al., 2023), facilitando a transferência de genes que promovem a resistência das células às estratégias de erradicação microbiana (SWANSON, 2022).

Malassezia é um gênero composto por leveduras basidiomicetos, caracterizadas por uma parede celular espessa, que ocorrem como comensais na pele e na mucosa de humanos e outros animais de sangue quente (CAFARCHIA et al., 2011; PROHIC et al., 2016; THEELEN et al., 2018). São consideradas como a única e mais abundante espécie de leveduras a habitar a microbiota cutânea humana de forma comensal (PROHIC et al., 2016; SPARBER et al., 2019) e, com exceção de *M. pachydermatis*, todas as espécies do gênero são lipídio-dependentes (PEDROSA; LISBOA; RODRIGUES, 2014). Dentre os distúrbios ocasionados por *Malassezia* à pele destaca-se, principalmente, a caspa e a dermatite seborreica provocada por *M. furfur* (SIBI; SILVANOSE; JIBIN, 2023). Além disso, é relatado na literatura a capacidade de *M. furfur* em formar biofilme (ANGIOLELLA et al., 2018) e que, em situações mais graves, esta espécie está associada a fungemia em pacientes imunocomprometidos em cateteres endovenosos (BARBER et al., 1993; KANEKO et al., 2012). Assim, devido as complicações à saúde humana, é fundamental a aplicação de práticas sanitárias que previnam a formação dos biofilmes.

Os antimicrobianos sintéticos desempenham papel fundamental na eliminação de diferentes micro-organismos e seus biofilmes, porém sua ação acaba sendo dificultada pelos mecanismos de resistência (JAFFAR, 2022). As características fisiológicas e fenotípicas do biofilme são diferentes das células planctônicas, ocorrendo uma maior expressão das bombas de efluxo e alterações na composição da membrana/matriz (RAMAKRISHNAN et al., 2022). Em função dessas particularidades, incluindo as mutações provocadas pela constante troca de material genético, os antimicrobianos utilizados na clínica encontram dificuldade de ação mesmo em concentrações mais altas do que as utilizadas para controle das células planctônicas (TRUBENOVÁ et al., 2022). Vale ressaltar que, mesmo que um antimicrobiano apresente efeito contra a célula planctônica de um organismo, quando o mesmo cresce em um biofilme,

ele pode se tornar resistente ao tratamento (LIAQAT; SUMBAL; SABRI, 2009). Isso ocorre pelo fato das drogas não alcançarem todas as camadas de células presentes no biofilme.

Como forma de combater a resistência desses micro-organismos, alguns autores têm discutido sobre a reintrodução de certos antibióticos, descartados anteriormente devido aos seus efeitos tóxicos, como uma alternativa na forma de tratamento (DRAGO, 2019; LIAQAT; SUMBAL; SABRI, 2009; THEURETZBACHER; PAUL, 2015; TIAN et al., 2022; ZAYYAD et al., 2017). Nesse âmbito, o cloranfenicol já foi reportado como efetivo contra as células planctônicas de *M. furfur* (JOSEPH et al., 2015) e o biofilme de algumas espécies (DIAS-SOUZA; SOARES; SANTOS, 2017; DRAGO, 2019; LIAQAT; SUMBAL; SABRI, 2009; RAY et al., 2017). Contudo, as informações a respeito da ação de antimicrobianos sintéticos sobre o biofilme de *M. furfur* ainda são restritos na literatura. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação de cinco antimicrobianos na inibição da formação e na erradicação do biofilme formado por *M. furfur*.

Material e Métodos

Agentes antimicrobianos

Os ensaios foram realizados com os antimicrobianos anfotericina B (Sigma-Aldrich), cloranfenicol (Acros Organics), cetoconazol (Sigma-Aldrich), fluconazol (Neon) e nistatina (Sigma-Aldrich). As soluções foram preparadas utilizando 10 mg dos antimicrobianos diluídos em 10 mL de água destilada estéril. Após a diluição, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 mm com o auxílio de uma seringa, transferidas para frascos de microcentrífuga e mantidas em freezer (-6 °C) até o momento das análises.

Preparação das placas e do inóculo

Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U” foram depositados 100 µL do meio RPMI-1640 suplementado (g/L): extrato de malte 5; peptona 10; Tween 20 5; Tween 80 0,5; glicerol 10; bile bovina 5; glicose 18 e 100 µL dos antimicrobianos no primeiro poço de cada coluna. Diluições seriadas foram realizadas através da homogeneização do material contido no primeiro poço, seguido da transferência de 100 µL para o segundo poço e assim sucessivamente até o último poço sendo os 100 µL finais desprezados. As diluições foram realizadas em uma faixa de concentração de 0,002–0,25 mg/mL. Em seguida foram adicionados 100 µL do inóculo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello), cuja densidade ótica (Abs) foi acertada entre 0,08 e 0,1 em espectrofotômetro a 530 nm, seguido da diluição para uma concentração final de 10^6

células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Foram adicionados aos ensaios o controle de esterilidade do meio de cultura, das amostras e do inóculo.

Inibição da formação de biofilme

As análises foram realizadas de acordo com o método de microdiluição, conforme descrito anteriormente. Passado o período de incubação, o meio de cultura contido nos poços foi retirado, seguido de lavagem dos poços com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para remoção das células planctônicas e de secagem em estufa a 60 °C por 1 h. O biofilme formado foi corado com solução de Cristal Violeta (0,4%) por 15 min e, após lavagem com água corrente, foi solubilizado com DMSO (200 µL/poço). Após 1 h, foi realizada leitura de absorbância das placas em leitor de microplaca (GloMax) a 540 nm (LIZCANO, 2015). As análises foram feitas em triplicata.

Erradicação do biofilme formado

As microplacas foram montadas depositando apenas o meio de cultura, seguido do inóculo de *M. furfur* a 10⁶ células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e, passado o período de incubação, o meio de cultura contido nos poços foi retirado, permanecendo apenas o biofilme formado. Sobre essa camada de biofilme foi realizada a microdiluição das amostras, conforme descrito anteriormente, nas mesmas concentrações especificadas (0,002–0,25 mg/mL) seguido da re-incubação das placas a 37 °C por 48 h. Passado o período de incubação, foi realizado o mesmo processo utilizado no ensaio sobre a ação na formação do biofilme, ou seja, lavagem com solução salina estéril, aplicação de Cristal Violeta, solubilização e leitura em leitor de microplaca. As leituras foram convertidas em porcentagens correspondentes a quantidade de biofilme inibido ou erradicado segundo a fórmula:
$$([\text{absorbância do poço com amostra} - \text{absorbância do controle}] \times 100) / \text{absorbância do controle do micro-organismo} - \text{absorbância do controle da placa}$$
 (LIZCANO, 2015). As análises foram feitas em triplicata.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise do biofilme por MEV foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do IB/UNICAMP.

Para a análise do biofilme foram utilizados fragmentos de vidro (4 × 8 mm) esterilizados previamente em autoclave (121 °C, 15 min). Esses fragmentos foram adicionados nos compartimentos das placas de 96 poços. Os fragmentos foram retirados dos poços, lavados rapidamente com solução salina estéril 0,9% para remoção do excesso de meio de cultura e das

células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos de microcentrífuga contendo 1,0 mL de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) para fixação, por 24 h. Após este período, o material foi lavado com solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) duas vezes por 20 min e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% (v/v) em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) por 1 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,3) duas vezes por 20 min e desidratadas em gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, sendo que na última concentração as amostras foram lavadas três vezes), por 10 min em cada concentração (SILVEIRA, 2015). Finalmente, as amostras presentes nos fragmentos de vidro foram secas pela técnica do ponto crítico de CO₂ no equipamento Balzers - modelo CPD 030. Os fragmentos foram montados em suportes metálicos e recoberto com ouro coloidal por 200 seg no equipamento Bal-Tec - modelo SCD 050. A análise e o registro eletromicrográfico foram realizados no microscópio eletrônico de varredura LEO - modelo VP 435, operado a 20 kV.

Análise estatística

Os resultados foram comparados usando o teste ANOVA considerando o nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism 8.0.

Resultados e Discussão

Considerando os resultados obtidos para os antimicrobianos selecionados, a porcentagem de inibição da formação do biofilme foi maior para o cloranfenicol ($\cong 84\%$), que apresentou atividade na faixa de 0,008–0,25 mg/mL, seguido de cetoconazol ($\cong 83\%$) e nistatina ($\cong 60\%$), que tiveram atividade na faixa de 0,06–0,25 mg/mL (Figura 1A). Abaixo desta concentração, os antimicrobianos não apresentaram atividade inibitória. A anfotericina B mostrou atividade apenas na concentração de 0,25 mg/mL ($\cong 13\%$) enquanto nenhum efeito foi observado para o fluconazol. Através das imagens de MEV pode ser observado que o biofilme de *M. furfur* é caracterizado pela presença de diversos aglomerados de células ovais recobertos pela matriz polimérica extracelular (Figura 2A). As imagens referentes ao ensaio de inibição da formação de biofilme na presença dos antimicrobianos (Figura 2B–D) mostram que houve uma diminuição dos aglomerados celulares, com a presença de algumas células planctônicas (Figura 2, setas) e de artefatos (Figura 2, asteriscos). Embora isso também possa ser observado para a amostra submetida ao fluconazol (Figura 2C), a inibição causada por esse antifúngico não foi significativa (Figura 1A). Nas amostras tratadas com cetoconazol (Figura 2E e 2F) e

anfotericina B (Figura 2G e 2H) pode ser notada a presença de aglomerados de células aparentemente íntegras, o que não foi encontrado para os demais antimicrobianos testados.

Quanto ao efeito sobre a erradicação do biofilme formado (Figura 1B), os antimicrobianos apresentaram atividade na mesma faixa de concentração observada no ensaio de inibição de sua formação, com exceção da anfotericina B. A maior porcentagem de erradicação foi observada para o cloranfenicol ($\cong 50\%$), seguido do cetoconazol ($\cong 49\%$) e nistatina ($\cong 48\%$). As imagens de MEV (Figura 3) mostram que as células mantiveram seu formato oval e uma organização padrão, estando recobertas por uma matriz polimérica extracelular. Quando comparada a amostra do biofilme sem tratamento (Figura 3A) com as tratadas com os antimicrobianos (Figura 3B–F) foi possível notar uma maior desorganização do biofilme tratado com cloranfenicol (Figura 3B).

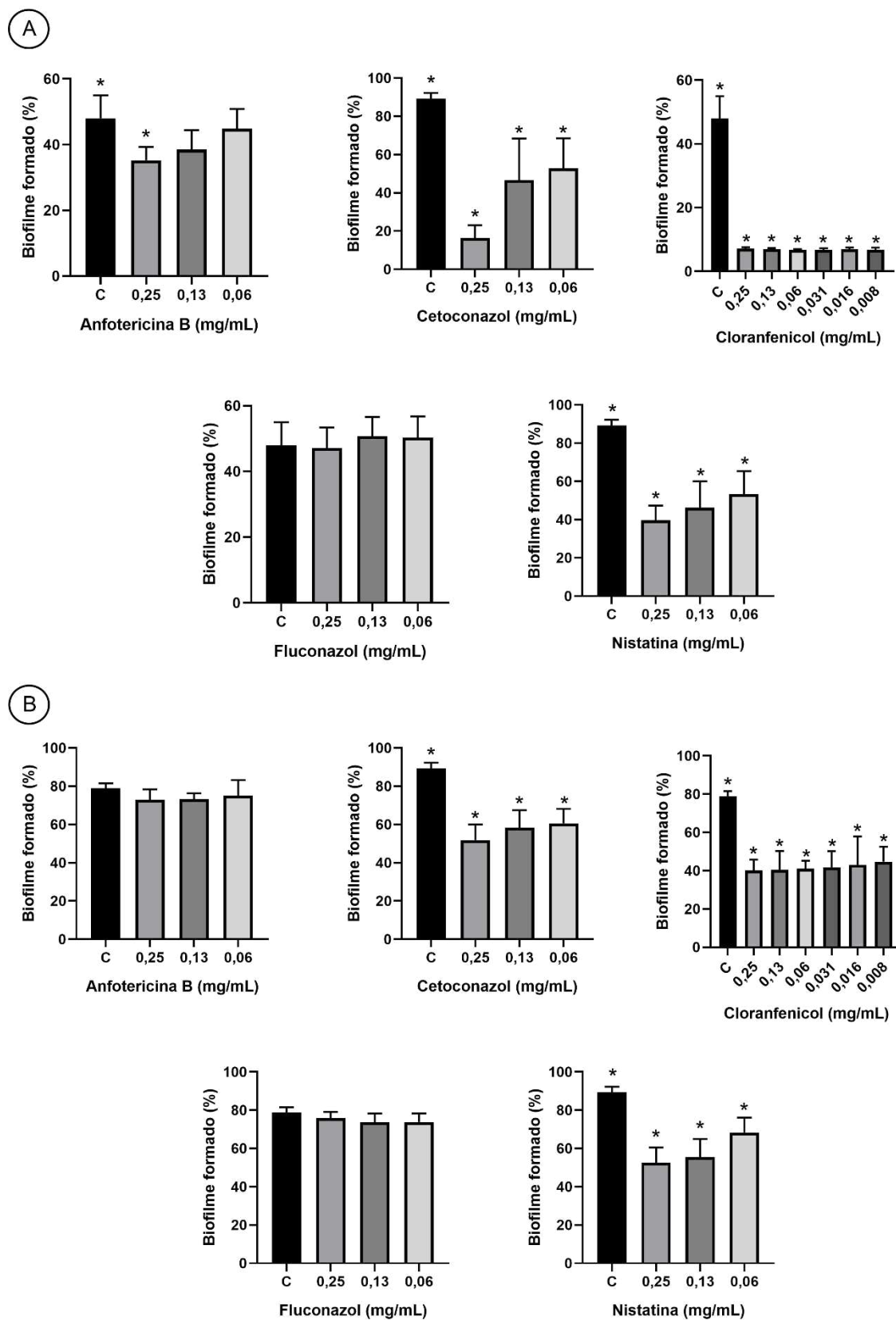


Figura 1. Porcentagem de inibição da formação (A) e de erradicação (B) do biofilme de *M. furfur* pelos antimicrobianos anfotericina B, cetoconazol, cloranfenicol, fluconazol e nistatina. Todas as concentrações foram comparadas em relação ao controle (C), ou seja, células sem tratamento com os antimicrobianos. *: diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$).

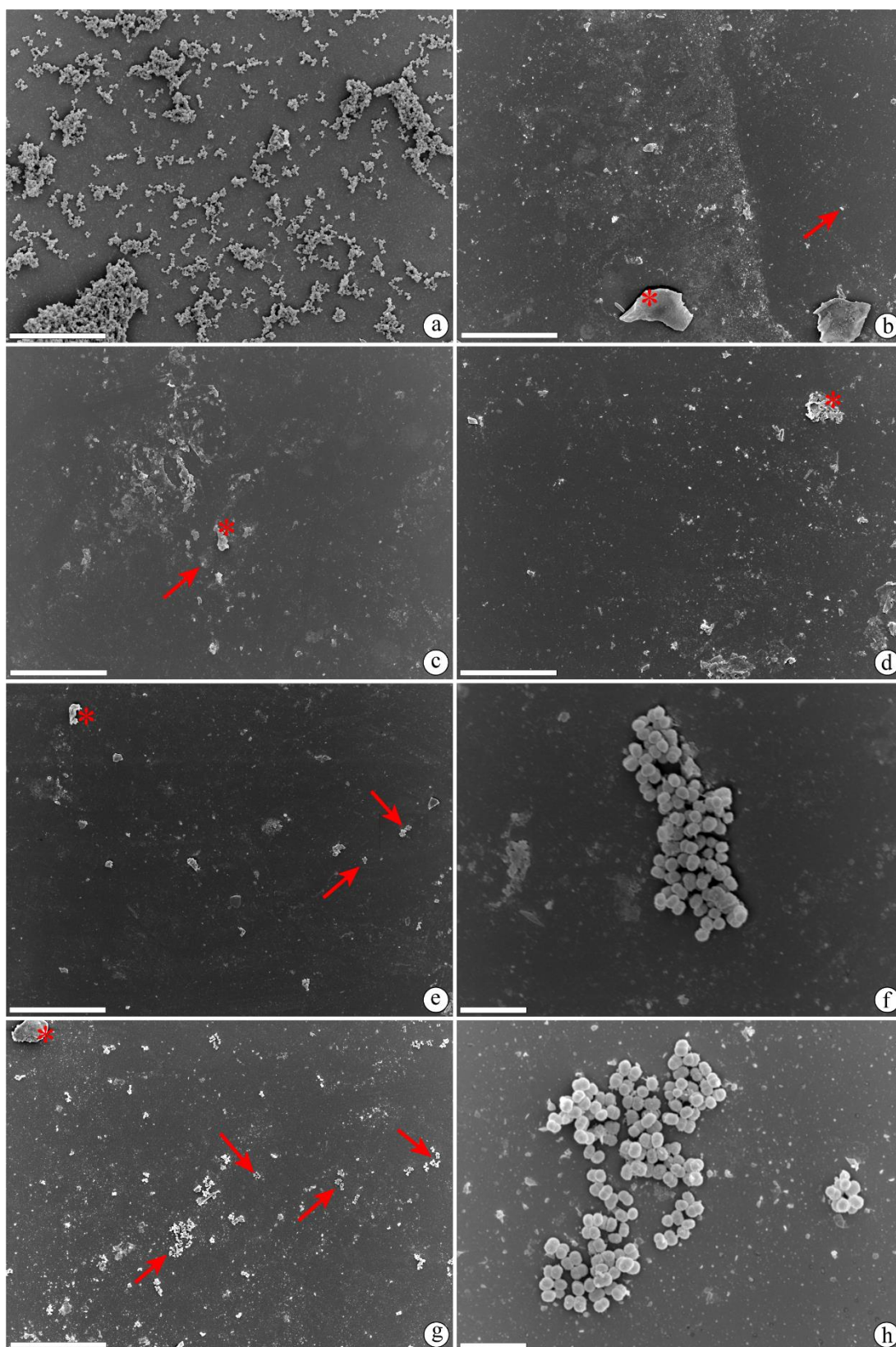


Figura 2. Eletromicrografias de varredura do ensaio de inibição dos antimicrobianos sobre o biofilme de *M. furfur*. Biofilme sem tratamento mostrando diversos aglomerados celulares com células unidas e recobertas pela matriz polimérica extracelular (A). Biofilme após tratamento com cloranfenicol (B), fluconazol (C), nistatina (D), cetoconazol (E, F) e anfotericina B (G, H). Células planctônicas (seta), artefatos (asterisco). Barras: A, B, C, D, E, G = 50 μm ; F, H = 5 μm .

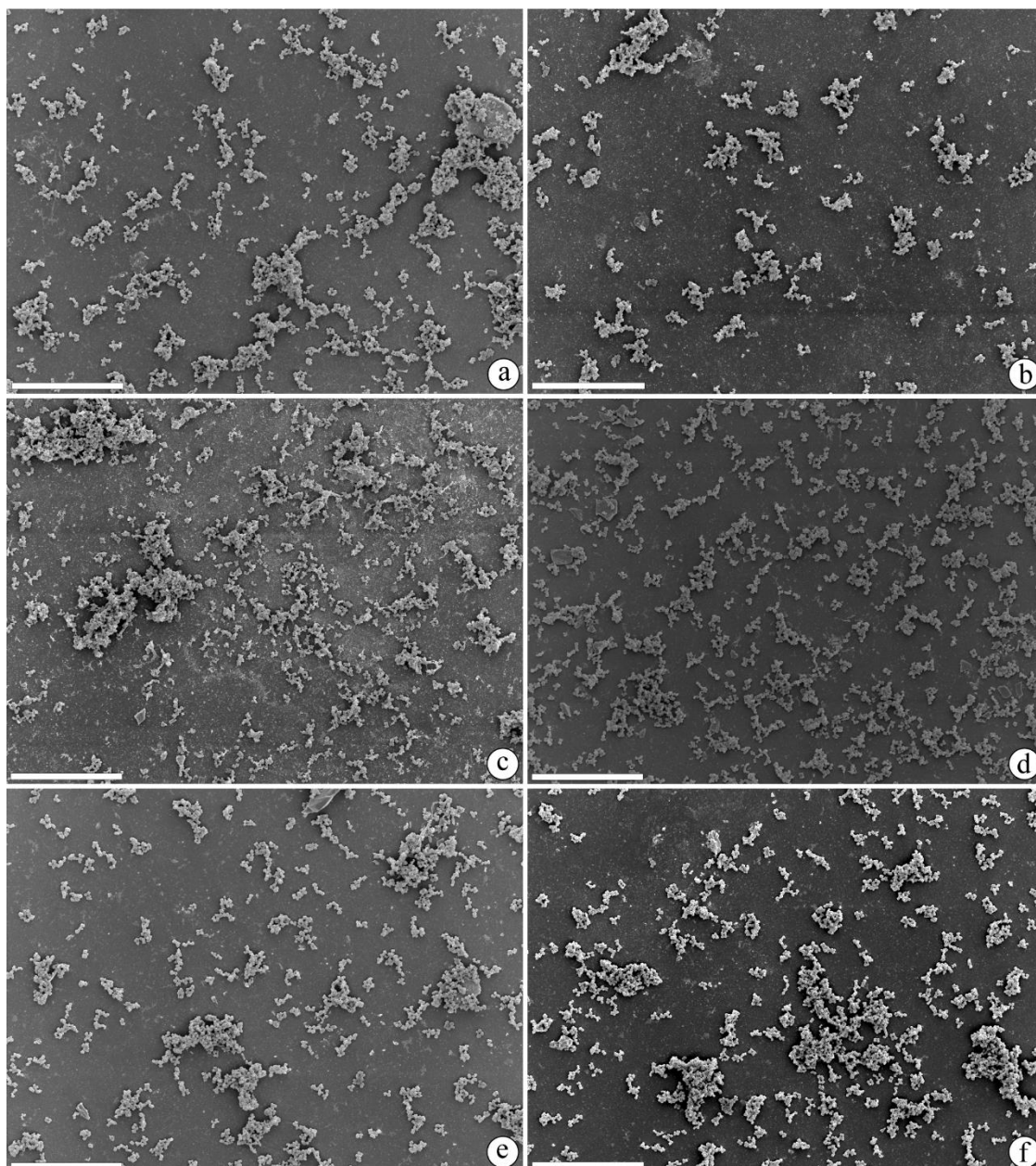


Figura 3. Eletromicrografias de varredura do ensaio de erradicação dos antimicrobianos sobre o biofilme de *M. furfur*. Biofilme sem tratamento mostrando diversos aglomerados celulares com células unidas e recobertas pela matriz polimérica extracelular (A). Biofilme após tratamento com cloranfenicol (B), fluconazol (C), nistatina (D), cetoconazol (E) e anfotericina B (F). Barras: A–F = 50 μ m.

A ação da anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e nistatina sob a forma planctônica de *M. furfur* é conhecida e relatada na literatura (GALVIS-MARÍN et al., 2017; GUPTA; GAIKWAD; NAIK, 1999; HADRICH; AYADI, 2018; ROMALD et al., 2020; WANG et al., 2020). Entretanto, as informações a respeito da atividade desses antifúngicos sobre o biofilme de *M. furfur* é restrita. A maioria dos estudos realizados com essa finalidade utilizaram outras espécies de *Malassezia*, como *Malassezia pachydermatis*, agente etiológico da dermatite seborreica em cães e gatos (BRILHANTE et al., 2018; BUMROONGTHAI et al.,

2016; ČONKOVÁ et al., 2022; FIGUEREDO; CAFARCHIA; OTRANTO, 2013; JERZSELE et al., 2014). Os resultados desses estudos mostraram que os antifúngicos utilizados apresentaram efeito inibitório sobre as células planctônicas de *M. pachydermatis*. Porém, em alguns casos, nem sempre são efetivos contra a forma de biofilme (BRILHANTE et al., 2018; BUMROONGTHAI et al., 2016; ČONKOVÁ et al., 2022; FIGUEREDO; CAFARCHIA; OTRANTO, 2013; JERZSELE et al., 2014), assim como observado no presente estudo com o fluconazol. A respeito da ação do fluconazol sobre o biofilme de espécies de *Malassezia* causadoras de pitíriase versicolor (*M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis*), Chebil et al. (2022) observaram que a ação de determinadas enzimas facilita a formação do biofilme, além de reduzirem a ação do fluconazol.

Os antifúngicos estudados agem promovendo o aumento da permeabilidade da membrana, levando à abertura de canais com consequente extravasamento de íons. Isso ocorre devido a ligação dos fármacos ao ergosterol das membranas celulares dos fungos, como os polienos (anfotericina B e nistatina) (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; LOMBARDI; OUANOUNOU, 2020) ou agindo na via de síntese do ergosterol, como os imidazóis (cetoconazol e fluconazol) (BEGGS; ANDREWS; SAROSI, 1981).

Dentre todos os antimicrobianos avaliados, o cloranfenicol apresentou os melhores resultados tanto de inibição da formação, como na erradicação do biofilme formado. Embora não seja o fármaco de escolha para o tratamento de doenças causadas por fungos, o cloranfenicol age inibindo a síntese proteica em células procarióticas e, em menor grau, nas células eucarióticas (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2011). Em fungos o mecanismo ainda não é totalmente conhecido, visto que os micro-organismos eucariotos têm ribossomos com subunidades diferentes dos procariotos. Provavelmente, a inibição seletiva da síntese proteica seja o fator responsável pela atuação do cloranfenicol em bactérias e em fungos (FOSTEL; LARTEY, 2000). Nozaka et al. (2019) ainda sugerem que o cloranfenicol possa ter um alvo molecular devido a interferência promovida na divisão celular e nos fatores de diferenciação do fungo *Magnaporthe oryzae*. No estudo desenvolvido por Joseph et al. (2015), os autores verificaram que o cloranfenicol foi efetivo na inibição da forma planctônica de algumas leveduras, incluindo *M. furfur*, em diferentes concentrações.

Entretanto, como também é ressaltado por Joseph et al. (2015), apesar do cloranfenicol ser um fármaco de fácil aquisição comercial existem relatos sobre graves efeitos adversos ao seu uso. Os principais malefícios incluem anemia aplástica, causada por alteração do funcionamento da medula com consequente redução da produção de glóbulos vermelhos e brancos e carcinogenicidade genotóxica (HANEKAMP; BAST, 2015; ROSENKRANZ, 1988).

São condições consideradas raras, em doses terapêuticas ou doses elevadas, e foram reportadas quando o cloranfenicol foi administrado por via intravenosa (DRAGO, 2019). Atualmente, o cloranfenicol é utilizado em colírios para o tratamento de infecções oculares (DRAGO, 2019; CAVE, 2021). Antibióticos anteriormente descartados da terapêutica devido a sua toxicidade, como cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, dentre outros, estão sendo reintroduzidos como forma de tratamento devido à alta resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos habitualmente utilizados (LIAQAT; SUMBAL; SABRI, 2009). Embora esses sejam fatores que possam despertar o interesse no desenvolvimento de formulações contendo cloranfenicol, ainda são necessários diversos estudos *in vitro* e *in vivo* para que seja comprovada a segurança desse fármaco nas concentrações ativas observadas no presente estudo.

Conclusões

Com exceção do fluconazol, todos os antimicrobianos avaliados apresentaram ação sobre a inibição e/ou erradicação do biofilme de *M. furfur*. Através das imagens geradas por MEV, foram observados os efeitos sobre a inibição/erradicação do biofilme, principalmente das amostras tratadas com o cloranfenicol. Apesar desse fármaco ser utilizado restritamente em formulações oftálmicas, estudos que abordem a sua ação anti-biofilme são importantes. Estratégias de eliminação de biofilmes são necessárias devido à dificuldade dos antimicrobianos agirem nessas estruturas em decorrência da sua fisiologia diferenciada e, principalmente, dos seus mecanismos de resistência.

Considerações finais

O presente trabalho contribui com informações sobre a ação de diferentes óleos essenciais (OEs) no tratamento da dermatite seborreica. Embora sejam relatadas as propriedades farmacológicas dessas substâncias no quadro clínico doença, as informações a respeito da ação sobre *Malassezia furfur* (principal agente etiológico) ainda são restritas. Pela primeira vez é relatada a ação antifúngica dos OEs de algumas espécies nativas contra *M. furfur* como *Achyrocline saturejoides*, *Cyperus articulatus*, *Elionurus muticus*, *Eugenia* sp., *Eugenia uniflora*, *Porophyllum ruderale* e *Xylopia aromatica*. Dentre essas espécies *A. saturejoides*, *C. articulatus* e *E. uniflora* também apresentaram efeitos na inibição e erradicação do biofilme de *M. furfur*. Esses resultados fornecem informações de compostos que podem auxiliar na remoção de biofilmes uma vez que, em vista da resistência aos antimicrobianos utilizados atualmente, existe uma grande dificuldade para a eliminação dessas estruturas.

Através da combinação dos OEs de três espécies (*C. martini*, *M. × piperita* e *V. curassavica*) foram observadas propriedades como o efeito antifúngico contra a forma planctônica e de biofilme de *M. furfur*, anti-inflamatória (através da redução dos níveis de TNF- α), não-mutagênica (sobre a bactéria *S. typhimurium*), conservante (observado na inibição do crescimento dos micro-organismos selecionados no *Challenge test*) e de não ser citotóxica (por não afetar a viabilidade celular de queratinócitos humanos e dos macrófagos derivados de medula óssea).

Com base nesses resultados, foram desenvolvidos um gel, uma loção e um xampu com a blenda de óleos essenciais (BOEs) selecionada além de métodos cromatográficos capazes de monitorar a presença da BOEs nas formulações. Com exceção da loção, as demais formulações permaneceram estáveis ao longo de todo o estudo de estabilidade acelerada. O interesse pelo desenvolvimento de formulações com princípios ativos naturais vêm crescendo ao longo dos anos. Especificamente no tratamento da dermatite seborreica, estudos com essa finalidade são importantes devido a cronicidade da doença. Dessa forma, o uso de produtos naturais é vantajoso devido ao seu baixo valor aquisitivo e por serem menos danosos ao meio ambiente e ao paciente, por apresentarem uma janela terapêutica segura em seres humanos.

Os antifúngicos sintéticos também são amplamente utilizados no tratamento da dermatite seborreica e, através dos resultados mostrados no presente estudo, também foi observado o efeito do cetoconazol, nistatina e cloranfenicol sobre a inibição e erradicação do biofilme de *M. furfur*. Investigações com esse objetivo também são importantes, visto que a literatura mostra apenas o efeito dessas substâncias sobre a forma planctônica de *M. furfur*. No

entanto, embora esses resultados sejam promissores, ainda são necessários mais estudos que comprovem a segurança clínica dessas substâncias para que haja, eventualmente, a sua incorporação no tratamento da dermatite seborreica.

Referências bibliográficas

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Pub Corp, 2007.
- AL BADI, K.; KHAN, S. A. Formulation, evaluation and comparison of the herbal shampoo with the commercial shampoos. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 301–305, 2014.
- ALQUADEIB, B. T. et al. Pharmaceutical evaluation of different shampoo brands in local Saudi market. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 98–106, 2018.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V. Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 405, 2020.
- ANDRADE, B. F. M. T. et al. *Cymbopogon martinii* essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1491–1496, 2014.
- ANGIOLELLA, L. et al. Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 110–116, 2018.
- ARRUDA, T. R. et al. Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. **Food Research International**, v. 156, p. 111160, 2022.
- AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. p. 396.
- BALEKUNDRI, A.; MANNUR, V. Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 67, 2020.
- BAPTISTA, E. B. **Estudo de estabilidade e eficácia de formulação tópica fitoterápica para tratamento de dermatofitose animal**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.
- BARBER, G. R. et al. Catheter-related *Malassezia furfur* fungemia in immunocompromised patients. **The American Journal of Medicine**, v. 95, n. 4, p. 365–370, 1993.
- BARRETT, M.; LUU, M. Differential diagnosis of atopic dermatitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 11–34, 2017.
- BASTING, R. T. et al. *Pterodon pubescens* and *Cordia verbenacea* association promotes a synergistic response in antinociceptive model and improves the anti-inflammatory results in

- animal models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108693, 2019.
- BAUMGARDNER, D. J. Fungal infections from human and animal contact. **Journal of Patient-Centered Research and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 78–89, 2017.
- BEDI, M. K.; SHENEFELT, P. D. Herbal therapy in dermatology. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 232–242, 2002.
- BEGGS, W. H.; ANDREWS, F. A.; SAROSI, G. A. Action of imidazole-containing antifungal drugs. **Life Sciences**, v. 28, n. 2, p. 111–118, 1981.
- BEN SALAH, I. et al. Les levures du genre *Malassezia*: pathologie, milieux d'isolement et d'identification. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, n. 1, p. 53–60, 2010.
- BICKERS, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 799–836, 2005.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, dez. 2006.
- BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 2016.
- BOAROLLI, J. T.; BENDER, S. Avaliação da estabilidade e concentração do xampu de cetoconazol manipulado em função do tempo comparado a um xampu comercial. **Fag Journal of Health**, v. 1, n. 1, p. 189–202, 2019.
- BOLUJOKO, N. B. et al. Toxicity and removal of parabens from water: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 792, p. 148092, 2021.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.
- BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 1 de 29 de julho de 2005**. Brasília: ANVISA, 2005.
- BRASIL. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2008.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, 5ª ed.** Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011.

- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26 de 13 de maio de 2014**. Brasília: ANVISA, 2014.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, 6ª ed.** Brasília: ANVISA, 2019a.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 318 de 6 de novembro de 2019**. Brasília: ANVISA, 2019b.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**, v. 220, p. 47–52, 2018.
- BUMROONGTHAI, K. et al. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 544–549, 2016.
- CAFARCHIA, C. et al. Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2011.
- CAFARCHIA, C. et al. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 743–748, 2015.
- CAO, Y. et al. Non-antibiotic antimicrobial agents to combat biofilm-forming bacteria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 85, p. 102702, dez. 2019.
- CARMO, E. S. et al. Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - therapeutic pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 381–385, 2013.
- CASTELI, V. C. et al. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 30, n. 2, p. 121–128, 2008.
- CAVE, J. A. Chloramphenicol eye drops, boron, infants and fertility. **Drug and Therapeutics Bulletin**, v. 59, n. 7, p. 98–98, 2021.
- CESA, S. et al. Phytochemical analyses and pharmacological screening of Neem oil. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 331–337, 2019.
- CHAIKRIPIPAT, W.; LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Anti-dandruff Hair Tonic Containing Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) Oil. **Complementary Medicine Research**, v. 22, n. 4, p. 226–229, 2015.
- CHEBIL, W. et al. Virulence factors of *Malassezia* strains isolated from *pityriasis versicolor* patients and healthy individuals. **Medical Mycology**, v. 60, n. 8, p. 1–7, 2022.
- CHEE, H. Y.; LEE, M. H. In vitro activity of celery essential oil against *Malassezia furfur*.

- Mycobiology**, v. 37, n. 1, p. 67, 2009.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol – A review update. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 1205–1219, 2022.
- CHENG, H.-M. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production by menthone through nuclear factor- κ B signaling pathway in HaCat cells. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 51, n. 3, p. 160–6, 2008.
- CHEONG, W. K. et al. Treatment of seborrhoeic dermatitis in Asia: a consensus guide. **Skin Appendage Disorders**, v. 1, n. 4, p. 187–196, 2016.
- CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- COCCHIARA, J. et al. Fragrance material review on cinnamaldehyde. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 867–923, 2005.
- ČONKOVÁ, E. et al. *In vitro* Biofilm Formation by *Malassezia pachydermatis* Isolates and Its Susceptibility to Azole Antifungals. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1209, 2022.
- CONSTABLE, D. J. C. Green and sustainable chemistry – The case for a systems-based, interdisciplinary approach. **iScience**, v. 24, n. 12, p. 103489, 2021.
- COSTA, P. S. B. et al. Single-species (bacterial, fungal, or mycobacterial) biofilms or dual-species (mycobacterial-fungal) biofilms formed in dialysis fluids. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 114870, jul. 2019.
- CUI, X. et al. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. **Journal of Infection and Public Health**, v. 15, n. 9, p. 986–1000, 2022.
- CURI, T. Z. Hair Diseases and Seborreic Dermatitis. In: **Comprehensive Gut Microbiota**. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 482–487.
- DATTNER, A. M. Seborrheic dermatitis. In: RAKEL, D. (Ed.). **Integrative medicine**. 4. ed. Filadélfia: Elsevier, 2017. p. 753–758.
- DEHSHEIKH, A. B. et al. Monoterpenes: Essential Oil Components with Valuable Features. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 958–974, 2020.
- DEL ROSSO, J. Q. Adult seborrheic dermatitis: A status report on practical topical management. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 4, n. 5, p. 32–38, 2011.
- DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A. Seborrheic dermatitis: etiology, risk factors, and treatments: facts and controversies. **Clinics In Dermatology**, v. 31, n. 4, p. 343–351, 2013.
- DIAS-SOUZA, M. V.; SOARES, D. L.; SANTOS, V. L. Comparative study of free and liposome-entrapped chloramphenicol against biofilms of potentially pathogenic bacteria isolated from cooling towers. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 7, p. 999–1004, 2017.

- DOLENC-VOLJČ, M. Diseases Caused by *Malassezia* Species in Human Beings. In: **The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 77–91.
- DONATO, R. et al. Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112376, 2020.
- DOWNS, C. A. et al. Parabens preferentially accumulate in metastatic breast tumors compared to benign breast tumors and the association of breast cancer risk factors with paraben accumulation. **Environmental Advances**, v. 11, p. 100325, 2023.
- DRAELOS, Z. D. Shampoos, Conditioners, and Camouflage Techniques. **Dermatologic Clinics**, v. 31, n. 1, p. 173–178, 2013.
- DRAGO, L. et al. *In vitro* evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 111, 2007.
- DRAGO, L. Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 278, 2019.
- DREGER, M.; WIELGUS, K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. **Herba Polonica**, v. 59, n. 4, p. 142–156, 2013.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 7, p. 1–16, 2006.
- DUQUE, M. D. et al. Avaliação das propriedades físico-químicas de preparações farmacêuticas contendo cetoconazol para uso tópico. **HU Revista**, v. 39, n. 3 e 4, p. 45–49, 2013.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308–323, abr. 2007.
- EL-TARABILY, K. A. et al. Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 5145–5156, 2021.
- EL ATKI, Y. et al. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 10, n. 2, p. 63, 2019.
- EL AZAB, E. F. et al. New insights into geraniol's antihemolytic, anti-inflammatory, antioxidant, and anticoagulant potentials using a combined biological and in silico screening strategy. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 1811–1833, 2022.
- ERHABOR, C. R.; ERHABOR, J. O.; MCGAW, L. J. The potential of South African

- medicinal plants against microbial biofilm and quorum sensing of foodborne pathogens: A review. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 214–231, 2019.
- FANG, K.; PARK, O.-J.; HONG, S. H. Controlling biofilms using synthetic biology approaches. **Biotechnology Advances**, v. 105, p. 107518, 2020.
- FERHOUT, H. et al. Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 1, p. 119–129, jan. 1999.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FERRAZ DE MELO, A. L. et al. From the environment to the hospital: How plants can help to fight bacteria biofilm. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127074, 2022.
- FERREIRA, A. O. Xampus, condicionadores e cremes rinses. In: **Guia Prático da Farmácia Magistral - volume 1**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 641.
- FIGUEREDO, L. A. et al. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1–2, p. 126–131, 2012.
- FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**, v. 51, n. 8, p. 863–867, 2013.
- FORMARIZ, T. P. et al. Dermatite seborréica: causa, diagnóstico e tratamento. **Infarma**, v. 16, n. 13–14, p. 77–80, 2005.
- FOSTEL, J. M.; LARTEY, P. A. Emerging novel antifungal agents. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 1, p. 25–32, 2000.
- FRAMIL, V. M. S. et al. Pitiríase versicolor circinada: isolamento de *Malassezia sympodialis* - relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 227–228, 2010.
- FRATINI, F. et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v. 195, p. 11–17, 2017.
- FU, Y. et al. Geraniol relieves mycoplasma pneumonia infection-induced lung injury in mice through the regulation of ERK/JNK and NF-κB signaling pathways. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 1–9, 2022.
- GAJIC, I. M. S.; BOSKOV, I. A.; SAVIC, I. M. Black locust flowers as a natural source of antioxidants: Sustainable production of high-quality oil from plum by-product and its incorporation in the moisturizing cream. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 3, p. 100135, 2021.

- GALVIS-MARÍN, J. C. et al. Actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p. 89–93, 2017.
- GARCEZ, F. R. et al. A diversidade dos constituintes químicos da flora de Mato Grosso do Sul e sua relevância como fonte de substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97–129, 2016.
- GHOLAMIPOURFARD, K.; SALEHI, M.; BANCHIO, E. *Mentha piperita* phytochemicals in agriculture, food industry and medicine: Features and applications. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 183–195, 2021.
- GLOAG, E. S. et al. Biofilm mechanics: implications in infection and survival. **Biofilm**, v. 2, p. 100017, 2020.
- GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 176–179, 2001.
- GOLD, M. H. et al. An open-label study of naftifine hydrochloride 1% gel in the treatment of seborrheic dermatitis of the scalp. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 2, p. AB41, 2011.
- GOLDENBERG, G. Optimizing treatment approaches in seborrheic dermatitis. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 6, n. 2, p. 44–49, 2013.
- GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37–52, 2018.
- GONTAR, L.; HERMAN, A.; OSINSKA, E. Monarda essential oils as natural cosmetic preservative systems. **Natural Volatiles and Essential Oils**, v. 8, n. 1, p. 29–38, 2021.
- GREEN, C. A.; FARR, P. M.; SHUSTER, S. Treatment of seborrhoeic dermatitis with ketoconazole: II. Response of seborrhoeic dermatitis of the face, scalp and trunk to topical ketoconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 116, n. 2, p. 217–221, 1987.
- GRICE, E. A.; DAWSON, T. L. Host–microbe interactions: *Malassezia* and human skin. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 81–87, 2017.
- GUIL-GUERRERO, J. L. et al. Antimicrobial activity of plant-food by-products: a review focusing on the tropics. **Livestock Science**, v. 189, p. 32–49, 2016.
- GUO, Y. et al. Absolute Antioxidant Activity of Five Phenol-Rich Essential Oils. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5237, 2021.
- GUPTE, T. E.; GAIKWAD, U. V.; NAIK, S. R. Experimental studies (*in vitro*) on polyene

macrolide antibiotics with special reference to hamycin against *Malassezia ovale*.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 22, n. 2, p. 93–102, 1999.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 3, p. 574–584, 2018.

HAMAN, C. et al. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Research**, v. 68, p. 1–11, 2015.

HANEKAMP, J. C.; BAST, A. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 213–220, 2015.

HAU, C. S. et al. Immunoresponses in dermatomycoses. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 236–244, 2015.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SANTOS, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167.

HERMAN, A. et al. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 232–237, 2013.

HUGHES, G. D. et al. The role and importance of economic evaluation of traditional herbal medicine use for chronic non-communicable diseases. **Comparative Effectiveness Research**, v. 5, p. 49–55, 2015.

IATTA, R. et al. The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 178–182, 2016.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

JAFFAR, N. Bacterial Biofilm and the Medical Impact. In: **Focus on Bacterial Biofilms**. London: IntechOpen, 2022. v. 11p. 13.

JERZSELE, Á. et al. Biofilm formation in *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 62, n. 4, p. 473–480, 2014.

JOHNSON, B. A.; NUNLEY, J. R. Treatment of seborrheic dermatitis. **American Family Physician**, v. 61, n. 9, p. 2703–2710, 2000.

JOSEPH, M. R. P. et al. *In vitro* anti-yeast activity of chloramphenicol: A preliminary report.

Journal de Mycologie Médicale, v. 25, n. 1, p. 17–22, 2015.

JU, J. et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging.

Trends in Food Science & Technology, v. 92, n. 1800, p. 22–32, 2019.

KACZMARCZYK, D. et al. Selected Essential Oils in Cosmetic Emulsions: Process Oriented Stability Studies and Antimicrobial Activity. **Nat. Volatiles & Essent. Oils**, v. 2, n. 4, p. 27–39, 2015.

KANEKO, T. et al. Genetic and biological features of catheter-associated *Malassezia furfur* from hospitalized adults. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 74–80, 2012.

KHOSRAVI, A. R. et al. Comparative study on the effects of a new antifungal lotion (*Artemisia sieberi* essential oil) and a clotrimazole lotion in the treatment of pityriasis versicolor. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, n. 1, p. 17–21, 2009.

KHUNKITTI, W.; VEERAPAN, P.; HAHNVAJANAWONG, C. *In vitro* bioactivities of clove buds oil (*Eugenia caryophyllata*) and its effect on dermal fibroblast. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 3–7, 2012.

KIM, M. H.; PARK, S. J.; YANG, W. M. Inhalation of Essential Oil from *Mentha piperita* Ameliorates PM10-Exposed Asthma by Targeting IL-6/JAK2/STAT3 Pathway Based on a Network Pharmacological Analysis. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1, p. 2, 2020.

KOHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–22, 1 jan. 2015.

KOUASSI, M. C.; GRISEL, M.; GORE, E. Multifunctional active ingredient-based delivery systems for skincare formulations: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 217, p. 112676, 2022.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 145–151, 2009.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LEE, J. H.; LEE, J. S. Chemical composition and antifungal activity of plant essential oils against *Malassezia furfur*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 315–321, 2010.

LEITE, G. M. L. et al. Pharmacological and toxicological activities of α -humulene and its

isomers: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 255–274, 2021.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563–569, 2002.

LERTSATITTHANAKORN, P. et al. Formulation development of hair rinse cream from lemongrass oil added with various fixatives: case study in lock of hair. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 17, n. 1, p. 297–301, 2017.

LI, Y. et al. *In vitro* antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1675–1683, 2017.

LIANG, J. et al. Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 6, p. 100210, 2023.

LIAQAT, I.; SUMBAL, F.; SABRI, A. N. Tetracycline and Chloramphenicol Efficiency Against Selected Biofilm Forming Bacteria. **Current Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 212–220, 2009.

LIMA, G. C. G.; COMARELLA, L. Sugestão de desenvolvimento de formulações de xampu-sabonete auxiliar no tratamento de dermatite seborréica. **Revista Uniandrade**, v. 13, n. 2, p. 160–174, 2012.

LIZCANO, N. R. **Combate à adesão de bactérias patogênicas: busca por compostos ativos oriundos de micro-organismos associados ao gênero *Drosera***. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

LOMBARDI, A.; OUANOUNOU, A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 5, p. 533–546, 2020.

LOPES, E. M. X.; CASTILHO, F. L. M.; CASTRO, V. C. F. Análises de qualidade de xampus de Cetoconazol 2% manipulados em farmácias magistrais de Porto Velho, RO, Brasil. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 31, n. 3, p. 155–176, 2019.

LOURENÇO, E. A. D.; LYRA, M. A. M. M. Desenvolvimento e estudo de estabilidade de xampu anti-caspa a base de piritionato de zinco 2%. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2015.

LU, J.; HU, X.; REN, L. Biofilm control strategies in food industry: Inhibition and utilization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 123, p. 103–113, 2022.

- MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw Hill, 2011. p. 1527.
- MAGOUZ, F. I. et al. Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 530, p. 735944, 2021.
- MANGION, S. E. et al. Seborrheic dermatitis: topical therapeutics and formulation design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 185, p. 148–164, 2023.
- MARCON, M. J.; POWELL, D. A. Epidemiology, diagnosis, and management of *Malassezia furfur* systemic infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 7, n. 3, p. 161–175, 1987.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, 1983.
- MARRIOTT, C. Reologia. In: **Auton delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 88.
- MARTIM, J. K. P.; MARANHO, L. T.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Review: Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti-inflammatory, antimicrobial and healing product. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113300, 2021.
- MASYITA, A. et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.
- MELO, C. A. S.; DOMINGUES, R. J. S.; LIMA, A. B. **Elaboração de Géis e Análise de Estabilidade de Medicamentos**. Belém: Editora da Universidade do Estado do Pará, 2018.
- MICALI, G. et al. Treatment of cradle cap in infants with a new cosmetic non-steroidal gel cream: Clinical, laboratory, and instrumental evaluation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. S1, p. 14–17, abr. 2021.
- MILAN, A. L. K. et al. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 649–657, 2007.
- MIMOUNI, K. et al. Prognosis of infantile seborrheic dermatitis. **The Journal of Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 744–746, 1995.
- MODARRESI, M.; FARAHPOUR, M. R.; BARADARAN, B. Topical application of *Mentha*

piperita essential oil accelerates wound healing in infected mice model.

Inflammopharmacology, v. 27, n. 3, p. 531–537, 2019.

MOKOS, Z. B. et al. Seborrheic dermatitis: an update. **Acta Dermatovenereologica Croatica**, v. 20, n. 2, p. 98–104, 2012.

MOLONEY, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 689–701, 2016.

MONIR, R. L.; SCHOCH, J. J. Clinical Relevance of the Microbiome in Pediatric Skin Disease: A Review. **Dermatologic Clinics**, v. 40, n. 2, p. 117–126, 2022.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 2000.

MUYIMA, N. Y. O. et al. The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 4, p. 258–266, 2002.

NAIMI, A. et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as the potential therapeutic target in hematological malignancies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 566–576, 2018.

NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 337–341, 2000.

NARDONI, S. et al. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia* dermatitis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 3, p. 234–240, 2014.

NISAR, B.; SULTAN, A.; RUBAB, S. L. Comparison of Medicinally Important Natural Products versus Synthetic Drugs-A Short Commentary. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 6, n. 2, 2018.

NÓBREGA, L. K. S.; ANDRADE-JÚNIOR, F. P.; CARMO, E. S. Essential oils with effect on *Malassezia* spp.: an integrative review. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, n. 2, p. 43–55, 2019.

NOWAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; RATAJCZAK-WRONA, W. Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. **Environmental Research**, v. 198, p. 110488, 2021.

NOZAKA, A. et al. Chloramphenicol inhibits eukaryotic Ser/Thr phosphatase and infection-specific cell differentiation in the rice blast fungus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9283,

2019.

OH, J. Y.; PARK, M. A.; KIM, Y. C. Peppermint Oil Promotes Hair Growth without Toxic Signs. **Toxicological Research**, v. 30, n. 4, p. 297–304, 2014.

OLIVEIRA, C. R. et al. Brazilian essential oil of *Cymbopogon martini* (Poaceae): positive effects on inflammation-induced human fibroblasts and skin aging. **Revista Fitos**, v. 15, n. 4, p. 444–455, 2021.

OLIVEIRA, M. A. et al. Avaliação da estabilidade e atividade antifúngica de formulações de xampu anticaspa contendo piritionato de zinco e a influência da adição de extratos vegetais. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 6, n. 1, p. 1–21, 2013.

OMAR, Z. A. et al. Recent progress in eco-synthesis of essential oil-based nanoparticles and their possible mechanisms. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115322, 2022.

ÖNEM, E. New green solutions against bacterial resistance: palmarosa (*Cymbopogon martini*) essential oil and quorum sensing. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 25, p. 100587, 2022.

ORTEGA-CUADROS, M. et al. Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil on *Streptococcus mutans* biofilm and cytotoxic effect on keratinocytes and fibroblasts. **Revista de Biología Tropical**, v. 66, n. 4, p. 1519, 2018.

ORTONNE, J. P. et al. Efficacious and safe management of moderate to severe scalp seborrhoeic dermatitis using clobetasol propionate shampoo 0,05% combined with ketoconazole shampoo 2%: a randomized, controlled study. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 1, p. 171–176, 2011.

PARRINO, B. et al. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 154–178, 2019.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PATEL, V. M.; SCHWARTZ, R. A.; LAMBERT, W. C. Topical antiviral and antifungal medications in pregnancy: a review of safety profiles. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, n. 9, p. 1440–1446, 2017.

PATHAKUMARI, B.; LIANG, G.; LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110550, 2020.

PAULINO, B. N. et al. Beyond natural aromas: The bioactive and technological potential of monoterpenes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 128, p. 188–201, 2022.

PEDROSA, A. F.; LISBOA, C.; RODRIGUES, A. G. *Malassezia* infections: A medical

- conundrum. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 1, p. 170–176, 2014.
- PEREIRA, G. DO C. et al. Análise da estabilidade de um shampoo produzido com adição de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 13, n. 1, p. 2–7, 2020.
- PEYRÍ, J.; LLEONART, M. Clinical and Therapeutic Profile and Quality of Life of Patients With Seborrheic Dermatitis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 98, n. 7, p. 476–482, 2007.
- PIMENTEL, S. P. et al. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 224, 2012.
- PINTAS, S. K.; QUAVE, C. L. A Review of Botanicals Exhibiting Antifungal Activity Against *Malassezia* spp. Implicated in Common Skin Conditions. **Current Dermatology Reports**, v. 8, n. 4, p. 279–296, 2019.
- POMBO, J. C. P. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108–117, 2018.
- PRASAD, C. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 123–129, 2009.
- PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 39, n. 4, p. 241–248, 2006.
- PREDA-NAUMESCU, A.; ELEWSKI, B.; MAYO, T. T. Common Cutaneous Infections: Patient Presentation, Clinical Course, and Treatment Options. **Medical Clinics of North America**, v. 105, n. 4, p. 783–797, 2021.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309–318, 2015.
- PROHIC, A. et al. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 5, p. 494–504, 2016.
- PROŠKOVCOVÁ, M. et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the Lamiaceae family against *Candida albicans* clinical isolates. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 28, n. 2, p. 260–266, 2021.
- RAHROVAN, S. et al. Male versus female skin: What dermatologists and cosmeticians should know. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 122–130, set.

2018.

RAJ, V. D. The study on consumer preference towards various brand of shampoo is confined in trichy. **Shaniax International Journal of Commerce**, v. 4, n. 2, p. 27–36, 2016.

RAMAKRISHNAN, R. et al. Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 9, p. 102352, 2022.

RAMOS-E-SILVA, M.; SAMPAIO, A. L.; CARNEIRO, S. Red face revisited: endogenous dermatitis in the form of atopic dermatitis and seborrheic dermatitis. **Clinics In Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 109–115, 2014.

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

RAY, C. et al. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 19, 2017.

RAZDAN, K. et al. Pharmaceutical strategies for the treatment of bacterial biofilms in chronic wounds. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2137–2150, 2022.

RHIMI, W. et al. Antifungal, Antioxidant and Antibiofilm Activities of Essential Oils of *Cymbopogon* spp. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 829, 2022.

RO, B. I.; DAWSON, T. L. The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 3, p. 194–197, 2005.

ROJAS, F. D. et al. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. **Medical Mycology**, v. 52, n. 6, p. 641–646, 2014.

ROMALD, P. N. et al. Epidemiological Pattern of *Malassezia*, its Phenotypic Identification and Antifungal Susceptibility Profile to Azoles by Broth Microdilution Method. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 38, n. 3–4, p. 351–356, 2020.

ROMANHOLE, R. C. et al. Unplanned absorption of sunscreen ingredients: Impact of formulation and evaluation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 591, p. 120013, 2020.

ROSENKRANZ, H. S. Chloramphenicol: Magic bullet or double-edge sword? **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 196, n. 1, p. 1–16, 1988.

ROZZA, A. L. et al. The Use of Menthol in Skin Wound Healing—Anti-Inflammatory Potential, Antioxidant Defense System Stimulation and Increased Epithelialization. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1902, 2021.

- SALAKHUTDINOV, N. F.; VOLCHO, K. P.; YAROVAYA, O. I. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds. **Pure and Applied Chemistry**, v. 89, n. 8, p. 1105–1117, 2017.
- SAMPAIO, A. L. S. B. et al. Dermatite seborreica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1061–1074, 2011.
- SANTANA, A. S. et al. Synergism between essential oils: A promising alternative to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection**, v. 153, p. 105882, 2022.
- SANTOMAURO, F. et al. Liquid and vapor-phase activity of *Artemisia annua* essential oil against pathogenic *Malassezia* spp. **Planta Medica**, v. 84, n. 03, p. 160–167, 6 fev. 2018.
- SCACHETI, L. F. et al. Controle de qualidade e análise sensorial em voluntários de xampu esfoliante com extrato hidroalcoólico de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 32, n. 3, p. 369–374, 2011.
- SCALISE, A. et al. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 28, n. 3–4, p. 151–159, 2015.
- SHARMA, A.; RABHA, D.; AHMED, G. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia* isolates from pityriasis versicolor lesions. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 83, n. 2, p. 249, 2017.
- SHREYA, K.; KALPANA, P. Development of polyherbal shampoo for antifungal activity and its comparison with commercially available shampoo: A research article. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. S1021–S1027, 2018.
- SIBI, D.; SILVANOSE, C.; JIBIN, V. Role of *Malassezia furfur* and *M. globosa* in Dandruff and Seborrheic Dermatitis. **J Clin Investigat Dermatol**, v. 11, n. 1, p. 1–4, 2023.
- SIENKIEWICZ, M. et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. **Burns**, v. 43, n. 2, p. 310–317, 2017.
- SILVA, D. A. et al. Avaliação da qualidade de xampus anticaspa. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 3, p. 158–167, 2018.
- SILVA, F. V. F. et al. Development and quality control of an anti-acne gel-cream obtained from the essential oil of *Copaífera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 30, n. e974, p. 1–10, 2019.
- SILVEIRA, M. Preparo de Amostras Biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura. In: **Técnicas de Microscopia Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Editora SBMM, 2015. p. 53–59.
- SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis,

- regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129–151, 2015.
- SINGH, P. A. et al. An overview of some important deliberations to promote medicinal plants cultivation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 31, p. 100400, 2022.
- SIVASANKAR, C. et al. Evaluation of selected Indian medicinal plants for antagonistic potential against *Malassezia* spp. and the synergistic effect of embelin in combination with ketoconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 66–72, 2017.
- SORIA, A. C.; GARCÍA-SARRIÓ, M. J.; SANZ, M. L. Volatile sampling by headspace techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 85–99, 2015.
- SPARBER, F. et al. The Skin Commensal Yeast *Malassezia* Triggers a Type 17 Response that Coordinates Anti-fungal Immunity and Exacerbates Skin Inflammation. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 3, p. 389–403.e6, 2019.
- STEFANAKI, I.; KATSAMBAS, A. Therapeutic update on seborrheic dermatitis. **Skin Therapy Letter**, v. 15, n. 5, p. 1–4, 2010.
- SU, Y. H.; LIN, J. Y. Menthone supplementation ameliorates systemic allergic inflammation in asthmatic mice via regulating Th2-skewed immune balance. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 3, p. 100322, 2022.
- SUBRAMANIAN, S. et al. Microsystems for biofilm characterization and sensing – A review. **Biofilm**, v. 2, p. 100015, dez. 2020.
- SUZUKI, T. et al. Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 157–162, 2000.
- SWANSON, E. A. Updates in the Use of Antibiotics, Biofilms. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, n. 2, p. e1–e19, 2022.
- SZEPIETOWSKI, J. C. et al. Quality of life in patients suffering from seborrheic dermatitis: influence of age, gender and education level. **Mycoses**, v. 52, n. 4, p. 357–363, 2009.
- TAFRIHI, M. et al. The Wonderful Activities of the Genus *Mentha*: Not Only Antioxidant Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1118, 2021.
- TEIXEIRA, R. F.; BALBINOT FILHO, C. A.; BORGES, C. D. Essential oils as natural antimicrobials for application in edible coatings for minimally processed apple and melon: A review on antimicrobial activity and characteristics of food models. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 31, p. 100781, 2022.
- THANGARAJU, P.; VARTHYA, S. B. ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices. In: **Medical Device Guidelines and Regulations Handbook**. 2005. ed. Cham:

Springer International Publishing, 2022. p. 163–187.

THEELEN, B. et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, v. 56, p. S10–S25, 2018.

THEURETZBACHER, U.; PAUL, M. Revival of old antibiotics: structuring the re-development process to optimize usage. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 878–880, 2015.

TIAN, C. et al. Old fusidane-type antibiotics for new challenges: Chemistry and biology. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 20, n. 2, p. 81–101, 2022.

TIT, D. M.; BUNGAU, S. G. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 383, 2023.

TONIAL, C. H. et al. Technical and economic evaluation of cultivation and obtaining of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112650, 2020.

TRETER, J.; MACEDO, A. J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 835–842, 2011.

TRIANA, S. et al. Draft genome sequence of the animal and human pathogen *Malassezia pachydermatis* strain CBS 1879. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 5–6, 2015.

TRUBENOVÁ, B. et al. Population genetics, biofilm recalcitrance, and antibiotic resistance evolution. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 841–852, 2022.

TSAI, M.-L. et al. Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1977–1983, 2011.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.

VELEGRAKI, A. et al. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3589–3593, 2004.

VENTUROSIO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18–23, 2011.

VERMA, R. S. et al. Essential oil composition of the sub-aerial parts of eight species of *Cymbopogon* (Poaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 111839, 2019.

VICTOIRE, A. et al. Interventions for infantile seborrhoeic dermatitis (including cradle cap).

Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 2019, n. 3, 2019.

VINCIGUERRA, V. et al. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 22, p. 3273–3277, 2018.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. The role of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 1, p. 117–121, 2007.

VIVEIROS, M. M. H. et al. Anti-inflammatory effects of α -humulene and β -caryophyllene on pterygium fibroblasts. **International Journal of Ophthalmology**, v. 15, n. 12, p. 1903–1907, 2022.

VLASSOVA, N. et al. New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 4, p. 751–759, 27 out. 2011.

VU, T. X. et al. Chemical compositions and Anti-*malassezia* properties of Vietnamese *Mentha arvensis* and *Piper betle* essential oils. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 17, n. 4, p. 1619–1630, 2021.

VYAS, T. et al. Bacterial biofilms associated skin disorders: Pathogenesis, advanced pharmacotherapy and nanotechnology-based drug delivery systems as a treatment approach. **Life Sciences**, v. 287, p. 120148, 2021.

WADE, S. A. et al. The role of standards in biofilm research and industry innovation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 177, p. 105532, 2023.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Springer, 1996.

WALLER, S. B. et al. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 232–237, 2017.

WANG, K. et al. Susceptibilities of *Malassezia* strains from pityriasis versicolor, *Malassezia* folliculitis and seborrheic dermatitis to antifungal drugs. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04203, 2020.

WIGGER-ALBERTI, W.; KLUGE, K.; ELSNER, P. Clinical effectiveness and tolerance of climbazole containing dandruff shampoo in patients with seborrheic scalp eczema. **Praxis**, v. 90, n. 33, p. 1346–1349, 2001.

WIKRAMANAYAKE, T. C. et al. Seborrheic dermatitis—Looking beyond *Malassezia*. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 9, p. 991–1001, 2019.

WUTHI-UDOMLERT, M. et al. Inhibitory effect of formulated lemongrass shampoo on *Malassezia furfur*: A yeast associated with dandruff. **Southeast Asian Journal of Tropical**

Medicine and Public Health, v. 42, n. 2, p. 363–369, 2011.

YAP, P. S. X. et al. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, p. 6–14, 2014.

YOUNG, B. K.; BRODELL, R. T.; COOPER, K. D. Xampus terapêuticos. In: WOLVERTON, S. E. (Ed.). **Terapêutica Dermatológica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 566.

ZANK, S.; ÁVILA, J. V. C.; HANAZAKI, N. Compreendendo a relação entre saúde do ambiente e saúde humana em comunidades Quilombolas de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 157–167, 2016.

ZAREEI, M. et al. Evaluation of the Ability of *Malassezia* Species in Biofilm Formation. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. e62223, 2018.

ZAYYAD, H. et al. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 536–541, 2017.

ZHANG, Y.-J. et al. Extracellular vesicles derived from *Malassezia furfur* stimulate IL-6 production in keratinocytes as demonstrated in *in vitro* and *in vivo* models. **Journal of Dermatological Science**, v. 93, n. 3, p. 168–175, 2019.

Apêndice A

Tabela A1. Rendimento em OEs das plantas medicinais e aromáticas estudadas que não apresentaram atividade antifúngica frente a levedura *M. furfur*

Espécie	Parte utilizada	Rendimento (%)*
<i>A. gratissima</i>	Inflorescência	0,72
<i>A. annua</i>	Folha	0,45
<i>B. crispa</i>	Folha	0,58
<i>B. orellana</i>	Semente	2,30
<i>C. aurantiifolia</i>	Fruto	-
<i>C. langsdorffii</i>	Caule	-
<i>C. sativum</i>	Semente	-
<i>C. citriodora</i>	Folha	-
<i>E. globulus</i>	Folha	2,44
<i>E. staigeriana</i>	Folha	-
<i>E. florida</i>	Folha	0,31
<i>I. verum</i>	Fruto	-
<i>L. alba</i>	Folha	1,60
<i>M. alternifolia</i>	Folha	-
<i>P. microphyllus</i>	Folha	0,40
<i>P. anisum</i>	Folha	-
<i>S. chamaecyparissus</i>	Inflorescência	0,15
<i>V. curassavica</i>	Folha	1,03

* Relação massa de planta (g) / massa de óleo essencial (g)

Apêndice B

Tabelas B1. Composição química dos OEs que apresentaram atividade inibitória no crescimento de *M. furfur* e do óleo de *V. curassavica* obtido por CG-EM. #: número do pico; tR (min): tempo de retenção em minutos; IR cal.: índice de retenção calculado com base a uma série de *n*-alcanos; IR lit.: índice de retenção com base na literatura (ADAMS, 2007)

A. saturejoides

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,48	α -Pineno	29,65	936	932
3	5,78	Canfeno	0,33	947	946
4	6,50	β -Pineno	0,30	975	974
5	7,91	<i>p</i> -Cimeno	0,43	1022	1020
6	8,06	D-Limoneno	0,80	1026	1024
7	8,14	Eucaliptol	0,71	1029	1026
8	8,34	β - <i>cis</i> -Ocimeno	0,67	1034	1032
9	21,87	α -Copaeno	4,74	1374	1374
10	23,79	β -Cariofileno	26,11	1420	1417
11	24,40	β -Gurjuneno	1,37	1436	1431
12	25,11	α -Cariofileno	15,09	1453	1452
13	25,29	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,89	1458	1458
14	25,94	γ -Gurjuneno	2,23	1474	1475
15	26,29	β -Selineno	1,78	1483	1489
16	26,65	δ -Selineno	1,96	1492	1492
17	26,87	α -Muuroleno	1,29	1497	1500
18	27,40	δ -Amorfeno	1,63	1511	1511
19	27,81	δ -Cadineno	3,62	1521	1522
20	28,19	Zonareno	0,72	1531	1528
21	28,30	α -Cadineno	0,40	1534	1537
22	28,44	Selina-3,7(11)-diene	1,13	1538	1545
23	30,01	Óxido de cariofileno	2,24	1578	1582

B. dracunculifolia

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,39	α -Pineno	1,34	932	932
3	6,51	β -Pineno	1,81	976	974
4	6,86	β -Mirceno	0,27	989	988
5	8,07	D-Limoneno	3,59	1027	1024
6	20,74	α -Cubeno	0,74	1346	1348
7	21,82	α -Copaeno	0,81	1372	1374
8	22,51	β -Elemeno	0,67	1389	1389

9	23,21	α -Gurjuneno	0,71	1406	1409
10	23,66	Cariofileno	8,34	1417	1417
11	23,98	β -Copaeno	0,63	1425	1430
12	24,39	Aromadendreno	2,22	1435	1439
13	24,85	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-diene	0,54	1447	1448
14	24,97	α -Humuleno	2,02	1450	1452
15	25,22	<i>allo</i> -Aromadendreno	1,35	1456	1458
16	25,33	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	0,79	1459	1465
18	25,99	γ -Muurolo	2,56	1475	1478
19	26,16	Amorpha-4,7(11)-diene	8,36	1480	1479
20	26,22	<i>m/z</i> 204	0,88	1481	-
21	26,31	α -Amorfen	0,68	1483	1483
22	26,51	<i>epi</i> -Biciclosesquifelandreno	0,66	1488	1493
24	26,89	α -Muurolo	1,55	1498	1500
27	27,42	δ -Amorfen	2,52	1511	1511
28	27,84	δ -Cadineno	7,42	1522	1522
29	28,29	α -Cadineno	0,50	1534	1537
30	28,49	α -Calacoreno	0,52	1539	1544
31	29,59	<i>cis</i> -Nerolidol	18,07	1567	1561
32	29,99	Espatuleno	11,15	1578	1577
34	30,80	<i>m/z</i> 204	0,83	1599	-
35	31,03	<i>m/z</i> 204	0,63	1605	-
36	31,72	<i>epi</i> -Cubenol	0,46	1624	1627
38	32,23	<i>epi</i> - α -Muurolo	0,96	1638	1640
39	32,68	α -Cadinol	0,82	1650	1652

C. cassia

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,38	1R- α -Pineno	0,07	933	932
3	5,76	Canfeno	0,05	947	946
4	6,02	Benzaldeído	0,73	958	952
5	8,50	Salicilaldeído	0,20	1040	1039
6	11,02	<i>m/z</i> 122	0,59	1115	-
8	13,08	Borneol	0,11	1165	1165
9	16,23	<i>o</i> -Anisalaldeído	0,60	1239	1239
11	17,66	<i>trans</i> -Cinamalaldeído	85,04	1273	1270
13	18,94	Álcool cinamílico	0,15	1300	1303
15	21,80	α -Copaeno	0,23	1372	1374
16	24,18	Cumarina	1,09	1429	1432
17	24,64	Acetato cinamílico	1,61	1441	1443
19	27,72	δ -Cadinene	0,13	1516	1522
20	28,09	<i>o</i> -Metoxi cinamalaldeído	8,95	1526	1527
21	29,31	<i>trans</i> -Nerolidol	0,11	1560	1561

C. verum

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
1	5,20	α -Tujeno	0,04	925	924
2	5,38	α -Pineno	0,52	932	932
3	5,75	Canfeno	0,18	947	946
4	6,03	Benzaldeído	0,10	958	952
5	6,48	β -Pineno	0,16	975	974
6	6,84	β -Mirceno	0,06	989	988
7	7,27	α -Feladreno	0,61	1004	1002
8	7,64	α -Terpineno	0,08	1015	1014
9	7,89	<i>p</i> -Cimeno	0,67	1022	1020
13	13,55	4-Terpineol	0,08	1174	1174
15	17,42	<i>trans</i> -Cinamaldeído	1,10	1268	1267
16	18,15	Safrol	1,11	1285	1285
17	21,06	Eugenol	81,07	1355	1356
19	21,87	α -Copaeno	0,59	1374	1374
20	23,60	β -Cariofileno	2,96	1417	1417
21	24,62	Acetato cinamílico	1,40	1442	1443
22	24,93	α -Humuleno	0,53	1450	1452
23	26,58	Viridifloreno	0,09	1491	1496
24	27,71	δ -Cadineno	0,14	1520	1522
25	27,93	Acetato de eugenol	2,16	1526	1521
26	29,94	Óxido de cariofileno	0,56	1578	1582
27	36,53	Benzoato de benzila	3,08	1760	1759

C. citratus

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
3	5,39	α -Pineno	0,09	932	932
4	5,76	Canfeno	0,50	947	946
6	6,86	Mirceno	0,22	989	988
7	8,05	Limoneno	0,62	1026	1024
8	8,33	β - <i>cis</i> -Ocimeno	0,17	1034	1032
9	8,69	β - <i>trans</i> -Ocimeno	0,10	1044	1044
10	9,53	<i>m/z</i> 142	0,56	1069	-
11	10,56	Linalol	1,82	1098	1095
13	12,62	Citronelal	0,52	1150	1148
21	15,72	Citronelol	0,34	1226	1223
22	16,18	Neral	31,32	1238	1235
23	16,87	Geraniol	7,85	1254	1249
24	17,42	Geranial	40,40	1267	1264
27	22,25	Acetato de geranila	4,51	1383	1379
28	23,60	<i>trans</i> -Cariofileno	2,07	1415	1417
29	24,80	<i>trans</i> -Isoeugenol	0,22	1446	1448
30	24,94	α -Humuleno	0,26	1449	1452

32	27,38	δ -Amorfenos	1,23	1510	1511
33	27,74	δ -Cadineno	0,31	1520	1522
35	29,98	Óxido de cariofileno	1,13	1577	1582

C. martini

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	6,77	Mirceno	0,23	989	988
3	8,24	β -cis-Ocimeno	0,53	1034	1032
4	8,59	β -trans-Ocimeno	1,65	1045	1044
5	10,44	Linalol	1,71	1099	1095
6	16,72	Geraniol	79,12	1253	1249
7	17,33	Geranial	0,35	1268	1264
8	22,13	Acetato de geranila	10,12	1383	1379
9	23,44	Cariofileno	2,23	1411	1417

C. winterianus

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
1	7,96	D-Limoneno	2,95	1027	1024
2	10,44	Linalol	0,76	1099	1095
3	12,20	Isopulegol	0,40	1143	1145
4	12,66	Citronelal	40,76	1157	1148
5	15,69	Citronelol	13,81	1229	1223
6	16,10	Neral	0,31	1239	1235
7	16,83	Geraniol	18,78	1256	1249
8	17,35	Geranial	0,45	1268	1264
9	18,31	Timol	0,22	1291	1289
10	20,82	<i>m/z</i> 198	2,81	1351	-
11	20,93	Eugenol	1,13	1353	1356
12	22,07	Acetato de geranila	1,94	1381	1379
13	22,36	β -Elemeno	0,43	1388	1389
14	25,91	Germacreno D	2,58	1476	1480
16	26,70	α -Muuroleno	0,38	1496	1500
19	27,60	δ -Cadineno	1,71	1519	1522
20	28,60	Elemol	2,30	1545	1548
23	31,66	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	0,40	1626	1622
24	32,05	<i>epi</i> - α -Muurolol	1,27	1636	1640
26	32,32	β -Eudesmol	0,28	1644	1650
27	32,54	α -Cadinol	2,01	1649	1652

C. articulatus

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
3	5,44	α -Pineno	12,34	932	932
5	6,57	β -Pineno	6,28	975	974
8	8,01	<i>o</i> -Cimeno	1,08	1023	1022
9	8,14	D-Limoneno	1,21	1027	1024
10	10,31	<i>p</i> -Cimeneno	0,72	1089	1089
11	11,71	α -Canfolenal	0,59	1125	1122
15	13,16	Pinocarvona	1,01	1161	1160
17	13,64	<i>cis</i> -Pinocanfona	0,51	1173	1172
18	13,81	4-Terpineol	0,61	1177	1174
19	14,12	<i>p</i> -8-Cimenol	0,50	1184	1179
21	14,56	Mirtenal	3,17	1195	1195
22	15,11	Verbenona	1,73	1208	1204
23	15,56	<i>trans</i> -Carveol	0,47	1219	1215
24	16,54	D-Carvona	0,34	1242	1239
25	21,68	Ciclosativeno	0,62	1364	1369
26	22,06	α -Ylangeno	3,73	1373	1373
27	23,00	Cipereno	1,27	1395	1398
34	26,56	β -Selineno	4,60	1483	1489
35	26,90	α -Selineno	0,57	1492	1498
37	27,33	Isodauceno	0,57	1502	1500
39	28,03	<i>trans</i> -Calameneno	0,96	1520	1521
47	30,33	Óxido de cariofileno	4,44	1580	1582
56	33,02	<i>m/z</i> 204	1,36	1652	-
66	36,45	<i>m/z</i> 218	4,37	1747	-

E. muticus

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	6,60	β -Mirceno	0,87	990	988
3	8,04	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1,83	1036	1032
4	8,39	β - <i>trans</i> -Ocimeno	1,73	1046	1044
5	10,23	Linalol	2,89	1101	1095
7	12,71	Neomentol	2,08	1164	1161
8	13,44	<i>m/z</i> 110	2,67	1182	-
9	15,43	Citronelol	1,00	1230	1223
10	15,98	Neral	33,12	1244	1235
11	17,30	Geranial	48,43	1275	1264
12	23,13	Cariofileno	1,88	1416	1417
13	25,73	γ -Curcumeno	0,30	1481	1481
14	26,22	α -Zingibereno	0,50	1493	1493
15	29,51	Óxido de cariofileno	1,61	1578	1582

Eugenia sp.

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,17	α -Pineno	0,78	933	932
3	6,22	β -Pineno	0,18	975	974
4	7,62	<i>o</i> -Cimeno	0,21	1023	1022
5	7,76	D-Limoneno	0,53	1027	1024
6	8,38	β - <i>trans</i> -Ocimeno	0,30	1046	1044
7	19,86	δ -Elemeno	11,49	1337	1335
8	22,07	β -Elemeno	0,83	1390	1389
9	23,14	Cariofileno	5,49	1416	1417
10	23,53	β -Gurjuneno	0,59	1426	1431
11	23,91	Aromadendreno	0,76	1436	1439
12	24,11	α -Guaieno	0,37	1441	1437
13	24,32	<i>epi</i> -Cedreno	0,51	1446	1447
14	24,44	Amorpha-4,11-diene	1,44	1449	1449
15	24,78	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,55	1457	1458
16	25,45	γ -Muuroleno	3,22	1474	1478
17	25,67	Germacreno D	13,78	1479	1484
18	26,06	β -Selineno	2,75	1489	1489
19	26,30	Biciclogermacreno	14,23	1495	1500
20	26,42	α -Muuroleno	0,96	1498	1500
21	26,57	γ -Patchouleno	0,98	1502	1502
22	26,67	β - <i>trans</i> -Guaieno	0,72	1505	1502
23	26,94	γ -Cadineno	0,64	1512	1513
24	27,28	<i>m/z</i> 204	4,07	1520	-
25	27,32	δ -Cadineno	2,10	1521	1522
26	28,53	Elemol	1,53	1553	1548
27	29,34	Espatuleno	1,03	1574	1577
28	29,59	<i>m/z</i> 204	2,09	1580	-
30	29,94	<i>m/z</i> 204	2,95	1590	-
31	30,27	<i>m/z</i> 204	0,55	1598	-
33	30,89	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1,46	1615	1618
34	31,18	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	4,71	1623	1622
35	31,33	Muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	6,75	1627	1630
38	31,95	α -Muurolol	1,67	1644	1644
39	32,24	<i>m/z</i> 204	1,95	1652	-
43	47,40	<i>m/z</i> 296	0,80	2110	-

E. uniflora

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	3,73	2-Hexenal	0,28	847	846
3	6,84	Mirceno	0,22	989	988
4	8,32	β -cis-Ocimeno	0,42	1034	1032
5	8,68	β -trans-Ocimeno	1,07	1044	1044
6	20,74	α -Cubebeno	0,97	1346	1348
7	21,80	α -Copaeno	0,59	1372	1374
8	22,40	β -Cubebeno	0,24	1386	1387
9	22,49	β -Elemeno	0,86	1388	1389
10	23,19	α -Gurjuneno	0,87	1405	1409
11	23,60	β -Cariofileno	3,97	1416	1417
13	24,93	α -Humuleno	0,39	1449	1452
14	25,22	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,28	1456	1458
16	26,08	γ -Muuroleno	3,34	1478	1478
18	26,75	Curzereno	5,80	1494	1499
19	26,85	α -Muuroleno	0,35	1497	1500
21	27,77	δ -Cadineno	2,48	1520	1522
22	28,07	D-Cadineno	0,52	1528	1533
24	29,00	Isodauceno	1,66	1552	1556
27	30,04	Germacreno D-4-ol	1,06	1579	1574
31	31,29	<i>m/z</i> 216	0,66	1612	-
34	32,35	<i>epi</i> - α -Muurolol	2,03	1641	1640
35	32,46	<i>m/z</i> 204	0,64	1644	-
36	32,75	α -Cadinol	2,90	1652	1652
39	34,26	Germacrona	1,30	1693	1693

L. origanoides

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,21	α -Tujeno	1,72	926	930
3	5,38	α -Pineno	0,57	933	932
5	6,49	β -Pineno	0,31	976	974
6	6,85	β -Mirceno	2,03	990	988
7	7,28	α -Felandreno	0,17	1005	1002
8	7,46	δ -3-Careno	2,41	1010	1008
10	7,96	<i>o</i> -Cimeno	13,01	1024	1022
11	8,14	Eucaliptol	2,00	1030	1026
12	8,33	β -cis-Ocimeno	0,22	1035	1032
13	8,68	β -trans-Ocimeno	0,23	1045	1044
14	9,09	τ -Terpineno	6,96	1057	1054
16	10,13	Terpinoleno	0,19	1087	1086
19	12,32	Ipsdienol	1,09	1143	1140
20	13,58	4-Terpineol	0,92	1175	1174
22	15,97	Éter-metil-timol	2,61	1233	1232

23	18,50	Timol	43,90	1294	1289
24	18,86	Carvacrol	0,21	1302	1298
26	20,94	Acetato de timol	0,79	1352	1349
27	21,81	α -Copaeno	0,99	1373	1374
28	23,65	Cariofileno	11,28	1418	1417
30	24,35	Aromadendreno	0,83	1435	1439
31	24,93	α -Humuleno	0,56	1450	1452
32	25,21	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,20	1457	1458
33	25,88	γ -Muuroleno	0,15	1474	1478
34	26,03	Germacreno D	0,40	1477	1480
36	26,66	Biciclogermacreno	1,97	1493	1500
37	26,82	α -Muuroleno	0,12	1497	1500
38	27,17	β -Bisaboleno	0,27	1506	1505
40	27,73	δ -Cadineno	0,58	1521	1522
41	29,76	Espatulanol	0,42	1573	1577

L. cubeba

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,18	α -Pineno	1,27	932	932
4	6,16	Sabineno	0,90	971	969
5	6,25	β -Pineno	0,91	975	974
7	6,61	Mirceno	0,59	989	988
8	7,78	D-Limoneno	12,11	1027	1024
9	10,22	6-Canfenona	1,16	1099	1095
10	12,26	Citronelal	0,92	1151	1148
17	15,78	Neral	74,06	1237	1235
16	16,46	Acetato de hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	1,15	1253	1253
19	23,13	Cariofileno	1,07	1414	1417

M. arvensis

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,18	α -Pineno	0,56	932	932
3	6,25	β -Pineno	0,68	975	974
5	7,77	D-Limoneno	2,45	1026	1024
6	11,97	Isopulegol	1,82	1143	1145
7	12,33	<i>p</i> -Mentona	20,53	1152	1155
8	12,73	Isomentona	17,62	1162	1158
9	12,99	Mentol	42,54	1169	1167
12	15,74	Pulegona	3,43	1236	1233
13	15,92	Carvona	0,35	1240	1239
14	16,34	Piperitona	1,36	1250	1249
15	18,06	Acetato de mentila	5,36	1291	1294
16	21,74	β -Bourboneno	0,29	1380	1387

M. × piperita

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,43	α -Pineno	0,70	932	932
3	6,46	Sabineno	0,31	971	969
4	6,56	β -Pineno	0,75	975	974
7	8,15	D-Limoneno	3,55	1027	1024
8	12,52	Isopulegol	1,09	1145	1145
9	12,85	Mentona	14,23	1153	1148
11	13,58	Mentol	64,71	1171	1167
14	16,37	Pulegona	1,24	1238	1233
15	16,99	Piperitona	0,52	1253	1249
16	18,72	Acetato de mentila	9,08	1293	1294
17	23,83	Cariofileno	0,37	1416	1417
18	26,33	Germacreno D	0,50	1478	1480

O. vulgare

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,18	α -Pineno	1,24	932	932
7	7,39	α -Terpineno	0,75	1015	1014
8	7,65	<i>p</i> -Cimeno	10,91	1023	1020
9	7,77	D-Limoneno	1,12	1027	1024
10	8,77	τ -Terpineno	4,09	1056	1054
14	12,75	Borneol	0,57	1163	1165
18	18,65	<i>p</i> -Timol	70,84	1305	1313
19	23,14	Cariofileno	2,46	1414	1417
20	29,56	Óxido de cariofileno	1,20	1577	1582

P. ruderale

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,18	α -Pineno	0,71	932	932
3	6,16	β -Tujeno	1,02	971	967
4	6,26	β -Pineno	8,45	976	974
6	7,79	D-Limoneno	18,99	1027	1024
7	8,06	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1,28	1035	1032
8	8,49	β - <i>trans</i> -Ocimeno	65,04	1048	1044
9	9,91	1-Undeceno	1,36	1090	1092

S. terebinthifolia

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,02	α -Tujeno	0,34	925	924
3	5,21	α -Pineno	26,62	933	932
5	6,26	β -Pineno	2,19	975	974
6	6,62	Mirceno	6,91	990	988
7	7,02	α -Felandreno	1,11	1004	1002
8	7,21	δ -3-Careno	10,77	1010	1008
9	7,64	<i>p</i> -Cimeno	5,41	1023	1020
10	7,78	D-Limoneno	7,07	1027	1024
14	21,39	α -Copaeno	1,43	1371	1374
15	21,99	β -Cubebeno	0,91	1386	1387
16	23,15	β -Cariofileno	9,59	1414	1417
17	24,50	α -Humuleno	1,03	1448	1452
18	24,76	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,74	1455	1458
19	25,47	γ -Muuroleno	0,64	1472	1478
20	25,62	Germacreno D	3,79	1476	1480
22	26,40	α -Muuroleno	0,50	1495	1500
24	26,92	δ -Amorfeno	0,60	1509	1511
25	27,31	δ -Cadineno	2,03	1519	1522
26	28,54	Germacreno B	3,66	1551	1559
27	29,34	<i>m/z</i> 202	1,12	1572	-
28	29,53	Óxido de cariofileno	2,53	1576	1582
30	32,02	Hinesol	0,57	1643	1640
31	32,21	α -Muurolol	1,19	1648	1644
32	34,13	Amorpha-4,9-dien-2-ol	0,79	1700	1700

S. aromaticum

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
1	5,43	α -Pineno	0,72	932	932
3	21,33	Eugenol	90,22	1355	1356
4	23,87	Cariofileno	2,53	1417	1417
5	25,22	α -Humuleno	0,48	1450	1452
6	28,24	Acetato de eugenila	4,54	1526	1521
7	30,30	Óxido de cariofileno	0,63	1579	1582

T. vulgaris

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
2	5,19	α -Pineno	3,96	932	932
3	5,54	Canfeno	2,53	946	946
4	6,26	β -Pineno	0,54	975	974
5	6,61	β -Mirceno	1,22	989	988

6	7,02	α -Felandreno	1,24	1004	1002
7	7,20	δ -3-Careno	0,37	1010	1008
8	7,39	α -Terpineno	0,35	1015	1014
9	7,68	<i>o</i> -Cimeno	20,59	1024	1022
10	7,79	D-Limoneno	2,62	1027	1024
11	8,76	τ -Terpinene	0,80	1056	1054
12	9,80	Terpinoleno	0,90	1087	1086
13	10,24	<i>m/z</i> 136	3,71	1100	-
14	11,89	Cânfora	0,59	1141	1141
16	12,76	Borneol	2,86	1163	1165
17	13,22	4-Terpineol	1,11	1175	1174
21	17,84	Acetato de bornil	1,36	1286	1284
22	18,15	Timol	50,93	1294	1289

V. curassavica

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
3	5,23	α -Tujeno	0,98	926	924
4	5,46	α -Pineno	22,22	935	932
5	5,77	Canfeno	0,21	947	946
6	6,40	β -Tujeno	0,42	972	967
7	6,51	β -Pineno	0,70	976	974
8	6,86	β -Mirceno	0,33	989	988
9	7,66	α -Terpineno	0,06	1015	1014
10	7,91	<i>o</i> -Cimeno	0,21	1022	1022
11	8,14	Eucaliptol	1,87	1029	1026
12	9,06	τ -Terpineno	0,12	1055	1054
13	10,70	Nonanal	0,16	1102	1100
15	12,24	Cânfora	0,35	1141	1141
16	13,57	4-Terpineol	0,20	1174	1174
17	18,09	Bornil acetato	0,43	1283	1284
18	20,25	δ -Elemeno	0,54	1335	1335
19	20,74	α -Cubebeno	0,22	1346	1345
22	21,45	Ciclosativeno	0,36	1363	1369
23	21,82	α -Copaeno	0,72	1372	1374
24	22,18	β -Bourboneno	0,25	1381	1387
25	22,52	β -Elemeno	1,05	1389	1389
26	23,20	α - <i>cis</i> -Bergamoteno	2,23	1406	1411
27	23,76	α -Santaleno	28,86	1420	1416
28	23,87	<i>trans</i> -Cariofileno	3,69	1417	1417
29	24,15	β -Gurjuneno	0,75	1429	1431
30	24,30	α - <i>trans</i> -Bergamoteno	0,49	1433	1432
31	24,63	β - <i>cis</i> -Farneseno	0,34	1441	1440
32	25,02	α -Humuleno	0,63	1451	1452
33	25,19	β - <i>trans</i> -Farneseno	2,01	1455	1454

34	25,34	<i>allo</i> -Aromadendreno	6,83	1459	1458
36	25,92	γ -Muuroleno	0,41	1474	1478
37	26,09	Germacrene D	1,52	1478	1480
38	26,26	α -Amorfenol	1,43	1482	1483
41	26,88	α -Muuroleno	0,34	1498	1500
42	27,05	Germacrene A	1,29	1502	1508
43	27,26	β -Bisaboleno	3,10	1507	1505
46	27,80	δ -Cadineno	1,97	1521	1522
51	29,80	Espatuleno	0,42	1573	1577
52	30,00	Óxido de cariofileno	1,05	1578	1582

X. aromatica

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
1	3,81	<i>cis</i> -3-Hexenol	0,14	851	850
3	5,43	α -Pineno	0,61	932	932
4	6,56	β -Pineno	0,49	975	974
5	8,02	<i>o</i> -Cimeno	0,12	1023	1022
6	8,44	β - <i>cis</i> -Ocimeno	0,12	1035	1032
7	13,80	4-Terpineol	0,14	1176	1174
10	22,05	α -Copaeno	0,27	1372	1374
11	22,75	β -Elemeno	0,31	1389	1389
12	23,83	Cariofileno	0,34	1415	1417
13	24,62	α -Guaieno	0,37	1435	1437
15	25,49	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,43	1456	1458
16	26,34	γ -Muuroleno	0,75	1477	1478
18	27,03	<i>cis</i> -Cadina-1,4-diene	7,49	1494	1495
19	27,39	γ -Patchouleno	0,27	1503	1502
20	27,66	δ -Amorfenol	0,26	1511	1511
21	28,03	δ -Cadineno	0,29	1520	1522
23	29,15	<i>trans</i> -Dauca-4(11),7-diene	0,50	1549	1556
24	29,28	Germacrene B	0,57	1553	1561
25	29,46	<i>m/z</i> 204	0,45	1557	-
27	29,72	β -Maalieno	2,81	1564	1566
28	30,23	Espatuleno	6,55	1577	1577
29	30,48	Gleenol	8,70	1584	1586
30	30,77	Globulol	8,23	1591	1590
32	31,40	β -Atlantol	0,43	1608	1608
34	32,06	1- <i>epi</i> -Cubenol	0,48	1626	1627
40	33,07	α -Cadinol	1,26	1653	1652
61	39,81	<i>m/z</i> 216	8,50	1845	-
63	40,37	<i>m/z</i> 234	3,49	1862	-
74	43,41	<i>m/z</i> 314	0,41	1954	-

Z. officinale

#	tR (min)	Composto	Área (%)	IR cal.	IR lit.
3	5,18	α -Pineno	3,34	932	932
4	5,55	Canfeno	10,25	947	946
6	6,26	β -Pineno	0,53	975	974
7	6,47	Sulcatona	1,55	984	985
8	6,61	Mirceno	18,22	989	988
9	7,64	<i>p</i> -Cimeno	0,49	1023	1020
10	7,85	Eucaliptol	5,96	1029	1026
11	9,92	2-Nonanona	0,48	1090	1087
12	10,23	Linalol	1,76	1100	1095
14	12,75	Borneol	1,45	1163	1165
15	13,55	Criptona	0,75	1183	1183
16	13,76	α -Terpineol	1,04	1188	1186
17	15,35	β -Citronelol	1,49	1227	1223
18	15,86	Neral	8,60	1239	1235
19	16,43	Acetato de linalol	1,08	1252	1254
20	17,12	Geranial	13,25	1269	1264
21	18,05	2-Undecanona	1,31	1291	1293
23	21,38	α -Copaeno	0,50	1371	1374
25	25,77	<i>ar</i> -Curcumeno	10,49	1480	1479
26	26,09	<i>m/z</i> 204	1,21	1487	-
27	26,26	γ -Amorfenol	2,24	1492	1495
28	26,78	β -Bisabolenol	3,64	1505	1505
30	27,35	β -Sesquifelandreno	2,88	1520	1521
33	28,50	<i>m/z</i> 204	0,57	1550	-
36	30,76	Khusimol	1,01	1609	1604
41	33,50	Acetato de elemol	1,52	1683	1680
44	39,68	<i>m/z</i> 348	2,53	1861	-

Apêndice C

Tabela C1. Porcentagem de inibição e de erradicação da formação do biofilme de *M. furfur* pelos OEs de *A. saturejoides*, *C. articulatus*, *E. uniflora* e *S. aromaticum*

Espécie	% Inibição	% Erradicação
<i>A. saturejoides</i>	70	51
<i>C. articulatus</i>	55	38
<i>E. uniflora</i>	53	41
<i>S. aromaticum</i>	93	29

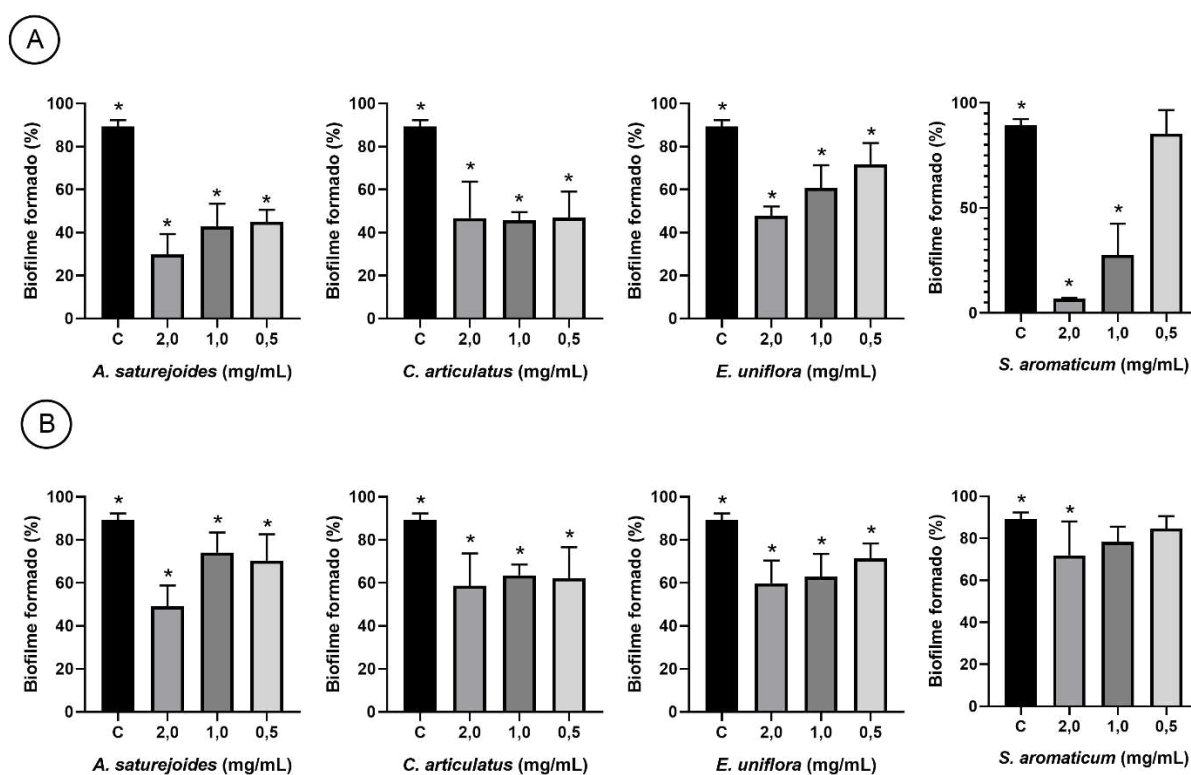


Figura C1. Inibição (A) e erradicação (B) da formação do biofilme de *M. furfur* pelos OEs de *A. saturejoides*, *C. articulatus*, *E. uniflora* e *S. aromaticum*. Todas as concentrações foram comparadas em relação ao controle (C); células sem tratamento com as amostras de OEs. *: indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA $p < 0,05$).

Apêndice D

A validação do método para quantificação dos marcadores geraniol e mentol em gel foi realizada por CG-EM através da determinação dos parâmetros de linearidade, intervalo e precisão.

1. Linearidade e intervalo do método

A linearidade do método quantitativo é realizada através da avaliação da curva analítica do analito e a resposta obtida em termos do coeficiente de regressão (r) (ANOVA) e distribuição dos resíduos da regressão. As curvas analíticas, equação da reta e coeficiente de regressão para o geraniol e para o mentol estão apresentadas na Figura D1 e nas Tabelas D1 e D2, respectivamente.

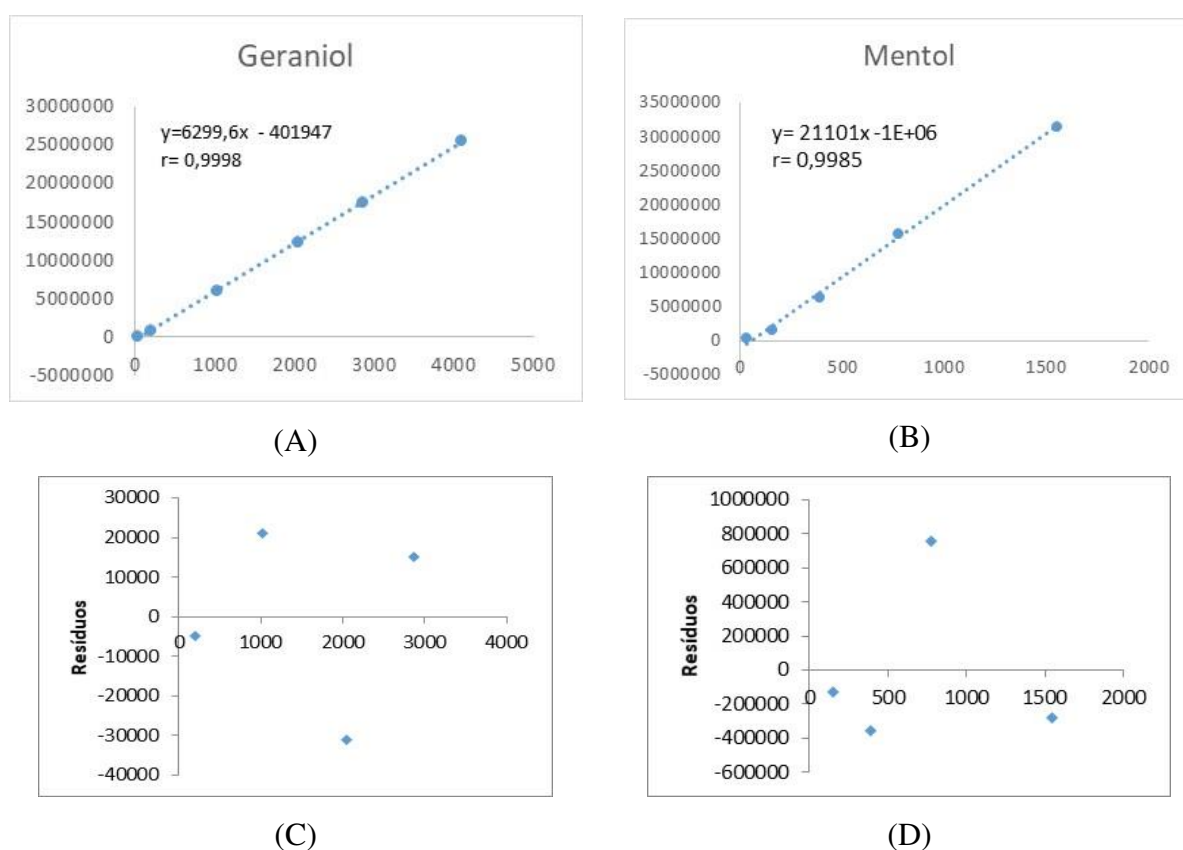


Figura D1. Curvas analíticas para quantificação de geraniol (A) e mentol (B) em formulação de gel por CG-EM. Gráficos de distribuição dos resíduos da regressão para geraniol (C) e mentol (D).

Tabela D1. Análise de variância (ANOVA) para o método de quantificação de geraniol em gel

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	2E+14	1,6E+14	189529	5,27619E-06
Resíduo	2	2E+09	8,3E+08		
Total	3	2E+14			

Tabela D2. Análise de variância (ANOVA) para o método de quantificação de mentol em gel

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	5,23E+14	5,2E+14	1322,3	0,00075539
Resíduo	2	7,92E+11	4E+11		
Total	3	5,24E+14			

As correlações entre os valores experimentais e o modelo matemático para o geraniol e mentol foram adequadas ($r > 0,99$). As regressões obtidas foram significativas estatisticamente tanto para o geraniol (Tabela D1) como para o mentol (Tabela D2). A distribuição dos resíduos das regressões do geraniol (Figura D1 C) e do mentol (Figura D1 D) foram aleatórias indicando assim a boa linearidade dos métodos de quantificação de geraniol e mentol nos intervalos de 41 a 4100 $\mu\text{g/mL}$ e 31 a 3100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

2. Seletividade

A análise do controle da formulação gel demonstrou não haver interferentes nos tempos de retenção do geraniol ($t_R = 16,37$ min) e do mentol ($t_R = 13,00$ min) (Figura D2).

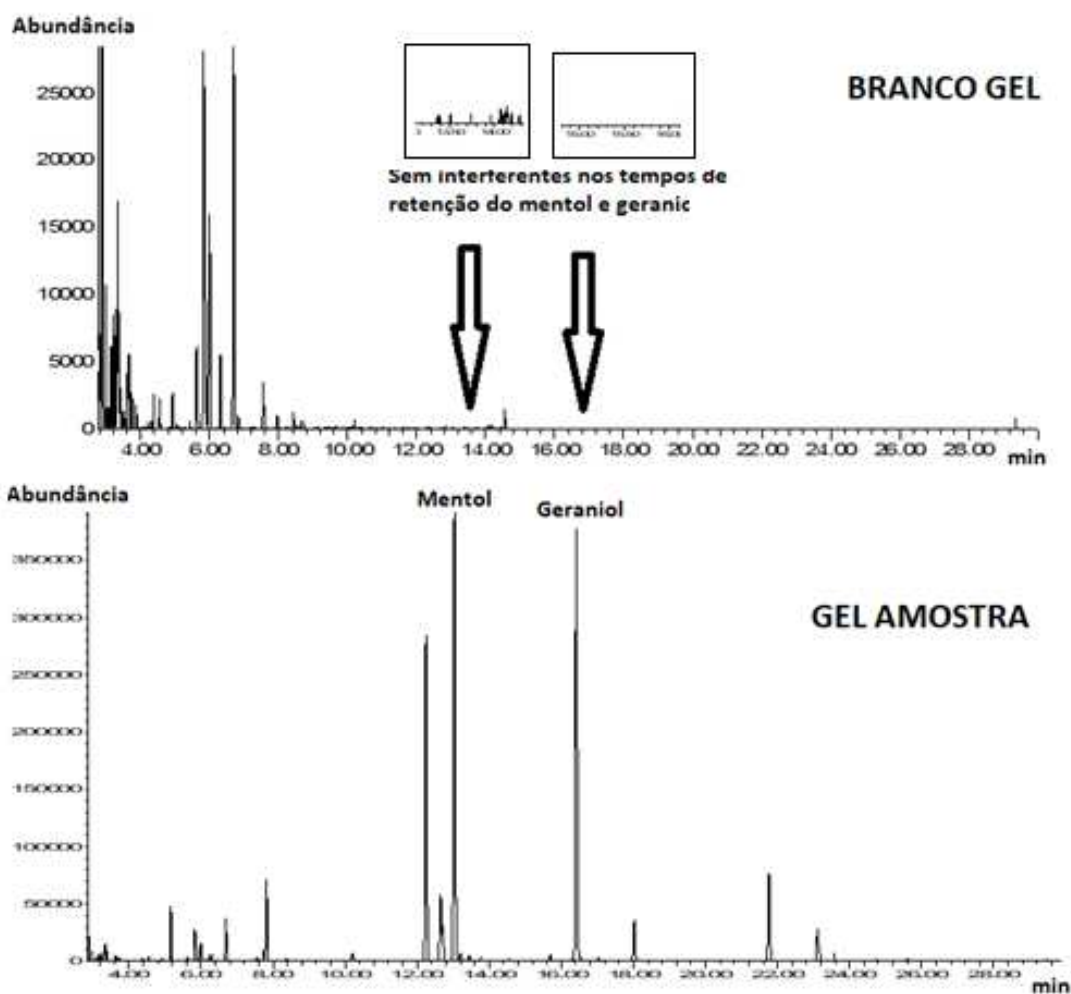


Figura D2. Comparação entre o cromatograma (CG-EM) da formulação controle e dos padrões de geraniol e mentol (seta) mostrando a ausência dos marcadores da BOEs na formulação base

3. Precisão e exatidão

Para avaliação da precisão e exatidão dos métodos de quantificação de geraniol e mentol, a formulação gel foi quantificada em 2 concentrações diferentes da BOEs. Inicialmente, foi utilizada a formulação controle do gel e adicionado as diferentes quantidades da BOEs. Porém, a alta viscosidade do gel impediu uma boa incorporação do ativo, resultando numa amostra heterogênea, que quando submetida à quantificação apresentou valores discrepantes (não repetitivos) para os dois analitos sendo necessária modificar o procedimento de fortificação. Optou-se então por fazer a incorporação juntamente com a produção do gel hidroalcoólico, para haver boas solubilização dos ativos. Dessa forma, foram produzidas novas

formulações de gel com concentrações diferentes do ativo e submetida à quantificação. Os resultados estão apresentados nas Tabelas D3 e D4.

Tabela D3. Precisão e Exatidão do método de quantificação de geraniol no gel

Gel	Valor teórico de geraniol	Geraniol (% m/m)	Média	Precisão CV (%)	Exatidão (% recup)
0,5% BOEs	0,30	0,215	0,214	7,9	71
		0,236			
		0,196			
		0,207			
1,0% BOEs	0,15	0,153	0,136	12	90
		0,139			
		0,139			
		0,113			

Tabela D4. Precisão e Exatidão do método de quantificação de mentol no gel

Gel	Valor teórico de mentol	Mentol (% m/m)	Média	Precisão CV (%)	Exatidão (% recup)
0,5% BOEs	0,52	0,647	0,609	5,4	117
		0,590			
		0,591			
		-			
1,0% BOEs	1,05	0,968	0,922	4,4	88
		1,056			
		0,908			
		0,890			

Apêndice E

Tabela E1. Constituintes utilizados na formulação do xampu base com tensoativos hipoalergênicos para tratamento da dermatite seborreica

Componente	Função	Concentração (%)
BOEs	Princípio ativo	1,0
Sulfato de Cocete de Zinco (Zetesol Zn)	Tensoativo aniônico; agente de limpeza	35,0
Lauriletersulfosuccinato de sódio (Surfax SLA)	Tensoativo aniônico; agente de limpeza suave	10,0
Dietanolamida de ácido graxo	Tensoativo não-iônico; sobreengordurante	3,0
Cocoamidopropil betaína	Tensoativo anfotérico redutor da irritabilidade	2,0
Glicerina	Umectante	0,5
EDTA	Quelante	0,1
Trietanolamina (50%)	Ajuste de pH	qsp
Água destilada	Solvente	qsp

Adaptado de: Lima e Comarella (2012); qsp = para 100 g

Anexo



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A362580

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A362580
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Eugenia uniflora
Cymbopogon martini
Copaifera langsdorffii
Achyrocline satureioides
Elionurus muticus
Schinus terebinthifolia
Porophyllum ruderale
Bixa orellana
Eugenia sp
Pilocarpus microphyllus
Lippia alba
Aloysia gratissima
Varronia curassavica
Baccharis dracunculifolia
Eugenia florida
Xylopia aromatica
Baccharis crispa
Lippia organoides
Cyperus articulatus

Título da Atividade:	Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações tópicas empregando óleos essenciais para o tratamento da dermatite seborreica
----------------------	---

Equipe

Marta Cristina Teixeira Duarte

UNICAMP

Fábio Cassola
Marili Villa Nova Rodrigues

CPQBA/UNICAMP
CPQBA/UNICAMP

Data do Cadastro: 21/02/2023 16:34:41
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:35 de 23/04/2023.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**