



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



ACSA OLIVEIRA MAGALHÃES

Desenvolvimento de ativos multifuncionais com potencial uso cosmético a partir de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer por métodos e solventes verdes

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Magalhães, Acsa Oliveira

M164d Desenvolvimento de ativos multifuncionais com potencial uso cosmético a partir de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer por métodos e solventes verdes / Acsa Oliveira Magalhães. - 2026.
166f.: il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2026.

1. Antimicrobiano. 2. Antioxidante. 3. Fitoquímica. 4. Fitocosméticos.
5. Fotoproteção. 6. *Lippia thymoides*. I. Lucchese, Angélica Maria, orient.
II. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 582.949.1:687.55

Rejane Maria Rosa Ribeiro – Bibliotecária CRB-5/695

ACSA OLIVEIRA MAGALHÃES

“Desenvolvimento de ativos multifuncionais com potencial uso cosmético a partir de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer por métodos e solventes verdes”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 04 de JULHO de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **ANGELICA MARIA LUCCHESI**
Data: 04/07/2025 16:52:47-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Angélica Maria Lucchese**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **SAMIRA MARIA PEIXOTO CAVALCANTE DA SILVA**
Data: 06/07/2025 20:55:55-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Samira Maria Peixoto Cavalcanti da Silva**

UFRB

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS DE ALMEIDA BEZERRA**
Data: 05/07/2025 13:20:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Marcos de Almeida Bezerra**

UESB

Documento assinado digitalmente
 **ERNESTO ACOSTA MARTINEZ**
Data: 07/07/2025 11:04:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Ernesto Acosta Martinez**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO CANINDE DE SOUSA JUNIOR**
Data: 04/07/2025 17:03:00-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Francisco Canindé de Sousa Júnior**

UFRN

Feira de Santana-BA
2026

Dedico esta tese ao amor da minha vida, meu querido filho **Davi**, fonte inesgotável de alegria, inspiração e motivação. Que este trabalho seja um exemplo de disciplina e resiliência. Que você cresça sempre com coragem para seguir seus próprios caminhos e realizar seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui foi longa, cheia de aprendizado, viradas inesperadas e muitas... muitas repetições de experimento. Teve troca de projeto no meio do caminho, reagente que sumiu, cultura que contaminou, máquina que resolveu pifar no dia da análise. Mas, apesar de tudo (ou talvez por causa de tudo isso), cheguei até aqui.

Agradeço primeiramente à CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual esta pesquisa não teria sido possível. Pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, minha gratidão pela estrutura, formação acadêmica e oportunidades oferecidas ao longo desta caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Angélica, minha eterna mãe na ciência, obrigada por estar comigo desde a iniciação científica, quando eu ainda tinha muito colágeno no rosto e achava que tudo dava certo na primeira tentativa. Obrigada por me acolher no mestrado e no doutorado, por sua paciência, firmeza, puxões de orelha, por me aturar nos meus surtos acadêmicos e por não desistir de mim.

À Taris Maria, minha dupla, amiga, irmã, sócia, parceira de todas as crises, cafés, choros, dormidas no laboratório, comprinhas e surtos existenciais. Obrigada por cada risada, por todas as figurinhas de WhatsApp, por segurar a barra comigo e por ser reconhecida por todos como “a minha dupla de doutorado”. Sem você, nada disso teria feito sentido. Entre um experimento e outro, nasceu também um sonho compartilhado: criamos a Puba, movidas pela vontade de ver a ciência ultrapassar os muros da academia e se transformar em inovação empreendedora. Foi desafiador (e ainda é), mas aos poucos, o projeto de doutorado virou também nosso projeto de vida.

Aos amigos e ICs (Paula, Kevin, Sabrina, Julio, Ana Paula e Julia) obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas piadas internas, pelas análises refeitas 500 vezes e por estarem sempre ali, rindo comigo.

À Simone, parceira de bancada, obrigada pelas kombuchas, conversas, pelos surtos compartilhados, conselhos e pelo carinho de sempre. Fico feliz por ter trilhado essa estrada ao seu lado.

Aos colegas do LAPRON (Humberto, Jerferson, Larissa, Daniel, Caio, Girlene, Ingara, Pedro e Hismirlei) obrigada pelas trocas, conversas no corredor, cafezinhos, risadas e por serem parte dessa grande confusão científica com afeto.

À Dona Ana, obrigada por cuidar da gente com tanto carinho, por acolher com amor cada pessoa que passou pelo laboratório. Seu cuidado fez a diferença.

Aos meus amigos fora da bancada (Ana Tereza, Edianny, Maiane, Josielia, Jaque, Maria e Sol) obrigada por estarem presentes mesmo sem entenderem exatamente o que eu estava fazendo. Aos meus amigos Horácio e Aline, que mesmo de longe continuaram me incentivando.

Aos meus amigos da escalada, trilhas e jiu-jitsu: obrigada por me ajudarem a recarregar as energias, a sair do modo “doutorado” e lembrar que corpo, alma e mente estão interligados, e que um depende do outro pra funcionar bem.

Aos professores que fizeram parte dessa trajetória, especialmente Alexandre, Danielle, Ingrid e Geany, obrigada por cada orientação, conselho, aula e apoio ao longo desses anos.

Aos membros da banca e demais professores do programa, minha gratidão pelas contribuições valiosas que enriqueceram esta tese e ampliaram minha visão científica.

À minha mãe e aos meus irmãos e irmãs: Raquel, Sóstenes, Lídia, Heber e Tabita, por serem minha rede de apoio e minha lembrança constante das minhas origens.

Ao meu filho querido, Davi, minha luz e razão maior, obrigada por entender minha ausência, por me dar forças nos dias em que eu já não via mais sentido e por ser meu maior orgulho. Tudo isso é por você.

Por fim, minha gratidão a todos que não citei, mas que contribuíram direta ou indiretamente para esta caminhada. Obrigada por serem presença, apoio e coragem nos dias bons — e, principalmente, nos dias difíceis. Essa conquista também é de vocês.

“Aquele que nunca errou nunca tentou algo novo.”
— Albert Einstein

RESUMO

A crescente preferência dos consumidores por formulações cosméticas sustentáveis e “limpas”, livres de parabenos, derivados do petróleo e ingredientes de origem animal, destaca a relevância desta pesquisa. Técnicas avançadas de extração, como ultrassom, fermentação e solventes supramoleculares, oferecem vantagens significativas ao reduzir o consumo de energia e evitar o uso de solventes nocivos, alinhando-se aos princípios da sustentabilidade. Este estudo teve como objetivo otimizar métodos de extração verdes, como a fermentação probiótica e os sistemas de solventes supramoleculares, para obter compostos bioativos de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, visando o desenvolvimento de ativos e conservantes naturais para a indústria cosmética. A fermentação foi realizada com a bactéria *Lactocaseibacillus rhamnosus* durante 24 horas, empregando um planejamento experimental conhecido como Delineamento Composto Central Rotacional, que permite avaliar os efeitos isolados e combinados de variáveis — a quantidade da planta e a concentração do inóculo do microrganismo — em cinco níveis distintos. Para os solventes supramoleculares, os extratos foram obtidos por coacervação espontânea de ácido octanóico em solução hidroalcoólica acidificada, seguida de extração com resultados destacaram o desempenho superior do *L. rhamnosus* nos ensaios antioxidantes, especialmente no método DPPH, no qual a fermentação aumentou significativamente a atividade antioxidante. A condição otimizada (3,0% da planta, $1 \times 10^{3,5}$ unidades formadoras de colônia por mililitro, 24 horas) resultou em extratos com alta atividade antioxidante e antimicrobiana. A capacidade antioxidante, medida pelo TEAC, foi de $421 \pm 7,2$ $\mu\text{mol/g}$ para o ensaio DPPH e $154 \pm 5,7$ $\mu\text{mol/g}$ para o ensaio ABTS, valores superiores aos obtidos sem fermentação. A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fermentados foi de 3,125% do fermentado, equivalente a 1,09 mg/mL de extrato seco, para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os extratos supramoleculares de *L. thymoides* também demonstraram potencial como agentes fotoprotetores, com correlação entre teor fenólico, tamanho de partícula e fator de proteção contra radiação ultravioleta B. Os solventes supramoleculares apresentaram a maior atividade antimicrobiana, com a menor concentração necessária para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sendo de 0,05 miligramas por mililitro. Ensaios de toxicidade com *Artemia salina* confirmaram a segurança dos extratos, sem efeitos letais nas concentrações testadas. Esses achados reforçam a eficácia e segurança das formulações obtidas por métodos verdes para aplicação cosmética. Em conclusão, *Lippia thymoides* demonstra um potencial notável como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e fotoprotetoras, oferecendo uma alternativa sustentável e eficiente para o desenvolvimento de formulações cosméticas inovadoras.

Palavras-chave: Antimicrobiano, Antioxidante, Fitoquímica, Fitocosméticos, Fotoproteção.

ABSTRACT

The growing consumer preference for sustainable and “clean” cosmetic formulations—free from parabens, petroleum derivatives, and animal-derived ingredients—highlights the relevance of this research. Advanced extraction techniques, such as ultrasound, fermentation, and supramolecular solvents, offer significant advantages by reducing energy consumption and avoiding the use of harmful solvents, thus aligning with sustainability principles. This study aimed to optimize green extraction methods, such as probiotic fermentation and supramolecular solvent systems, to obtain bioactive compounds from *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, with the goal of developing natural actives and preservatives for the cosmetic industry. Fermentation was carried out with the bacterium *Lactocaseibacillus rhamnosus* for 24 hours, using an experimental design known as Central Composite Rotational Design, which allows the evaluation of both isolated and combined effects of variables—the amount of plant material and the inoculum concentration of the microorganism—at five different levels. For supramolecular solvents, the extracts were obtained by spontaneous coacervation of octanoic acid in an acidified hydroalcoholic solution, followed by extraction. The results highlighted the superior performance of *L. rhamnosus* in antioxidant assays, particularly in the DPPH method, where fermentation significantly increased antioxidant activity. The optimized condition (3.0% plant material, $1 \times 10^{3.5}$ colony-forming units per milliliter, 24 hours) yielded extracts with high antioxidant and antimicrobial activity. The antioxidant capacity, measured by TEAC, was 421 ± 7.2 $\mu\text{mol/g}$ for the DPPH assay and 154 ± 5.7 $\mu\text{mol/g}$ for the ABTS assay—values higher than those obtained without fermentation. The minimum inhibitory concentration (MIC) of fermented extracts was 3.125% of the fermentate, equivalent to 1.09 mg/mL of dry extract, required to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. The supramolecular extracts of *L. thymoides* also demonstrated potential as photoprotective agents, with a correlation between phenolic content, particle size, and the protection factor against ultraviolet B radiation. The supramolecular solvents exhibited the highest antimicrobial activity, with the lowest concentration required to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* being 0.05 mg/mL. Toxicity assays with *Artemia salina* confirmed the safety of the extracts, showing no lethal effects at the tested concentrations. These findings reinforce the efficacy and safety of formulations obtained through green methods for cosmetic applications. In conclusion, *Lippia thymoides* demonstrates remarkable potential as a source of bioactive compounds with antioxidant, antimicrobial, and photoprotective properties, offering a sustainable and efficient alternative for the development of innovative cosmetic formulations.

Keywords: Antimicrobial, Antioxidant, Photoprotection, Phytochemistry, Phytocosmetics.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico

ANOVA - Análise de Variância

BC - *Bacillus coagulans*

BL- *Bifidobacterium longum*

CCA - Concentração Crítica de Agregação

CL₅₀ - Concentração Letal de 50%

CP - concentração de antioxidantes no poço de reação

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DLS - Dynamic Light Scattering

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EQS - Solvente de Equilíbrio

FAJ - Falta de Ajuste

FC - fator de correção (igual a 10)

Fcal - Valor F calculado

FPS – Fator de Proteção Solar

GL - Graus de Liberdade

I (λ) - intensidade da luz solar no comprimento de onda λ

IUCN *Red List*- Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza

LAB - Bactérias do ácido láctico

LR - *Lactocaseibacillus rhamnosus*

LTSF - Extratos Não Fermentados da Espécie

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MHA- Müller–Hinton Agar

NADES - Solventes Eutéticos Profundos Naturais do inglês *Natural Deep Euthetic Solvents*

PI - Índice de Polidispersidade

QM - Quadrado Médio

SB - *Saccharomyces boulardii*

SUPRAS -Solventes Supramoleculares

SQ - Soma dos Quadrados

TEAC - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

UFC- Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE COSMÉTICOS	18
2.2 CONSERVANTES NATURAIS EM COSMÉTICOS	21
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
2.4 FOTOPROTETORES UVA E UVB.....	31
2.5 FAMÍLIA VERBENACEAE E O GÊNERO <i>LIPPIA</i>	35
2.5.1 <i>Lippia thymoides</i>	43
2.6 EXTRATOS FERMENTADOS.....	46
2.7 SOLVENTES SUPRAMOLECULARES	50
REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO 1: OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE <i>Lippia thymoides</i> MART. & SCHAUER COM POTENCIAL USO COSMÉTICO	71
1 INTRODUÇÃO	73
2 METODOLOGIA.....	75
2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	75
2.2 TESTES PRELIMINARES DE FERMENTAÇÃO DAS FOLHAS <i>L. THYMOIDES</i>	75
2.2.1 Seleção do microrganismo	75
2.3.2 Escolha da concentração do inóculo	76
2.3.3 Escolha do tempo de fermentação.....	77
2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	77
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	78

2.4.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	78
2.4.2 Método de sequestro do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico (ABTS).....	79
2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	80
2.6 TESTE DE TOXICIDADE	82
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 TESTES PRELIMINAR.....	84
3.1.1 Seleção do microrganismo	84
3.1.2 Escolha da concentração inóculo.....	86
3.1.3 Escolha do tempo de fermentação.....	88
3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	90
3.2.1 Variável atividade antimicrobiana avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	98
3.3 FERMENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS	103
4 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 2- EXTRAÇÃO VERDE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE <i>Lippia thymoides</i> MART. & SCHAUER UTILIZANDO SOLVENTES SUPRAMOLECULARES: INOVAÇÃO SUSTENTÁVEL PARA COSMÉTICOS.....	119
1 INTRODUÇÃO	121
2 METODOLOGIA.....	123
2.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS....	123
2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	123

2.3 SÍNTESE DE SOLVENTES SUPRAMOLECULARES (SUPRAS).....	124
2.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	124
2.5 TESTE DE FOTOPROTEÇÃO	124
2.6 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	127
2.7 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOL NA SÍNTESE SUPRAMOLECULAR	127
2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	128
2.8.1 Método de sequestro de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	128
2.8.2 Método de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico (ABTS)....	129
2.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIO MÍNIMA (CIM)	130
2.10 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)	131
2.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	132
2.12 TESTE DE TOXICIDADE	133
2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	134
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135
3.1 FOTOPROTEÇÃO.....	135
3.1.1 Comparação da atividade fotoprotetora em função das diferentes concentrações de etanol nos extratos e diferentes solventes extrativos (SUPRAS, EQS e ETANÓLICO).....	135
3.2.1 Comparação de fenólicos totais das diferentes concentrações em etanol dos extratos de SUPRAS, EQS e ETANÓLICO.....	140
3.2.2 Coeficientes de correlação entre os compostos fenólicos e o FPS (UVB)	140
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	142
3.3.1 Atividade antioxidante dos extratos SUPRAS, EQS e ETANÓLICO	142
3.3.2 Escolha da Concentração de etanol na síntese de Supra	144

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	147
3.5 <i>DYNAMIC LIGHT SCATTERING</i> (DLS).....	149
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	153
3.7 TESTE DE TOXICIDADE	155
4 conclusão.....	157
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais desafios da contemporaneidade é a busca por soluções para os problemas ambientais causados pela produção de resíduos poluentes e pouco degradáveis. Nesse contexto, os estudos em sustentabilidade e a inovação têm se tornado estratégias cruciais para minimizar os impactos ao meio ambiente. Em resposta às exigências de consumidores cada vez mais conscientes e às regulamentações ambientais mais rigorosas, as empresas de cosméticos têm investido na pesquisa de alternativas naturais, utilizando tecnologias inovadoras para atender a essa demanda crescente (Gonzalez et al., 2020).

Nos últimos anos, os consumidores têm dado preferência a produtos cosméticos com formulações sustentáveis, compostas por insumos naturais e livres de testes em animais. Dentre as principais tendências do mercado, ressaltam-se os cosméticos livres de parabenos, derivados de petróleo e ingredientes de origem animal. Também ganham destaque os produtos veganos, que além de não utilizarem matérias-primas de origem animal, são isentos de testes em animais. Essa mudança no comportamento do consumidor reflete a crescente busca por produtos "limpos", formulados com o mínimo de compostos sintéticos e total transparência quanto aos ingredientes utilizados (Goswami, 2024).

Tradicionalmente, os extratos vegetais utilizados na indústria cosmética são produzidos com solventes orgânicos, como álcoois e ésteres. Entre eles, os extratos glicólicos e hidroglicólicos, que utilizam glicerina (de origem animal ou vegetal) ou propilenoglicol (derivado do petróleo), são amplamente empregados (Canton et al., 2021). No entanto, com a evolução das tecnologias, surgem novas abordagens para a extração de compostos bioativos de plantas, como o uso de ultrassom, fermentação e solventes supramoleculares. Esses métodos, conhecidos como extrações verdes, apresentam vantagens em relação às técnicas convencionais, pois minimizam o consumo de energia e evitam o uso de solventes nocivos, alinhando-se aos princípios de sustentabilidade e eficiência (Xia et al., 2024; Siller-Sánchez et al., 2024; Valisakkagari et al., 2024).

A biodiversidade brasileira é considerada a mais rica do mundo, possuindo seis biomas terrestres (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampas), com características bem distintas em aspectos, como solo, flora e fauna, entre outros. Com um elevado grau de endemismo, estima-se que abrigue cerca de 15 a 20% das

espécies vivas, sendo um celeiro em potencial para o desenvolvimento de novos insumos para medicamentos, nutracêuticos, produtos alimentícios, agropecuários e cosméticos (Brasil, 2018; Ellwanger et al., 2023). Na área de cosméticos a Amazônia é a principal fornecedora de matérias-primas para a indústria, com produtos como óleos de andiroba, buriti e copaíba (Diniz et al., 2019). A Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, representa uma das maiores áreas de floresta seca da América do Sul e abriga uma biodiversidade rica, porém historicamente negligenciada em termos de conservação. Suas espécies vegetais, adaptadas ao semiárido, produzem metabólitos secundários com propriedades biológicas promissoras, reforçando seu potencial para a produção de medicamentos, cosméticos e outros insumos de alto valor agregado (Naz et al., 2024; Souza et al., 2024; Lambert-Moreira et al., 2025).

No entanto, estima-se que cerca de 95,5% das espécies endêmicas da Caatinga ainda não foram estudadas sob a perspectiva farmacognóstica (Lambert-Moreira et al., 2025). A escassez de investimentos e o baixo interesse comercial são entraves para a exploração sustentável desses recursos, limitando o desenvolvimento econômico e a valorização da biodiversidade regional (Paiva; Lucena, 2020; Santos-Neves et al., 2024). Além disso, a falta de gestão ambiental ameaça essa biodiversidade, destacando a necessidade urgente de estratégias sustentáveis para sua conservação e aproveitamento econômico (Santos-Neves et al., 2024).

A escolha de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer como objeto de estudo se justifica pelo histórico de pesquisas do grupo (Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos - LAPRON) desde 2008, que demonstraram resultados promissores em áreas como atividade antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetora e espasmolítica (Pinto et al., 2013; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2016; Magalhães, 2018; Lima et al., 2019; Trindade et al., 2021; Azevedo et al., 2024). Assim o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de *L. thymoides*, usando processos e solventes verdes, como a fermentação com probióticos e o uso de solventes supramoleculares, visando a obtenção de ativos fotoprotetores, antioxidantes e/ou antimicrobianos com potencial para utilização na indústria cosmética. No primeiro capítulo, o objetivo foi otimizar a fermentação das folhas de *Lippia thymoides* utilizando *Lactocaseibacillus rhamnosus*, visando potencializar suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, para aplicação como conservantes naturais em formulações cosméticas sustentáveis. Já no segundo capítulo, o objetivo foi desenvolver uma metodologia de extração baseada na síntese de solventes supramoleculares em diferentes proporções de etanol, com o intuito de

maximizar a extração dos compostos. Nessa etapa, buscou-se correlacionar os resultados obtidos com os teores de compostos fenólicos, além de avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e fotoprotetor dos extratos resultantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE COSMÉTICOS

As plantas desempenham um papel relevante como fonte de produtos naturais biologicamente ativos com importância cosmética (Cherubim et al., 2019). Segundo a RDC Nº 07, 10 de fevereiro de 2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

Cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, e suas misturas, para uso externo em diversas partes exteriores do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos, dentes e as membranas mucosas da cavidade bucal, com o exclusivo ou principal objetivo de limpar, perfumar, alterar a aparência, corrigir odores corporais, protegê-los e manter em bom estado (Brasil, 2015).

Todavia, fitocosméticos são cosméticos cujos ativos são extratos integrais de vegetais, óleos vegetais ou mesmo partes do vegetal. Esses produtos são projetados para fornecer soluções cosméticas eficazes e, ao mesmo tempo, minimizar os danos ao corpo e ao meio ambiente. Pesquisas demonstram que os fitocosméticos podem apresentar eficácia comparável à de cosméticos convencionais em funções como hidratação e cuidado da pele. Além disso, por utilizarem ingredientes de origem vegetal e, frequentemente, processos de produção mais sustentáveis, podem representar uma alternativa ambientalmente mais favorável. No entanto, é importante destacar que compostos naturais também podem provocar reações alérgicas e que tanto cosméticos naturais quanto sintéticos devem seguir critérios rigorosos de segurança e eficácia (Coelho et al., 2024).

Extratos vegetais e óleos essenciais surgiram como alternativas promissoras aos insumos de origem mineral ou animal na indústria de cosméticos, oferecendo uma série de benefícios que inspiram o desenvolvimento de fitocosméticos. Esses componentes naturais são ricos em compostos bioativos, como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, fotoprotetores e cicatrizantes, que podem melhorar a saúde da pele, e atender à demanda do consumidor por produtos eficazes e ambientalmente amigáveis para o cuidado cutâneo (Choi et al., 2024).

Os óleos essenciais, em particular, têm mostrado potencial em cosméticos e perfumaria devido à sua atividade antimicrobiana natural e a capacidade de tratar ou prevenir vários problemas de pele, além de conferir aromas agradáveis nas formulações ou oferecer soluções complementares, como alívio de dor e ansiedade (Bolouri et al., 2022). Os efeitos sobre a percepção de dor e os níveis de ansiedade do óleo essencial de lavanda foram avaliados em indivíduos submetidos a injeções faciais cosméticas de toxina botulínica para correção de rugas glabellares. Observou-se que, embora a percepção da dor não tenha sido alterada, a inalação promoveu aumento da atividade parassimpática, sugerindo um efeito ansiolítico (Grunebaum et al., 2011; Sharmeen et al., 2021). Além desses efeitos, os óleos essenciais vêm sendo amplamente utilizados em formulações cosméticas devido às suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Um exemplo é o eugenol, presente nos óleos de cravo e canela, que demonstrou atividade contra *Candida albicans*, destacando seu potencial como ativo funcional em produtos para cuidados com a pele. Esses compostos naturais, portanto, representam alternativas promissoras para o desenvolvimento de cosméticos multifuncionais, alinhando eficácia terapêutica a uma abordagem mais natural e sensorialmente atrativa (Sarkic; Stappen, 2018).

O uso de extratos vegetais como ingredientes ativos também já tem sido descrito, como em formulações anti-acne, nas quais flores de *Arnica montana* e folhas de *Sambucus nigra* demonstraram eficácia na redução de lesões de acne e no eritema da pele, destacando seu potencial terapêutico em produtos especializados para a pele (Malinowska et al., 2022). Extratos polifenólicos, por suas características antioxidantes, são capazes de interferir em diferentes fases do mecanismo de oxidação, reduzindo o dano oxidativo, prevenindo o envelhecimento cutâneo e contribuindo para a fotoproteção. Além disso, esses compostos atuam na preservação da formulação cosmética, prevenindo a deterioração oxidativa e inibindo o crescimento microbiano, o que prolonga a vida útil do produto (Cherubim et al., 2019). O extrato de chá verde (*Camellia sinensis*), rico em epigallocatequina galato, um potente antioxidante e antimicrobiano natural, amplamente utilizado em formulações cosméticas tanto por sua eficácia na proteção contra radicais livres quanto por sua ação conservante (Castro et al., 2023; Hoang et al., 2021). Esses resultados reforçam o papel promissor dos metabólitos fenólicos e dos conservantes de origem vegetal como alternativas eficazes e seguras aos compostos sintéticos, atendendo à crescente demanda por produtos mais naturais e compatíveis com peles sensíveis (Lianqiong, 2016).

O Brasil é um país com a maior biodiversidade do planeta, com uma biota estimada em torno de 20% do número total de espécies da Terra, elevando o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (Brasil, 2018). Logo, apresenta um potencial amplamente inexplorado para descobrir novas composições e aplicações químicas, particularmente em farmacologia, terapêutica e cosmética (Borsoi et al., 2024). A Caatinga é um bioma brasileiro que se destaca, principalmente, por ser exclusivo do país. Suas plantas apresentam diversos aspectos únicos, sobretudo em relação à adaptação climática. Isso acontece, pois esse bioma é afetado por secas extremas e períodos de estiagem, característicos do clima semiárido. Desse modo, a vegetação precisou desenvolver mecanismos de sobrevivência, afetando o metabolismo secundário, como as rotas biossintéticas de compostos fenólicos e óleos essenciais, em razão da pouca disponibilidade de água (Brasil, 2019).

Diversas pesquisas científicas recentes têm evidenciado a importância estratégica da biodiversidade da Caatinga, especialmente no enfrentamento de desafios emergentes da saúde pública, como a resistência bacteriana e infecções virais. Espécies como *Amburana cearensis*, *Hymenaea courbaril* e *Anadenanthera colubrina* destacam-se por suas propriedades farmacológicas promissoras, apresentando atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas relevantes (Santos-Neves et al., 2024; Silva et al., 2012). Além disso, estudos demonstraram que plantas como *Mimosa tenuiflora* e *Croton blanchetianus* possuem atividade antiviral significativa contra vírus envelopados, o que evidencia seu potencial no desenvolvimento de antivirais herbáceos (Sá et al., 2020). Óleos essenciais extraídos de espécies da Caatinga também vêm demonstrando eficácia terapêutica, com potencial para aplicação no tratamento de infecções e inflamações (Sousa et al., 2024). Frente a esse cenário, a valorização do conhecimento tradicional aliado à pesquisa científica torna-se essencial para promover o uso sustentável desses recursos, sobretudo considerando as ameaças ambientais que comprometem a conservação do bioma (Sousa et al., 2024).

Para estimular e garantir a preservação da biodiversidade da Caatinga, estudos com foco em plantas com usos terapêuticos são cruciais, pois ajudam a identificar espécies com potencial farmacológico e evitar a extinção (Santos-Neves et al., 2024). Além disso, estudos indicam que a aceitação dos consumidores de produtos vegetais nativos brasileiros aumenta quando as indústrias se engajam em projetos de conservação e práticas sustentáveis de biodiversidade, alinhando-se aos princípios das estratégias de “marketing verde”. O marketing verde, conforme discutido na literatura, envolve a

promoção de produtos e serviços ecologicamente corretos, que não apenas melhoram a reputação da marca, mas também se alinham aos valores do consumidor, oferecendo uma vantagem competitiva (Sharma, 2024; Borkar, 2023).

2.2 CONSERVANTES NATURAIS EM COSMÉTICOS

Os conservantes desempenham um papel importante nas formulações cosméticas, impedindo o crescimento microbiano, o que é essencial para manter a segurança e a eficácia do produto, particularmente em cosméticos que contêm água (Schneider et al., 2024; Álvarez-Rivera et al., 2017). As bactérias, como as do gênero *Pseudomonas* e as *Enterobacteriaceae*, são comumente isoladas de produtos contaminados, com a capacidade de crescer em produtos aquosos, como cremes e loções, apesar da presença de conservantes, devido a seus mecanismos de resistência (Hartog; Liem, 1981). Além disso, fungos e bolores, que também proliferam em cosméticos com alto conteúdo de água, podem contribuir para a deterioração dos produtos e causar infecções se não forem devidamente controlados (Murphy et al., 2021).

Tradicionalmente, conservantes sintéticos como parabenos e liberadores de formaldeído têm sido amplamente usados devido às suas propriedades antimicrobianas efetivas (Halla et al., 2018; Zhenbin, 2018). Embora tenham alta eficácia antimicrobiana, têm sido associados a riscos à saúde humana e ao meio ambiente, Mitra et al. (2021) aponta que parabenos atuam como desreguladores endócrinos, podendo interferir no sistema hormonal, especialmente em grupos sensíveis como gestantes e crianças. Além disso, sua presença em ambientes aquáticos e em produtos de uso cotidiano evidencia características de bioacumulação e persistência ambiental (Mitra et al., 2021). Esses achados reforçam a necessidade de cautela em seu uso contínuo e a busca por alternativas mais seguras e sustentáveis.

As preocupações com seus potenciais efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente levaram ao aumento da demanda por alternativas naturais (Buckley et al., 2017) e ao surgimento do movimento do "clean beauty" (beleza limpa). É uma tendência de mercado, que por refletir esta preocupação dos consumidores com a saúde, a sustentabilidade ambiental e a transparência na formulação de cosméticos (Nakagami;

Pinto, 2019) desencadeou estudos para o desenvolvimento de novos conservantes de origem vegetal.

A capacidade antimicrobiana das plantas está associada à presença de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas, óleos essenciais e ácidos fenólicos. Esses compostos possuem diferentes mecanismos de ação, como a destruição da membrana celular dos microrganismos, a inibição da síntese de proteínas ou ácidos nucleicos, e a interferência em processos metabólicos essenciais (Cowan, 1999).

Desta maneira, as plantas têm um papel importante como fontes de novas moléculas com potencial antimicrobiano, que é de suma importância na luta contra a resistência bacteriana, uma das maiores ameaças globais à saúde. A pesquisa contínua sobre os mecanismos e a segurança desses fitoquímicos é essencial para sua aplicação bem-sucedida contra patógenos multirresistentes (Angelini, 2024).

O uso de conservantes naturais embora ofereça vantagens em relação às alternativas sintéticas, apresenta desafios notáveis que devem ser enfrentados para aumentar sua eficácia e praticidade. Uma preocupação é a eficácia antimicrobiana geralmente menor dos conservantes naturais em comparação com os sintéticos, o que geralmente requer seu uso em concentrações mais altas ou em combinações estratégicas para alcançar os resultados de preservação desejados (Cedillo-Olivos et al., 2024; Dong et al., 2024). Além disso, os conservantes naturais geralmente enfrentam problemas de estabilidade sob condições variáveis de pH, temperatura e luz, o que pode comprometer a durabilidade e a segurança do produto final (Li et al., 2024; Kumar; Rajput, 2023).

No entanto, avanços tecnológicos têm permitido superar algumas dessas barreiras. A aplicação de bioconservantes derivados de processos fermentativos e o uso de peptídeos antimicrobianos são exemplos de inovações que oferecem maior eficácia e estabilidade, ampliando as possibilidades de uso dos conservantes naturais em diferentes tipos de formulações cosméticas (Maurício et al., 2024).

Diversas espécies vegetais têm sido estudadas por suas propriedades antimicrobianas, como dos óleos essenciais e extratos vegetais de plantas como *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) com eficácia significativa contra uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos Gram-positivos (Upadhyay et al., 2023; Ezzaky et al., 2023; Pinto; Ayala-Zavala, 2024).

As espécies de *Lippia* exibem notável atividade antimicrobiana, com óleos essenciais e extratos de diferentes espécies ou seus quimiotipos demonstrando eficácia contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras com variações nesta ação em função de espécies específicas e/ou métodos de extração empregados. Na avaliação da atividade antimicrobiana de três espécies de *Lippia* (*L. origanoides*, *L. alnifolia*, e *L. thymoides*), tradicionalmente usadas para tratar infecções. *L. origanoides* foi a mais eficaz, combatendo *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* Os extratos tiveram maior efeito contra bactérias Gram-positivas, com valores de CIM entre 0,5 e 1,0 mg/mL. O fracionamento aumentou a atividade, e compostos como terpenos e flavonoides foram detectados, sugerindo o potencial de *L. origanoides* para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (Pinto et al., 2013).

Em uma avaliação da atividade antimicrobiana de três quimiotipos do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra doze cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes variações foram observadas (Uc-Cachón et al., 2024). Os quimiotipos monoterpênicos, contendo carvacrol e timol, exibiram valores de CIM entre 62,5 e 500 µg/mL frente as cepas selecionadas, enquanto o quimiotipo sesquiterpênico, principalmente β-cariofileno, mostrou atividade apenas contra sete cepas na faixa de 125 a 500 µg/mL. Além disso, os quimiotipos fenólicos inibiram a formação de biofilme e exibiram atividade anti-hemólise, indicando sua eficácia potencial contra patógenos bacterianos específicos.

O óleo essencial de *Lippia origanoides*, rico em timol, já tinha demonstrado anteriormente maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, bem como frente a fungos e leveduras (Henao et al., 2010). O óleo foi extraído usando hidrodestilação assistida por micro-ondas e destilação a vapor, demonstrando propriedades antimicrobianas significativas em especial frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromona hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella Pneumoniae* (bactérias Gram-negativas), *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus gallinarum* (bactérias Gram-positivas), *Candida albicans* (levadura) e *Aspergillus niger* (hongofilamentoso).

O óleo essencial de *Lippia origanoides*, com o timol representando 64,1% da composição, também mostrou atividade antimicrobiana contra várias cepas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Pichia pini* e *Candida albicans*, com os menores valores de CIM para bactérias (abaixo de 2 mg/mL) e MFC para leveduras e fungos (menores que

1 mg/mL). Timol e carvacrol foram os principais compostos ativos, sugerindo seu potencial em aplicações medicinais e preservação de alimentos (Chataing et al., 2012).

O óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou eficácia antibacteriana contra cepas multirresistentes como *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*. Os compostos voláteis majoritários, como timol e carvacrol, demonstraram potencial para melhorar a atividade de antibióticos convencionais, como polimixina B, norfloxacin, piperacilina e cefepima, contra essas bactérias. Os resultados sugerem que a combinação deste óleo com antibióticos pode ser uma estratégia promissora no tratamento de infecções respiratórias resistentes (Santos et al., 2023).

A combinação do óleo essencial de *Lippia origanoides* ou timol com fluconazol apresentou efeito sinérgico contra *Candida tropicalis* resistente a azóis, reduzindo as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do antifúngico em até 32 vezes. O tratamento combinado causou danos celulares, incluindo redução do potencial mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, além de alterações estruturais na célula fúngica. Esses achados sugerem que o uso de produtos naturais pode restaurar a eficácia do fluconazol e representar uma alternativa promissora para o tratamento de infecções resistentes (Zapata-Zapata et al., 2023).

O óleo essencial de *Lippia origanoides* revelou que possui atividade antimicrobiana e anti-detecção de quórum, afetando o metabolismo do triptofano e outras vias metabólicas. Em concentrações de 0,37 mg/mL, o óleo demonstrou eficácia contra *Chromobacterium violaceum*. A análise metabolômica destacou a influência do óleo nas vias de biossíntese de nucleotídeos, arginina e vitaminas, sugerindo seu potencial no combate à resistência bacteriana e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Cáceres et al., 2023).

O óleo essencial de *Lippia graveolens* exibiu atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos. O quimiotipo rico em carvacrol também mostrou maior eficácia em comparação ao tipo timol, com CIMs variando de 0,25 a 0,83 µL/mL (Salgueiro et al., 2003).

Os óleos essenciais de *Lippia thymoides*, provenientes de Feira de Santana e Palmeiras, apresentaram composições distintas, sendo o primeiro rico em sesquiterpenos e o segundo em monoterpenos. Ambos demonstraram atividade antifúngica a 10% contra várias espécies de *Candida* isoladas de indivíduos HIV-positivos, sugerindo seu potencial terapêutico no tratamento da candidíase oral (Azevedo et al., 2024). Óleos essenciais de *Lippia thymoides*, contendo altos níveis de

β -cariofileno (17,22% a 26,27%), apresentaram propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, e a levedura *Candida albicans* (Silva et al., 2016).

A atividade antimicrobiana de extratos de água, etanol e metanol de *Lippia adoensis* var. *koseret* contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* foi avaliada. Os extratos etanólicos e metanólicos exibiram atividade antimicrobiana significativa, particularmente contra *S. aureus*, enquanto *E. coli* e *C. albicans* apresentaram maior resistência. A eficácia variou com o solvente de extração, sendo o metanol o mais eficaz, destacando a importância do método de extração na eficácia antimicrobiana (Buli et al., 2015). Estudos indicam que *Lippia* spp. exibem propriedades antibacterianas e antifúngicas potentes, particularmente *L. alba* e *L. gracilis*, que demonstraram eficácia contra vários microrganismos, incluindo dermatófitos como *Microsporum* e *Trichophyton*. A presença de compostos bioativos como carvacrol, timol e citral aumentou sua eficácia (Costa et al., 2017).

As ações antibacterianas e citotóxicas do extrato etanólico e das frações em n-hexano clorofórmio, acetato de etila e água de *Lippia alba* (Mill.) foram avaliadas. A atividade antibacteriana foi testada contra 10 tipos de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras. Todos os extratos mostraram atividade significativa contra as bactérias, exceto *P. aeruginosa*. O extrato etanólico bruto e a fração em n-hexano apresentaram as maiores atividades antibacterianas. A citotoxicidade foi avaliada usando o bioensaio de letalidade de artêmia, com o extrato etanólico bruto apresentando um valor de LC50 de 6,7 μ g/ml. O estudo concluiu que *L. alba* tem potencial antibacteriano e citotóxico (Ali et al., 2023).

Os óleos essenciais e extratos orgânicos de *Lippia alba* têm demonstrado atividade antibacteriana promissora contra diferentes microrganismos patogênicos. Avaliados contra seis cepas bacterianas, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os óleos essenciais apresentaram zonas de inibição variando entre 6 mm e 23 mm, indicando sua eficácia na inibição do crescimento microbiano. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) encontradas variaram de 1,95 a 500 μ g por disco, reforçando o potencial de *Lippia alba* como agente antimicrobiano natural (Islam et al., 2018).

Os óleos essenciais de diferentes quimiotipos de *Lippia alba* demonstraram atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium*

pallidroseum e *Fusarium solani*. O quimiotipo citral foi o mais eficaz, atingindo 100% de inibição do crescimento micelial em baixas concentrações. As concentrações inibitórias mínimas e fungicidas variaram conforme o composto, destacando o potencial desses óleos como alternativas naturais aos fungicidas sintéticos (Peixoto et al., 2018).

Os óleos essenciais de *Lippia javanica* coletados de diferentes localidades na Tanzânia apresentaram composições químicas distintas, sugerindo a existência de quimiotipos. A amostra A continha 91,3% de constituintes identificados, com destaque para limoneno (9,6%), germacreno-D (9,0%), cânfora (7,2%) e linalol (5,4%), enquanto a amostra B possuía 76,0% de constituintes identificados, sendo rica em citral (geranial 21,5% e neral 13,7%) e limoneno (11,3%). Ambas exibiram atividade antimicrobiana moderada a forte contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas, mas foram inativas contra fungos. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) variaram de 2,76 a 9,80 mg/ml, sendo a amostra A mais ativa, provavelmente devido à presença de cânfora e linalol, enquanto a atividade da amostra B pode estar relacionada ao citral. Os resultados indicam que essas populações de *Lippia javanica* podem representar variantes químicas distintas, apesar de sua semelhança morfológica (Ngassapa et al., 2003).

O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer revelou importantes resultados sobre sua composição e propriedades biológicas em função do órgão utilizado. O óleo da folha apresentou rendimento de 3,7%, enquanto o óleo do caule fino teve rendimento de 0,4%. Os principais compostos do óleo foliar foram timol (70,3%), p-cimeno (9,2%), metil timol éter (5,4%) e p-metoxitímol (2,7%). O óleo de caule fino teve timol como principal componente (70,1%), seguido por metil timol éter (4,4%) e p-metoxitímol (4,0%). O óleo demonstrou alta atividade antioxidante, com CE50 (concentração eficaz para 50% da eliminação de radicais) de $35,7 \pm 3,3$ µg/ml, e significativa atividade antifúngica, com a CL50 (concentração letal para 50% dos fungos) de 5,0 µg/ml contra *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Esses resultados indicam o potencial do óleo essencial de *Lippia gracilis* como antioxidante e antifúngico natural, com possíveis aplicações na preservação de alimentos e na medicina (Franco et al., 2014).

Um estudo avaliou o efeito antibacteriano do hidrossol derivado de *Lippia grata* (syn. *L. gracilis*) contra *Salmonella enterica*. Os resultados mostraram que o hidrossol teve efeito bacteriostático em 10 das 12 concentrações testadas. A concentração de 25% foi a mais eficaz, com uma taxa de inibição de 17,39% no crescimento bacteriano.

Quando comparado ao controle com amoxicilina, o hidrossol demonstrou ser um potencial agente antibacteriano natural, útil para o desenvolvimento de tratamentos alternativos contra infecções bacterianas (Medeiros et al., 2024).

Essas descobertas ressaltam o potencial antimicrobiano diverso das espécies de *Lippia*, na forma de óleos essenciais, hidrossol, extratos e frações, destacando suas aplicações potenciais no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e leveduras, ou como conservantes naturais. O futuro dos conservantes naturais e ativos multifuncionais parece promissor, uma vez que a indústria cosmética tem se adaptado rapidamente às mudanças nas preferências dos consumidores e às regulamentações ambientais e de saúde. A combinação da biotecnologia com práticas de sustentabilidade tem potencial para expandir o uso de conservantes naturais, tornando-os mais acessíveis e eficazes. Assim, espera-se que a pesquisa e desenvolvimento para criar soluções que atendam à demanda por produtos mais seguros, sustentáveis e eficazes, sem comprometer a qualidade ou a segurança das formulações cosméticas

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ROS), são moléculas instáveis formadas durante processos metabólicos como a respiração celular e a resposta imunológica. Fatores externos como radiação UV, poluição e tabagismo também contribuem para sua produção (Gupta, 2024; Jomová; Valko, 2011). Embora os radicais livres desempenhem funções fisiológicas essenciais, como sinalização celular, seu excesso pode resultar em danos significativos às células, como peroxidação de lipídios, danos ao DNA e alterações em proteínas e enzimas, levando a doenças como câncer e cardiovasculares (Alves et al., 2012; Barreiros et al., 2006).

Para proteger o organismo desses danos, o corpo conta com defesas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), polifenóis e flavonoides (Guija-Guerra; Guija-Poma, 2023; Samfira; Butnariu, 2012). A ingestão de alimentos ricos em antioxidantes, como frutas e vegetais, pode reforçar a defesa celular e reduzir os efeitos do estresse oxidativo (Gupta, 2024; Ruksaar, 2024).

Além disso, os radicais livres também impactam a conservação de cosméticos e alimentos, causando degradação em suas propriedades sensoriais e nutricionais. Em cosméticos, fatores como ar, luz e calor podem levar à oxidação, prejudicando a cor, a textura e o aroma, o que reduz sua estabilidade e validade (Senthilkumar; Vijayalakshmi, 2024; Garg, 2024). Na indústria alimentícia, a oxidação afeta o sabor, aroma e valor nutricional, comprometendo a qualidade e a durabilidade dos produtos (Biagini et al., 2024). Portanto, a utilização de antioxidantes é essencial para mitigar esses efeitos e aumentar a vida útil de cosméticos e alimentos.

Os antioxidantes, essenciais para neutralizar radicais livres e prevenir o estresse oxidativo, podem ser naturais, como compostos presentes em frutas e vegetais, ou sintéticos, como Butil-hidroxitolueno (Butylated Hydroxytoluene) (BHT) e Butil-hidroxianisol (Butylated Hydroxyanisole) (BHA). Usados em alimentos e cosméticos, eles ajudam a preservar a qualidade e a saúde, protegendo contra doenças como câncer e doenças cardíacas. No entanto, o uso de antioxidantes sintéticos gera controvérsias devido a potenciais riscos à saúde, levando à crescente preferência por alternativas naturais (Reshi et al., 2013; Garg, 2024).

A busca por antioxidantes naturais tem crescido devido às preocupações com a segurança dos compostos sintéticos e os benefícios dos bioativos naturais (Yapici, 2024). Estudos de Kumar et al. (2023) destacam o potencial antioxidante de extratos vegetais, como os de *Terminalia chebula*, *Aloe vera* e *Curcuma longa*, relacionados ao seu conteúdo fenólico (Abril-Ibarra, 2021).

Nos últimos anos, a atividade antioxidante de várias espécies de *Lippia* tem atraído atenção devido ao seu grande potencial de aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, com ênfase em suas propriedades antioxidantes. Essas espécies têm se destacado como uma alternativa natural promissora para combater o estresse oxidativo, ampliando as possibilidades de uso de *Lippia* em produtos que visam a preservação e a saúde (Belew et al., 2023; Stashenko et al., 2014; Sousa et al., 2021).

Um estudo avaliou a composição química e a atividade antioxidante dos óleos essenciais de 12 espécies de *Lippia*, cultivadas na Colômbia. A análise revelou que os óleos essenciais possuem uma alta capacidade antioxidante, superando antioxidantes sintéticos como α -tocoferol e BHT. A presença de compostos como carvacrol e timol foi associada a um desempenho antioxidante superior. Os resultados indicam que os óleos essenciais de *Lippia* são promissores para diversas aplicações industriais (Stashenko et al., 2014).

A composição química e a atividade antioxidante das frações hexânica e etanólica das partes aéreas de dezesseis espécies de *Lippia*: *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Lippia pseudo-thea*, *Lippia sericea*, *Lippia filippeii*, *Lippia lupulina*, *Lippia rosella*, *Lippia aristata*, *Lippia filifolia*, *Lippia rubella*, *Lippia diamantinensis*, *Lippia hermannioides*, *Lippia corymbosa*, *Lippia microphylla*, *Lippia salviifolia*, *Lippia martiana* e *Lippia aff. Microphylla* foram investigadas. As frações etanólicas dessas espécies apresentaram atividade antioxidante superior, e o conteúdo fenólico variou de 105,5 mg/g em *Lippia pseudo-thea* a 255,4 mg/g em *Lippia sericea* (Singulani et al., 2012).

O conteúdo fenólico, flavonoides e a atividade antioxidante de quatro plantas medicinais (*Amomum subulatum*, *Lippia adoensis*, *Coriandrum sativum* e *Ruta chalepensis*) foram avaliados. *Lippia adoensis* se destacou com o maior conteúdo de fenólicos ($50 \pm 0,23$ mg GaE/g) e flavonoides ($20,5 \pm 1,2$ mg QE/g). Apresentou também a melhor atividade antioxidante, com IC₅₀ (Inibição da concentração que causa 50% de inibição) de $77,3 \pm 2,8$ µg/mL (DPPH), $63,2 \pm 2,3$ µg/mL (ABTS) e $15,8 \pm 1,7$ µg/mL (FRAP). Esses resultados sugerem que *Lippia adoensis* é uma excelente fonte de antioxidantes naturais, com grande potencial em aplicações nutricionais e de saúde (Belew et al., 2023).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Lippia alba* e *Lippia origanoides*, usando o ensaio DPPH, foi comparada em um estudo. *L. alba* apresentou um IC₅₀ de 60,16 mg/mL, enquanto *L. origanoides* teve um valor significativamente mais baixo de 0,22 mg/mL, indicando uma atividade antioxidante superior (Filho et al., 2023).

Outros estudos sobre *L. origanoides* Kunth avaliaram a atividade antioxidante e o conteúdo de flavonóides em extratos de folhas. A amostra do Instituto de Ciências Agrárias 1 (IAS 1) obteve a maior atividade antioxidante, com um valor de EC₅₀ de 27,09 µg/mL. Já a amostra do IAS 6 apresentou o maior conteúdo de flavonóides, com 417,04 mg RE/g. Observou-se uma correlação significativa entre o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante, com um coeficiente de correlação de 0,83 (Souza; Fonseca; Silva, 2018).

Em outra análise do óleo essencial de *L. origanoides*, foi observado um poder redutor significativo, com aumento de 183,3%, 276,7% e 351,7% na redução de íons férricos nas concentrações de 100, 300 e 900 µM, respectivamente. O óleo também foi

eficaz na eliminação de radicais DPPH, com valores de 13,49%, 29,84% e 34,12% nas mesmas concentrações. Além disso, inibiu a peroxidação lipídica, reduzindo a formação de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) em 5,21%, 30,46% e 81,20% nas mesmas concentrações. Esses resultados confirmam o potencial do óleo no combate ao estresse oxidativo e no desenvolvimento de tratamentos para doenças relacionadas (Sousa et al., 2021).

O óleo essencial de *L. origanoides* também demonstrou forte atividade antioxidante no teste de ABTS, apresentando um IC₅₀ de 110 µg/mL. Para o teste DPPH, o IC₅₀ foi maior que 1000 µg/mL, indicando menor eficácia. No teste do radical hidroxil, o IC₅₀ foi de 484 µg/mL, e no teste de β-caroteno, obteve IC₅₀ de 215 µg/mL. No teste TBARS, o IC₅₀ foi de 527 µg/mL (Teixeira et al., 2022). Além disso, o óleo essencial de *L. origanoides*, com 56,53% de carvacrol, extraído de plantas cultivadas com fertilização orgânica, demonstrou notável atividade antioxidante, apresentando valores de CE₅₀ de 0,46 mg/mL contra DPPH e 0,13 mg/mL contra ABTS (Teles et al., 2014). Estudos realizados por Souza (2015) também comprovaram que o óleo essencial de *L. origanoides* (com carvacrol como principal composto) desempenhou atividade antioxidante no método DPPH, com valores de CE₅₀ variando de 27,09 a 44,38 µg/mL.

O estudo investigou a atividade antioxidante de *Lippia graveolens*, focando em seus óleos essenciais e compostos polifenólicos. Os óleos essenciais apresentaram inibição da oxidação lipídica de $99,06 \pm 3,91\%$, enquanto a fração polifenólica teve uma significativa atividade antioxidante contra o radical DPPH•, com IC₅₀ de $545,40 \pm 47,2$ µg mL⁻¹ para a variedade “San Pedro” (Bautista-Hernández et al., 2024).

Os resultados discutidos na pesquisa de Dessalegn (2020) indicam que o extrato aquoso:metanol (20:80, v/v) de *Lippia adoensis* var. Koseret apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos ($67,61 \pm 9,89$ mg de ácido gálico equivalente por grama), enquanto o extrato de acetona foi o mais eficaz na extração de flavonóides ($25,24 \pm 0,43$ mg de quercetina equivalente por grama). Além disso, a atividade antioxidante foi destacada, com o extrato aquoso: metanol mostrando forte capacidade de eliminação de radicais DPPH e poder redutor de ferro.

Por outro lado, os extratos de *Lippia thymoides*, provenientes das folhas e caules, mostraram forte atividade antioxidante contra o radical DPPH, mas foram menos eficazes no teste de branqueamento com β-caroteno, indicando uma maior especificidade para os radicais DPPH (Silva et al., 2015a).

Estes resultados indicam a que exploração de antioxidantes provenientes de extratos vegetais tem se mostrado uma alternativa sustentável e promissora e que pode ser aproveitada para a saúde e bem-estar geral.

2.4 FOTOPROTETORES UVA E UVB

A radiação solar ultravioleta (UV) apresenta riscos significativos à saúde da pele, podendo se manifestar em condições agudas e/ou crônicas. Os efeitos agudos incluem queimaduras solares e eritema, enquanto a exposição crônica pode levar ao fotoenvelhecimento e a várias formas de câncer de pele, como câncer de queratinócitos e melanócitos (Krzyszowska et al., 2024; Young, 2023).

A radiação UV é dividida em três regiões: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (200-290 nm). A radiação UVC é efetivamente filtrada pela atmosfera da Terra, particularmente pela camada de ozônio, e não atinge a superfície da Terra (Mandi, 2015; Tyrrell, 2012). A radiação UVB, no entanto, é apenas parcialmente filtrada pela camada de ozônio, permitindo que ela alcance a superfície da Terra, onde pode causar efeitos biológicos significativos (Mandi, 2015; Tyrrell, 2012). O UVB é conhecido por seus efeitos agudos, como eritema (queimadura solar) e seu papel na promoção do bronzeamento de longa duração (Lopes et al., 2012). Também está implicado nos estágios de iniciação e promoção da carcinogênese, contribuindo para o desenvolvimento de cânceres de pele melanoma e não melanoma por meio de danos diretos ao DNA, como a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos, bem como danos indiretos por meio de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Al-Sadek; Yusuf, 2024; Pfeifer; Besaratinia, 2011).

Além do UVB, outros comprimentos de onda como UVA, luz azul e radiação infravermelha também contribuem para danos à pele, incluindo inflamação, danos ao DNA e fotoenvelhecimento, conforme demonstrado em estudos *in vitro* usando modelos de pele de espessura total. Essas pesquisas revelaram que o UVA e a luz azul modulam biomarcadores do fotoenvelhecimento, como colágeno e metaloproteínases, e induzem perda de fibroblastos e marcadores de fotocarcinogênese como p53 e p21 (Montero et al., 2023). O UVA, com sua penetração profunda e presença durante todo o ano, gera espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo, lesões de DNA e mutações subsequentes, contribuindo para o fotoenvelhecimento e fotocâncer (Bernerd

et al., 2022). A radiação UVA está particularmente implicada na patogênese do melanoma, causando danos ao DNA e prejudicando os mecanismos de reparo do DNA, elevando assim o risco de melanoma (Khan et al., 2018).

A incidência de câncer de pele continua aumentando globalmente, apesar das campanhas de saúde pública promover conscientização no uso de proteção solar. A utilização correta de protetores solares são eficazes na mitigação dos efeitos nocivos da UV ao bloquear uma porcentagem significativa dos raios UVB, embora a proteção UVA permaneça menos padronizada. Avanços recentes na tecnologia de proteção solar visam não apenas melhorar a eficácia contra UVB, mas também aumentar a proteção contra radiações de maior comprimento de onda, como UVA e luz azul, por meio de novos filtros e produtos naturais, como compostos derivados de plantas (Aguilera et al., 2023; Raymond-Lezman; Riskin, 2023; Mirza et al., 2023; Mishra, 2024).

Nesse contexto, os fotoprotetores oriundos de espécies vegetais têm ganhado destaque na indústria cosmética e na saúde devido à sua eficácia, segurança e sustentabilidade, sendo uma alternativa promissora aos filtros químicos e físicos tradicionais (Milutinov et al., 2024).

Fotoprotetores à base de plantas ricas em metabólitos secundários, incluindo flavonóides, carotenóides e ácido ferúlico, oferecem propriedades significativas de absorção de UV e benefícios adicionais, como efeitos antioxidantes, anticarcinogênicos e antiinflamatórios, tornando-os adequados para aplicações cosméticas e farmacêuticas (Milutinov et al., 2024). Esses compostos naturais não apenas fornecem fotoproteção preventiva, mas também contribuem para os mecanismos de reparo do DNA, evitando fotoenvelhecimento e os danos à pele causados pela exposição aos raios UV (Singh et al., 2023). Por isso, os fotoprotetores vegetais oferecem uma proteção ampla, combinando a ação contra os danos imediatos da radiação UV com a prevenção de efeitos oxidativos a longo prazo.

Diversas espécies vegetais têm demonstrado eficácia como fotoprotetores. Flavonoides, como a quercetina e a catequina, presentes em plantas como o chá-verde (*Camellia sinensis*), têm a capacidade de absorver radiação UVB e proteger as células cutâneas contra danos oxidativos. Os carotenoides, encontrados em abundância em plantas como a cenoura (*Daucus carota*) e o urucum (*Bixa orellana*), são eficazes na proteção contra os raios UVA devido à sua capacidade de estabilizar os radicais livres gerados pela radiação (Stahl; Sies, 2012). Outro exemplo relevante é o ácido ferúlico, presente em grãos como o arroz (*Oryza sativa*) e o milho (*Zea mays*), que não só atua

como filtro UV natural, mas também potencializa a ação de outros fotoprotetores químicos, aumentando sua estabilidade e eficácia. Além disso, extratos vegetais como os da romã (*Punica granatum*) e da aloe vera (*Aloe barbadensis*) combinam atividade fotoprotetora com propriedades hidratantes e calmantes, tornando-os altamente desejáveis na formulação de cosméticos (Saewan; Jimtaisong, 2015).

A principal vantagem dos fotoprotetores à base de plantas em relação aos filtros químicos tradicionais está em sua maior segurança e biocompatibilidade, tornando-os particularmente adequados para peles sensíveis. Filtros químicos tradicionais, como oxibenzona e octocrileno, têm sido associados a efeitos adversos, como irritação da pele, reações alérgicas e distúrbios hormonais, levando a uma mudança para alternativas mais seguras (Rosic et al., 2023).

Os compostos vegetais possuem um impacto ambiental muito menor em comparação aos filtros químicos, que podem causar danos significativos aos ecossistemas marinhos, como o branqueamento de corais. Esse impacto negativo dos filtros UV químicos, como a oxibenzona e o octinoxato, levou a proibições legislativas em várias regiões devido à sua fotoinstabilidade e aos subprodutos prejudiciais que contribuem para o branqueamento de corais e danos à vida marinha. Em um contexto onde a sustentabilidade é uma prioridade, a indústria cosmética e de saúde tem optado cada vez mais por compostos vegetais como alternativa. (Khanna; Singh, 2022).

Outro benefício relevante dos extratos vegetais é sua multifuncionalidade. Além de oferecerem proteção solar, eles também apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hidratantes. Essas características ampliam suas aplicações em cosméticos, atendendo à demanda de consumidores que buscam produtos mais completos e com menos ingredientes sintéticos. Por exemplo, a composição rica em compostos bioativos de plantas como *Physalis alkekengi L.* tem demonstrado eficácia na redução do estresse oxidativo e da inflamação, sendo valiosa tanto para o tratamento de doenças inflamatórias da pele quanto para a promoção da saúde cutânea (YUAN et al.; 2025).

Outras espécies, como *Garcinia brasiliensis*, também demonstraram atividades fotoprotetoras, embora seja necessário realizar mais investigações para confirmar sua eficácia em formulações para proteção solar (Paixão et al., 2023). Extratos de espécies oriundas do Parque Nacional Restinga de Jurubatiba, tais como *Baccharis reticularia*, *Eugenia pruniformis*, *Myrsine rubra*, entre outras, mostraram FPS superior a 1, com uma mistura de espécies alcançando o maior valor de FPS de 9,9 (Reis et al., 2024). A

atividade antioxidante foi particularmente alta para *Myrsine rubra*, superando referências como o ácido ascórbico.

Uma análise bibliométrica indicou lacunas significativas no conhecimento sobre essas propriedades, sugerindo a necessidade de mais estudos para explorar seu potencial em cosméticos e aplicações dermatológicas. Espécies como *Schinus terebinthifolius* também se destacaram por apresentar um fator de proteção solar (FPS) de 32,40, o que sugere um grande potencial fotoprotetor (Castro et al., 2022). Plantas amazônicas, como *Aniba canelilla* e *Brosimum acutifolium*, possuem forte atividade antioxidante e protetora solar, tornando-se opções interessantes para a indústria cosmética (Martins et al., 2016). Além disso, plantas do Cerrado, como *Lippia microphylla* e *Dimorphandra gardneriana*, apresentaram altos valores de SPF, com destaque para a primeira, que alcançou um SPF de 26,82 (Nunes et al., 2018).

Espécies do gênero *Campomanesia* também apresentaram absorção nas regiões UVA e UVB, com algumas formulações atingindo FPS superior a 6, indicando um grande potencial para uso em cosméticos (Catelan et al., 2019). *Schinopsis brasiliensis* e *Dalbergia ecastaphyllum* mostraram, além de uma forte atividade antioxidante, um bom potencial para a proteção solar, com valores de FPS superiores a 6 (Lima-Saraiva et al., 2017; Morais et al., 2018).

O gênero *Lippia* tem ganhado destaque devido às suas propriedades fotoprotetoras, especialmente na formulação de protetores solares naturais. A eficácia fotoprotetora das espécies de *Lippia* está diretamente relacionada ao seu alto teor de polifenóis totais, incluindo flavonoides, que são fundamentais tanto pela sua capacidade antioxidante quanto pela absorção de radiação UV. Esses compostos desempenham um papel crucial na proteção contra danos induzidos pela exposição solar, sendo essenciais para a eficácia dos extratos dessas plantas em protetores solares naturais (Polonini et al., 2014; Arruda et al., 2021; Nolasco-Ontiveros et al., 2024).

Estudos indicam que o extrato de *Lippia graveolens* absorve eficientemente a radiação UVB e penetra na pele de camundongos, ampliando seus efeitos fotoprotetores (García-Bores et al., 2017). Além disso, *Lippia graveolens* demonstrou efeitos fotoquimiopreventivos significativos contra a carcinogênese cutânea induzida por UVB. O extrato metanólico dessa espécie exibiu atividade de eliminação de radicais livres e protegeu camundongos SKH-1 contra o câncer de pele induzido por UVB (García-Bores et al., 2017).

Óleos essenciais das espécies *Lippia* demonstraram efeitos antigenotóxicos contra danos ao DNA induzidos por radiação UV. Entre as espécies estudadas, *Lippia graveolens* apresentou o maior potencial genoprotetor, seguida por *Lippia origanoides* e *Lippia alba*. A antigenotoxicidade desses óleos essenciais é atribuída a seus principais constituintes, como timol, carvacrol e citral, que se mostraram eficazes na redução da genotoxicidade induzida por UV e são solúveis em água (Ruiz et al., 2017).

A incorporação de fotoprotetores vegetais reflete a crescente demanda por produtos mais naturais, sustentáveis e seguros. Na indústria cosmética, esses ingredientes não apenas atendem às expectativas dos consumidores em relação à saúde e ao bem-estar, mas também contribuem para a inovação de produtos multifuncionais, que combinam proteção solar com benefícios adicionais, como a prevenção do envelhecimento precoce e a hidratação da pele (Verma et al., 2023).

2.5 FAMÍLIA VERBENACEAE E O GÊNERO *Lippia*

Atualmente, a família Verbenaceae tem 32 gêneros aceitos e aproximadamente 800 espécies. Esta atualização reflete mudanças significativas desde o último estudo abrangente em 2004, que estimou cerca de 1200 espécies em 34 gêneros. Os números revisados são baseados em uma compilação de estudos taxonômicos e filogenéticos recentes, fornecendo uma representação mais precisa da diversidade e distribuição da família (Cardoso et al., 2021). Esta família é encontrada predominantemente nas regiões neotropicais, como o Brasil sendo um notável centro de diversidade, hospedando cerca de 280 espécies em 16 gêneros, particularmente prosperando nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (Cardoso et al., 2021). A família também é notável por sua utilidade, com 46 espécies identificadas como comestíveis, principalmente por suas propriedades aromáticas (Moroni et al., 2021).

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) é um grupo diverso, com aproximadamente 140 espécies, distribuídas principalmente nas regiões temperadas e tropicais da América do Sul e do Caribe, com algumas espécies também encontradas na África e na Ásia (Figura 1) (Mirra et al., 2024; Pickering, 2024.).

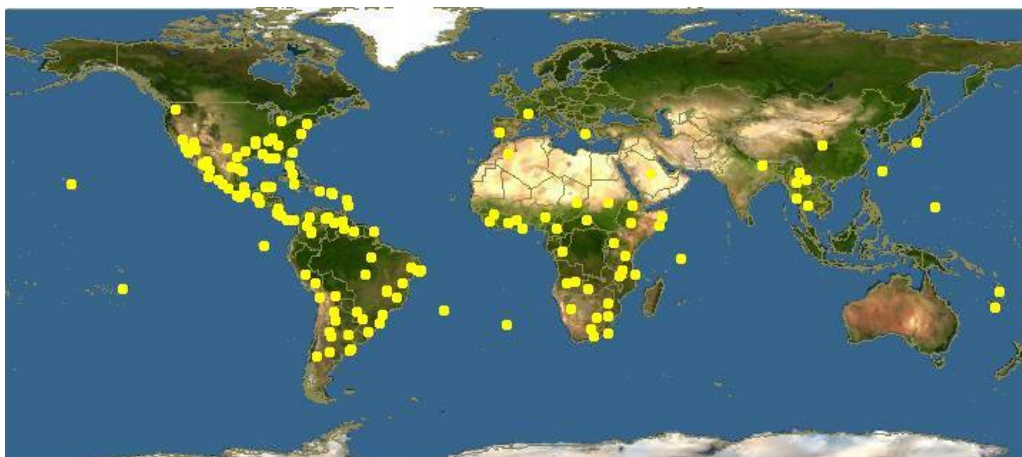


Figura 1: Distribuição do gênero *Lippia* no mundo.
Fonte: Pickering, 2024.

No Brasil há registro de 92 espécies de *Lippia*, das quais 65 são endêmicas, distribuídas em todas as regiões do país. Porém, a maioria está localizada nos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, principalmente no Cerrado e na Caatinga (Salimena; Cardoso, 2025). Devido a fatores ecológicos, biológicos e a ameaças como a antropização de locais de ocorrência e mudanças climáticas, muitas espécies brasileiras estão ameaçadas de extinção (Martinelli; Messina; Santos Filho, 2014). Segundo o Centro Nacional de Conservação da Flora (Martinelli; Messina; Santos Filho, 2014), dezenove espécies de *Lippia* encontram-se no Livro Vermelho da Flora do Brasil e categorizadas conforme a situação de risco em: menos preocupante (*Lippia bellatula* Moldenke, *Lippia diamantinensis* Glaziov, *Lippia pusilla* T.R.S.Silva & Salimena), com dados insuficientes (*Lippia ciliata* Salimena, *Lippia ramboi* Moldenke), vulnerável (*Lippia elliptica* Schauer, *Lippia gardneriana* Schauer, *Lippia grandiflora* Mart. & Schauer, *Lippia insignis* Moldenke; *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, *Lippia bradei* Moldenke) e em perigo (*Lippia bromleyana* Moldenke, *Lippia campestris* Moldenke, *Lippia duartei* Moldenke, *Lippia macedoi* Moldenke, *Lippia morii* Moldenke, *Lippia rhodocnemis* Mart. & Schauer, *Lippia rubella* (Moldenke) T.R.S.Silva & Salimena e *Lippia nana* Schauer).

A bioprospecção, associada a estudos agrônômicos, pode levar a conservação *in situ* ou *ex situ* de espécies de importância econômica, auxiliando assim na preservação de recursos genéticos (Yadav et al., 2024). Para se verificar o quantitativo de estudos científicos com o gênero, foi realizada uma busca utilizando-se o termo “lippia” nas bases de dados Library Online (SciELO), Science Direct, Lilacs, PubMed, Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME),

SciFinder e Cochrane Library para o período anterior a agosto de 2021. As referências e os resumos dos trabalhos obtidos a partir da consulta a essas bases de dados foram exportadas para o programa EndNote Web versão 20, utilizando-se a ferramenta disponibilizada pelo programa para a remoção dos trabalhos repetidos. Dentre essas buscas inicialmente foram encontrados total de 6.814 artigos, quando removidas as duplicatas restaram 3547 artigos, porém em muitos artigos não foram citadas a palavra “lippia” nem no título nem no resumo sendo removidos, totalizando 2.090 artigos.

Após a remoção de algumas espécies que não pertencem mais ao gênero *Lippia* segundo a base de dados Flora do Brasil (Martinelli; Messina; Santos Filho, 2014): *Lippia canescens* = *Phyla nodiflora* var. *minor*; *Lippia citriodora* = *Aloysia citrodora* Palau; *Lippia deserticola* = *Aloysia deserticola*; *Lippia hastulata* = *Aloysia salsoloides*; *Lippia lycioides* = *Aloysia gratissima*; *Lippia nodiflora* Linn. = *Phyla nodiflora*; *Lippia polystachya* = *Aloysia polystachya*; *Lippia strigulosa* = *Phyla nodiflora* var. *reptans*; *Lippia triphylla* = *Aloysia citrodora* Palau; *Lippia ukambensis* Vatke = *Lantana ukambensis* (Vatke) Verdc.; *Lippia urticoides* Staud = *Aloysia virgata*; *Lippia wrightii* = *Aloysia scorodonoides* (Kunth) Cham. restaram 1971 artigos, demonstrando a atenção científica que este gênero tem recebido.

Com base nesse levantamento foi possível verificar as espécies mais estudadas conforme tabela 1:

Tabela 1: Número de Artigos e Sinonímias das Espécies de *Lippia* Mais Estudadas

Espécie	Sinonímias	Número de Artigos
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	<i>L. berlandieri</i> Schauer; <i>L. glandulosa</i> Schauer; <i>L. graveolens</i> Kunth; <i>L. microphylla</i> Cham; <i>L. palmeri</i> Watts; <i>L. rigida</i> Schauer; <i>L. schomburgkiana</i> Schauer; <i>L. salviaefolia</i> Cham.; <i>L. sidoides</i> Cham.; <i>L. velutina</i> Schauer	656
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	<i>L. geminata</i> var. <i>microphylla</i> Griseb.; <i>L. lantanifolia</i> F. Muell.	500
<i>Lippia grata</i> Schauer	<i>Lippia laxibracteata</i> Herzog; <i>Lippia gracilis</i> Schauer	116
<i>Lippia multiflora</i>	-	97
<i>Lippia javanica</i>	-	89

Os artigos científicos foram analisados quanto às categorias do assunto, e o gênero *Lippia* vem sendo estudado em diferentes áreas de conhecimento, com destaque em Etnofarmacologia, Fitoquímica, Botânica, Agricultura e Ecologia, com grande predominância de investigações envolvendo os óleos essenciais, pelo fato da maioria das espécies serem aromáticas. Abaixo está a tabela 2 com as espécies e assuntos encontrados, alguns artigos abordaram mais de um tema.

Tabela 2: Estudos com espécies *Lippia*

Categoria	Farmacologia	Agronomia	Fitoquímica	Botânica	Ecologia	Etnofarmacologia	Toxicológico	Veterinária	Cosmética	Revisões
<i>L. adoensis</i>	9	5	23	2	1	4	1	0	0	2
<i>L. alba</i>	181	131	296	61	10	40	26	22	2	6
<i>L. alnifolia</i>	2	1	3	-	-	1	-	-	1	-
<i>L. americana</i>	2	-	3	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. aristata</i>	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. balansae</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brasiliensis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-
<i>L. carviadora</i>	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. chevalieri</i>	3	1	6	-	-	3	-	-	-	-
<i>L. chiapasensis</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. dauensis</i>	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. dulcis</i>	13	6	30	17	2	4	4	1	-	2
<i>L. filifolia</i>	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. florida</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. grandifolia</i>	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. grandis</i>	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. grata</i>	28	32	79	23	1	3	7	2	-	1
<i>L. grisebachiana</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. hirsuta</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. hirta</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>L. integrifolia</i>	7	4	29	5	-	1	1	-	1	1
<i>L. javanica</i>	28	33	47	5	1	18	3	2	-	3
<i>L. junelliana</i>	4	3	11	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kituiensis</i>	4	2	3	-	-	1	1	-	-	-
<i>L. lacunosa</i>	3	1	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lasiocalycina</i>	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. lupulina</i>	2	-	3	3	-	-	-	-	-	-
<i>L. macrophylla</i>	-	1	2	-	-	-	1	-	-	-
<i>L. mexicana</i>	1	-	2	-	-	1	-	-	-	-
<i>L. microcephala</i>	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-
<i>L. micromera</i>	2	2	9	3	-	1	2	-	-	-
<i>L. myriocephala</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. origanoides</i>	151	47	205	22	3	12	4	13	0	8
<i>L. pedunculosa</i>	3	2	5	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. plicata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>L. pseudothea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>L. radula</i>	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. rehmannii</i>	9	-	7	4	-	-	2	2	-	-
<i>L. rotundifolia</i>	2	4	15	4	2	-	-	2	2	-
<i>L. rubella</i>	6	2	6	-	-	-	-	-	1	-
<i>L. rugosa</i>	5	4	9	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. salsa</i>	1	1	2	-	-	-	-	-	1	-
<i>L. scaberrima</i>	9	4	12	2	-	-	-	1	-	2
<i>L. schaueriana.</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. somalensis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. stachyoides</i>	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. stoechadifolia</i>	-	2	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>L. substrigosa</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. thymoides</i>	10	3	9	1	-	2	-	-	-	-
<i>L. triplinervis</i>	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. turbinata</i>	18	9	35	3	-	3	-	1	2	-

<i>L. turnerifolia</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. nana</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>L. pretoriensis</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Lippia</i> ssp.	36	17	30	18	3	3	3	3	1	10
Total	542	327	922	182	23	98	58	49	13	36

Os dados apresentados na tabela 2 evidenciam a diversidade de aplicações das espécies do gênero *Lippia* em diferentes áreas do conhecimento, refletindo a ampla gama de propriedades e utilidades dessas plantas. A análise dos números permite identificar áreas de destaque e aquelas que demandam maior investigação científica.

A análise do gênero *Lippia* revelou um panorama multifacetado de pesquisas, sendo a farmacologia a categoria com destaque, somando 542 publicações. Este volume expressivo de estudos reflete o crescente interesse em explorar as propriedades terapêuticas dessas espécies, como suas atividades analgésica, antimicrobiana, antioxidante, neurossedativa e anticâncer. Além disso, investigações voltadas para psicofarmacologia, parasitologia, fitoterapia e fitofarmacovigilância reforçam o potencial ainda inexplorado para o desenvolvimento de novos medicamentos, apontando para um campo fértil de inovação farmacêutica.

A agronomia surge como a terceira área mais explorada, com 327 estudos voltados para o cultivo, controle de pragas, sazonalidade e impactos ambientais, além de propriedades repelentes e no controle de fitopatógenos. Esses estudos evidenciam a relevância econômica do gênero *Lippia*, especialmente em regiões agrícolas, onde há uma busca constante por soluções sustentáveis e eficientes para os desafios da produção.

Por sua vez, a fitoquímica destaca-se como a categoria com maior número de publicações, acumulando 922 estudos. Esse expressivo volume de pesquisas evidencia o interesse no perfil químico das espécies, abordando a composição e extração de compostos bioativos. As investigações fitoquímicas são de fundamental importância para subsidiar avanços em áreas como farmacologia, cosmética e toxicologia, além de contribuir para a compreensão das propriedades biológicas das espécies.

A botânica, com 182 publicações, foca em aspectos taxonômicos, morfológicos e fisiológicos, além de abordar interações ecológicas. Estudos de quimiotipos e morfótipos são cruciais para diferenciar espécies e compreender suas características adaptativas, fornecendo subsídios para aplicações em conservação e manejo das espécies de *Lippia*.

Apesar de menos explorada, com apenas 23 estudos, a ecologia traz contribuições relevantes ao tratar de interações ecológicas, polinização, dispersão de sementes e conservação ambiental. Essas pesquisas são indispensáveis para o manejo sustentável do gênero, além de contribuir para a preservação de habitats naturais que abrigam essas espécies.

A etnobotânica e a etnofarmacologia, com 98 estudos, destacam o uso tradicional de espécies de *Lippia* em comunidades. Essa abordagem valoriza o conhecimento tradicional e conecta-o ao meio científico, promovendo inovações baseadas em práticas culturais, o que é especialmente relevante em contextos de valorização da biodiversidade e inclusão social.

Na área de toxicologia, com 58 estudos, as pesquisas focam em aspectos como genotoxicidade, fitotoxicidade e citotoxicidade. Esses estudos são fundamentais para garantir a segurança do uso de compostos de *Lippia* em formulações farmacêuticas, cosméticas e agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes.

A aplicação de *Lippia* em medicina veterinária também apresenta um campo promissor, com 49 estudos relacionados ao uso como anestésico para peixes e suplementação alimentar para camarões. Essas investigações ampliam as possibilidades de aplicação do gênero em áreas pouco exploradas, com potencial impacto econômico. Na cosmética, embora com apenas 13 estudos, o gênero *Lippia* mostra potencial significativo em cosmetologia e perfumaria, consolidando sua relevância no mercado de produtos naturais e sustentáveis. Esses estudos reforçam o apelo crescente por alternativas mais ecológicas na indústria cosmética.

Finalmente, revisões e estudos gerais, com 36 publicações, consolidam o conhecimento existente sobre o gênero *Lippia*, abordando desde o uso medicinal até estudos taxonômicos, genéticos e de fitofarmacovigilância. Essas revisões não apenas sintetizam os avanços científicos, mas também indicam lacunas importantes para pesquisas futuras.

De maneira geral, os dados analisados evidenciam o potencial diversificado do gênero *Lippia*, com aplicações que se estendem da farmacologia à agronomia, passando por áreas como veterinária e cosmética. No entanto, lacunas significativas permanecem em categorias como ecologia e etnobotânica, destacando a necessidade de maior atenção e investimentos nessas áreas. A integração de diferentes disciplinas é essencial para

maximizar os benefícios do uso dessas espécies, promovendo avanços científicos e tecnológicos que contribuam para a sustentabilidade e a inovação.

Foi avaliado também atualizações de sinônimos da espécie *Lippia*, pois é um processo contínuo e fundamental para o avanço do conhecimento científico. A taxonomia moderna tem se beneficiado de análises moleculares, como o sequenciamento de DNA, que ajudam a esclarecer relações filogenéticas entre espécies. Muitas plantas, anteriormente classificadas como distintas com base em características morfológicas, têm sido unificadas sob um único nome científico devido à similaridade genética (Nitta et al., 2022). Como demonstrado na tabela 3 as sinonímias de *Lippia alba*, como *Lippia geminata* e *Lippia lantanifolia*, representam variações morfológicas dentro de uma mesma espécie. De maneira semelhante, *Lippia origanoides* reúne uma extensa lista de sinônimos, como *Lippia berlandieri*, *Lippia graveolens* e *Lippia sidoides*, refletindo a complexidade taxonômica dessa espécie e a necessidade de revisões contínuas.

Tabela 3: Espécies *Lippia* e seus sinônimos

Espécie	Sinônimos
<i>Lippia adoensis</i>	-
<i>Lippia alba</i>	<i>Lippia geminata</i> , <i>Lippia lantanifolia</i>
<i>Lippia alnifolia</i> Schauer	-
<i>Lippia americana</i>	-
<i>Lippia aristata</i> Schauer	-
<i>Lippia balansae</i>	-
<i>Lippia boliviana</i>	<i>Lippia integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.
<i>Lippia brasiliensis</i>	-
<i>Lippia carviodora</i> minor	<i>Lippia carviodora</i> Meikle
<i>Lippia chevalieri</i> Moldenke	-
<i>Lippia chiapasensis</i> berlandieri	-
<i>Lippia dauensis</i>	-
<i>Lippia dulcis</i>	<i>Lippia asperifolia</i> Rich
<i>Lippia filifolia</i> Mart.	-
<i>Lippia florida</i>	-
<i>Lippia grandifolia</i>	<i>Lippia abyssinica</i>
<i>Lippia grandis</i> Schau	-
<i>Lippia grata</i> Schauer	<i>Lippia gracillis</i> Schauer, <i>Lippia laxibracteata</i>
<i>Lippia grisebachiana</i>	<i>Lippia lantanifolia</i> Griseb
<i>Lippia hirsuta</i>	-
<i>Lippia hirta</i>	-
<i>Lippia integrifolia</i>	-
<i>Lippia javanica</i>	-

<i>Lippia junelliana</i>	-
<i>Lippia kituiensis</i> Vatke	-
<i>Lippia lacunosa</i> Mart. & Schauer	-
<i>Lippia lasiocalycina</i> Cham	-
<i>Lippia lupulina</i>	-
<i>Lippia macrophylla</i>	-
<i>Lippia mexicana</i>	-
<i>Lippia microcephala</i> Cham.	<i>Lippia hermannioides</i> Cham.
<i>Lippia micromera</i> Schauer	<i>Lippia helleri</i>
<i>Lippia myriocephala</i>	-
<i>Lippia nana</i> Schauer	<i>Lippia pumila</i> Cham.
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	<i>Lippia berlandieri</i> Schauer, <i>Lippia glandulosa</i> Schauer, <i>Lippia graveolens</i> Kunth, <i>Lippia microphylla</i> Cham, <i>Lippia palmeri</i> Watts, <i>Lippia rígida</i> , <i>Lippia schomburgkiana</i> , <i>Lippia salviaefolia</i> , <i>Lippia sidoides</i> Cham., <i>Lippia velutina</i>
<i>Lippia pedunculosa</i> Hayek	-
<i>Lippia plicata</i>	-
<i>Lippia pretoriensis</i> (Pears)	<i>Lippia rehmannii</i>
<i>Lippia pseudothea</i>	-
<i>Lippia radula</i> Sw.	-
<i>Lippia rehmannii</i>	<i>Lippia wilmsii</i> H.H.W.
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	-
<i>Lippia rubella</i>	-
<i>Lippia rugosa</i>	-
<i>Lippia salsa</i> Griseb.	-
<i>Lippia scaberrima</i>	-
<i>Lippia schaueriana</i> Mart.	-
<i>Lippia somalensis</i>	-
<i>Lippia stachyoides</i>	-
<i>Lippia stoechadifolia</i>	-
<i>Lippia substrigosa</i>	<i>Lippia umbellata</i>
<i>Lippia thymoides</i>	-
<i>Lippia triplinervis</i> Gardner	-
<i>Lippia turbinata</i>	-
<i>Lippia turnerifolia</i>	-

Outro fator importante é o regionalismo na nomenclatura botânica, que historicamente levou à criação de múltiplos nomes para uma mesma espécie. Diferentes botânicos, trabalhando em contextos distintos, frequentemente nomearam plantas de maneira independente, contribuindo para a duplicação de nomenclaturas. Isso é particularmente evidente em espécies amplamente distribuídas, como *Lippia*

origanoides. A padronização desses nomes é essencial para evitar redundâncias e criar uma base de dados taxonômica unificada, especialmente em esforços globais de conservação e catalogação (Dietz et al., 2019).

Os avanços na morfologia comparativa também desempenham um papel crucial. Estudos mais detalhados de estruturas vegetais, como tricomas, flores e sementes, têm permitido uma diferenciação mais precisa entre espécies. No entanto, a variabilidade morfológica ainda é um desafio. Por exemplo, espécies como *Lippia micromera* e *Lippia helleri*, consideradas sinônimas em algumas classificações, podem ser revisitadas no futuro à medida que novas características diferenciadoras sejam descobertas (Jeiter; Smets, 2024; Salmeri, 2018).

A atualização correta dos sinônimos na taxonomia vegetal é crucial para vários campos, incluindo fitoterapia, bioprospecção e conservação ambiental, pois garante a identificação e utilização precisas das espécies vegetais. Na fitoterapia, a identificação incorreta de materiais vegetais devido a nomenclaturas desatualizadas pode levar ao uso de espécies incorretas, resultando potencialmente em tratamentos ineficazes ou prejudiciais. Esse problema é exacerbado pela dependência de nomes vernáculos, que podem ser inconsistentes e enganosos, destacando a necessidade de nomenclatura científica precisa e comprovação por especialistas para evitar erros (Bankman-Fried, 2021). No comércio global de vegetais, o uso de vários sistemas nomenclaturais, incluindo binômios latinizados e definições farmacopeicas, ressalta a complexidade da identificação de plantas, onde sinônimos podem obscurecer a verdadeira identidade e qualidade dos materiais de plantas medicinais (Upton, 2022).

2.5.1 *Lippia thymoides*

Lippia thymoides Mart. & Schauer é nativa e endêmica do Brasil, sua ocorrência foi confirmada no Sudeste (Minas Gerais) e Nordeste (Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), sobretudo nas áreas de vegetação da Caatinga e Cerrado do Brasil (Salimena; Mulgura, 2020). É um arbusto de 0,5 a 1,5 m de altura (Figura 2), conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou alecrim-do-mato, a qual é utilizada pela população contra gripe, tosse, cansaço, nariz entupido, febre, reumatismo, aparelho

digestivo, assim como nos banhos e no candomblé (Silva; Oliveira; Silva, 2010; Almeida, 2011; Gomes; Bandeira, 2012).



Figura 2: *Lippia thymoides*.

Fonte: Autora, 2025.

L. thymoides apresenta quatro sinônimos botânicos descritos na literatura: *L. micromera* var. *tonsilis* Moldenke, *L. satureiaefolia* Mart. & Schauer, *L. thymoides* var. *mucronulata* Moldenke; *L. thymoides* var. *tonsilis* Moldenke (Salimena; Mulgura, 2020).

Com relação a ensaios biológicos, os extratos metanólicos do caule e folhas e suas respectivas frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) apresentaram atividade frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, sendo que a fração que apresentou um maior espectro de atividade foi a em diclorometano, oriunda do extrato metanólico das folhas (Silva et al., 2015b). Atividade antipirética e espasmolítica também foram relatadas para esses extratos e frações, com destaque para o efeito espasmolítico em traqueia de cobaias da fração em diclorometano das folhas (Silva, 2012).

A atividade *in vitro* espasmolítica e antidiarreicas *in vivo* do óleo essencial demonstraram que o efeito antidiarreico provavelmente está relacionado à inibição da contração do músculo liso, podendo haver correlação com a concentração do composto β -cariofileno (Menezes et al., 2018).

Algumas substâncias e misturas foram isoladas e elucidadas (3,5-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona; 7,4'-dimetilaromadendrina; rhamnocitrina; eupalitina; mistura de hispidulina e jaceosidina; α -amirina; e a mistura de β sitosterol e estigmasterol) de *L.*

thymoides. As quais foram testadas em traqueia isolada de *Cavia porcellus* para análise de relaxamento de musculo liso. Os resultados demonstraram que a espécie é promissora para a obtenção de compostos com potente ação relaxante sobre o músculo liso de traqueia isolada de cobaia (Magalhães, 2018).

Os óleos essenciais derivados de *L. thymoides* têm sido amplamente estudados por suas atividades antimicrobianas e antifúngicas. O estudo do óleo essencial das folhas de *L. thymoides*, coletadas numa população presente no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana - Bahia, apresentou o sesquiterpeno β -cariofileno (17,22-26,27%) como constituinte majoritário, seguido por borneol (4,45-7,36%), cânfora (3,22-8,61%), canfeno (2,64-5,66%) e germacreno D (4,72-6,18%). Ensaios *in vitro*, demonstraram a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos e ação antinociceptiva (Silva et al., 2015a). Notavelmente, esses óleos mostraram eficácia contra espécies de *Candida*, que são comuns em infecções orais entre indivíduos HIV-positivos. Os óleos essenciais de diferentes regiões do Brasil, como Feira de Santana e Palmeiras, apresentam composições químicas variadas, com predominância de sesquiterpenos e monoterpenos, respectivamente. Esses óleos demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*, sugerindo potencial como opção terapêutica para candidíase oral (Azevedo et al., 2024).

O timol, um dos principais componentes do óleo essencial de *L. thymoides*, foi identificado como um composto chave responsável por suas propriedades antimicrobianas. Ele interage favoravelmente com alvos moleculares de patógenos como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, conforme demonstrado por meio de estudos *in silico* (Cruz et al., 2022).

A eficácia antimicrobiana da *L. thymoides* é ainda apoiada por sua atividade contra bactérias Gram-negativas, como *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, com o timol sendo um ingrediente central que contribui para suas potentes atividades fungicidas, bactericidas e anti-inflamatórias (Carvalho et al., 2021). Além disso, o óleo essencial também exibiu atividade antioxidante significativa, com folhas frescas mostrando a maior inibição dos radicais DPPH (Nascimento et al., 2021).

Essas descobertas destacam o potencial da *Lippia thymoides* como fonte de compostos naturais para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, particularmente no contexto do aumento da resistência aos agentes antifúngicos convencionais (Azevedo et al., 2024; Carvalho et al., 2021).

2.6 EXTRATOS FERMENTADOS

A fermentação é um processo metabólico utilizado por diversos microrganismos, permitindo sua sobrevivência em ambientes anaeróbicos por meio da conversão de compostos orgânicos em energia e subprodutos valiosos. Esse processo não apenas garante a manutenção da atividade microbiana, mas também apresenta aplicações significativas em biotecnologia, sobretudo na transformação de matérias-primas em metabólitos bioativos. Do ponto de vista bioquímico, a fermentação envolve reações de oxirredução em que compostos orgânicos atuam simultaneamente como doadores e aceptadores de elétrons, possibilitando a produção de ATP por fosforilação em nível de substrato (Müller, 2001). Entre as principais vias metabólicas destacam-se a fermentação láctica, a alcoólica e a acética, cada uma caracterizada pela formação de diferentes subprodutos, como lactato e etanol (Akila, 2024). A fermentação láctica, comumente aplicada em produtos lácteos e vegetais, contribui para a preservação e o aprimoramento sensorial dos alimentos (Akila, 2024). Já a fermentação alcoólica, utilizada em processos como a produção de cervejas e vinhos, converte açúcares em etanol e dióxido de carbono (Akila, 2024). A fermentação acética, por sua vez, é essencial na fabricação de vinagre, resultando da oxidação do etanol em ácido acético (Akila, 2024). Além de seu papel na produção de alimentos, a tecnologia de fermentação possui relevância estratégica na geração de antibióticos, enzimas e outros compostos bioativos, sendo potencializada por avanços na engenharia metabólica que permitem aumentar o rendimento dos produtos (Rathod et al., 2024). Adicionalmente, esse processo contribui para a sustentabilidade ao possibilitar a conversão de resíduos em produtos de valor agregado, mitigando desafios ambientais e econômicos (Rathod et al., 2024). Apesar de seus inúmeros benefícios, é importante considerar que o uso da fermentação em escala industrial também apresenta limitações, incluindo riscos de contaminação e a necessidade de atender a rigorosos requisitos regulatórios em aplicações comerciais.

Microrganismos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm se destacado nesse processo na indústria cosmética, convertendo compostos vegetais em substâncias como ácidos orgânicos, peptídeos bioativos e exopolissacarídeos. Esses metabólitos possuem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas e hidratantes, tornando-

os essenciais para produtos voltados ao cuidado e à saúde da pele (Herman; Herman, 2023; Dou et al., 2023).

Uma das principais mudanças bioquímicas promovidas pela fermentação é o metabolismo de carboidratos. Os probióticos convertem açúcares presentes nos extratos vegetais, como glicose, frutose ou oligossacarídeos, em ácido lático, ácido acético e outros compostos orgânicos. O ácido lático reduz o pH do substrato, criando um ambiente ácido que preserva os compostos bioativos e melhora a estabilidade do produto final (Oey; Agyei, 2023; Gänzle, 2015). Esse ácido também é amplamente utilizado em cosméticos devido às suas propriedades hidratantes, capacidade de estimular a renovação celular e sua ação como agente esfoliante suave (Mousavi et al., 2013).

Além disso, outros metabólitos, como os exopolissacarídeos (EPS), aumentam a viscosidade e a textura dos produtos cosméticos, formando uma barreira protetora na pele e promovendo maior retenção de umidade (Bintsis, 2018). Outro aspecto importante da fermentação de extratos vegetais é a transformação de compostos fenólicos e antioxidantes. Os vegetais são naturalmente ricos em polifenóis, flavonoides e taninos, que possuem propriedades antioxidantes essenciais para a neutralização de radicais livres e a proteção da pele contra o envelhecimento precoce. (Wang et al., 2020). Durante a fermentação, enzimas produzidas pelos probióticos, como glicosidases e esterases, hidrolisam polifenóis complexos em formas mais simples e biodisponíveis, como ácidos fenólicos. Compostos como ácido gálico, ácido ferúlico e resveratrol apresentam maior eficácia antioxidante e maior capacidade de penetração na pele após a fermentação. Esses metabólitos bioativos também possuem propriedades anti-inflamatórias, ajudando a atenuar condições como rosácea, acne e inflamações associadas ao envelhecimento cutâneo (Wang et al., 2020; Shiferaw; Terefe; Augustin, 2019; Sarkar et al., 2020).

A fermentação também promove alterações em proteínas e peptídeos presentes nos extratos vegetais. Enzimas proteolíticas produzidas pelos probióticos degradam proteínas em peptídeos bioativos e aminoácidos livres, que desempenham papéis essenciais na saúde da pele. Esses peptídeos possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de estimular a síntese de colágeno, promovendo a regeneração celular e contribuindo para a firmeza e elasticidade da pele. Tais propriedades são especialmente úteis em formulações antienvelhecimento e produtos voltados para a

reparação da barreira cutânea (Luo et al., 2024; Farid et al., 2024; Herman; Herman, 2023; Khayatan et al., 2024)

Os probióticos produzem compostos antimicrobianos durante a fermentação, como bacteriocinas e ácidos orgânicos. Esses compostos ajudam a equilibrar o microbioma cutâneo, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*, que estão frequentemente associados a condições dermatológicas como acne e dermatites. A manutenção de um microbioma saudável é crucial para a saúde da pele, pois ele desempenha um papel protetor contra infecções e inflamações (De Paula, 2010)

Outra transformação bioquímica relevante é a modificação dos lipídios presentes nos extratos vegetais. Durante a fermentação, os lipídios são metabolizados em ácidos graxos livres, como o ácido linoleico, que melhora a função da barreira cutânea e possui propriedades anti-inflamatórias. Esses ácidos graxos também contribuem para a hidratação da pele, tornando os produtos fermentados ideais para peles secas ou danificadas. Ademais, os probióticos sintetizam vitaminas durante a fermentação, especialmente vitaminas do complexo B (como B2 e B6) e vitamina K, que possuem propriedades regeneradoras e antioxidantes, promovendo hidratação e fortalecimento da barreira cutânea (Neklyudov; Ivankin, 2002; Vokbeck et al., 1963; Chan, 2013; Khayatan et al., 2024)

Do ponto de vista físico-químico, a fermentação reduz o pH do produto final para valores em torno de 4,0 a 5,0, faixa ideal para a saúde cutânea. Essa acidificação aumenta a estabilidade do produto e reduz a necessidade de conservantes artificiais. Além disso, a viscosidade do produto pode ser aumentada devido à produção de exopolissacarídeos, melhorando a aplicação tópica e a sensação na pele (Pérez-Rivero; López-Gómez, 2023; Kunfan, 2014; Weber; Siebert, 2003).

Essas mudanças bioquímicas tornam os extratos vegetais fermentados uma solução inovadora e sustentável para a indústria cosmética. Os produtos resultantes apresentam propriedades antioxidantes aprimoradas, ação anti-inflamatória, capacidade hidratante e benefícios para o microbioma cutâneo. Além disso, a fermentação é uma abordagem que atende à crescente demanda por cosméticos naturais, seguros e eficazes.

O uso de probióticos em cosméticos está se expandindo devido aos seus benefícios comprovados, incluindo efeito antienvelhecimento, harmonização do tom da pele e fotoprotetores, que são cada vez mais valorizados no mercado (Dou et al., 2023). A fermentação probiótica não apenas aumenta a bioatividade dos extratos vegetais, mas

também reduz as toxicidades potenciais, como visto na fermentação de medicamentos fitoterápicos chineses, que aumenta os ingredientes ativos e introduz novos efeitos farmacológicos (William; Abdullayeva; Obidjon 2023; Zhang et al., 2023). Além disso, a combinação de probióticos com outras substâncias naturais, como a alginita, tem mostrado resultados promissores na melhoria da hidratação da pele e da atividade antioxidante, ampliando ainda mais o escopo de aplicações de probióticos em cosméticos (Toth; Németh, 2022).

Existe uma tendência no mercado global de produtos fermentados, tanto para indústria alimentícia quanto para uso em cosméticos. Com a demanda aumentando existe uma necessidade e maiores interesses em estudos com microrganismos probióticos (Yadav et al., 2024) e seus colaboradores comprovaram o aumento da atividade antioxidante e inibição da tirosinase no extrato fermentado de *Asparagus cochinchinensis*. Em extratos de *Triticum aestivum*, *Avena sativa* L., *Helianthus tuberosus* L., *Glycine max*, *Smallanthus sonchifolius* fermentados com *Lactobacillus buchneri* a diminuição da atividade da elastase foi observada, com aumento da expressão do colágeno tipo I e redução da atividade da collagenase (Kang et al., 2020). Além disso, extrato fermentado de *Zanthoxylum schinifolium* por *L. rhamnosus* expressou atividade inibitória da tirosinase e redução da produção de melanina (58,3%) (Chan et al., 2014).

Estudo com a utilização de extrato de soja fermentado por *Bifidobacterium animalis* mostrou aumento de açúcares, peptídeos, aminoácidos e alto teor de isoflavonas na forma livre, quando comparado ao extrato não fermentado, propiciando benefícios às formulações cosméticas, tais como ação antienvelhecimento, hidratação, efeito tensor e emoliência (Vieira et al., 2009).

O extrato de *Astragalus membranaceus* var. fermentado por *Bacillus subtilis* foi testado em celular da epiderme humana e os resultados demonstraram um efeito estimulante no crescimento sobre queratinócitos e fibroblastos, além de potencializar a produção de ácido hialurônico um dos principais componentes da matriz extracelular na pele (Hsu; Chiang, B, 2009)

O uso ginseng preto fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* relatou atividade anti-rugas em culturas humanas fibroblastos e extrato fermentado de *Codonopsis lanceolata* com *Lacticaseibacillus* mediado por *Rhamnosus* apresentou inibição da atividade da tirosinase e α -glicosidase demonstrando ser promissor para ser

utilizados em formulações cosméticas com atividade clareadora para pele (Kim et al., 2010).

A fermentação de *Camellia sinensis* var. *assamica* com probióticos, por exemplo, mostrou aumentar sua capacidade antioxidante, além de inibir enzimas relacionadas ao envelhecimento e à pigmentação da pele, como a colagenase e a tirosinase (Makhamrueang et al., 2023). Já o extrato de *Hordeum vulgare* L., fermentado com *Lactobacillus*, demonstrou ser ainda mais eficaz na hidratação da pele e na proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo (Kim et al., 2020). Além disso, esses extratos fermentados ajudam a equilibrar o microbioma da pele, o que é fundamental para manter sua saúde e prevenir problemas cutâneos (Dou et al., 2023).

A fermentação do extrato de *Hordeum vulgare* L. demonstrou melhorias significativas nos efeitos antioxidantes e hidratantes, destacando o potencial dos extratos vegetais fermentados no desenvolvimento de materiais cosméticos naturais (Kim et al., 2020). Apesar desses avanços, os desafios permanecem na otimização dos processos de fermentação e na garantia da viabilidade e eficácia dos probióticos em formulações cosméticas (Sharma et al., 2021). No entanto, a integração de probióticos em cosméticos continua a crescer, impulsionada pela demanda do consumidor por soluções naturais e eficazes para o cuidado da pele (Arora et al., 2023).

O desenvolvimento de estudos adicionais sobre as condições ideais de fermentação, seleção de cepas probióticas e compatibilidade com diferentes extratos vegetais permitirá expandir ainda mais o potencial dessa tecnologia na formulação de produtos cosméticos funcionais.

2.7 SOLVENTES SUPRAMOLECULARES

Os solventes supramoleculares, conhecidos como SUPRAS, são líquidos peculiares que são imiscíveis em água. Formados por uma rede tridimensional de pequenas estruturas chamadas anfifílicas, que se mantêm presas por interações químicas sutis e não permanentes como interações não covalentes, ligações de hidrogênio, empilhamento π - π e interações hospedeiro-hóspede (Huang; Anslyn, 2015). Este campo teve avanços significativos desde seu reconhecimento com o Prêmio Nobel de Química em 1987, concedido a pioneiros por seu trabalho em moléculas com interações específicas de estrutura (Ariga et al., 2012; Huang; Anslyn, 2015).

Os SUPRAS são constituídos por agregados que podem incluir micelas e vesículas, variando em tamanho de 30 a 500 nm. Esses agregados são formados pela interação entre as cadeias hidrocarbônicas dos anfifílicos e as forças de repulsão entre os grupos polares, que se equilibram durante o processo de automontagem (Ballesteros

-Gómez; Pérez-Bendito, 2009). A habilidade de ligação múltipla, proporcionada pelos diversos grupos polares presentes em um conjunto supramolecular, torna-o uma base ideal para potencializar a interação com o soluto. Além disso, a baixa volatilidade e a característica não inflamável dos agregados supramoleculares viabilizam a aplicação de processos mais seguros (Ballesteros-Gómez; Sicilia; Rubio, 2010).

Para criar esses solventes, mistura-se compostos anfifílicos em soluções aquosas ou orgânicas em concentrações específicas, acima de um certo limite chamado de concentração crítica de agregação (CCA). A partir daí, esses compostos começam a se organizar sozinhos, formando estruturas como micelas ou vesículas (Candra et al., 2022). Pode-se utilizar várias técnicas para formação dos SUPRAS, como mudança na composição da mistura inicial ou alterando fatores como temperatura, pH ou força iônica. (Caballo et al., 2016).

A formação de SUPRAS a partir de uma solução uniforme contendo moléculas anfifílicas ocorre por meio de dois estágios sequenciais de auto-organização, que acontecem, respectivamente, nos níveis molecular e nanométrico (Fig. 3). Inicialmente, os anfifílicos formam estruturas tridimensionais, como micelas ou vesículas aquosas/reversas, quando atingem uma concentração crítica de agregação. Em seguida, essas nanoestruturas se reorganizam em aglomerados maiores, que se separam da solução coloidal principal como uma nova fase líquida (o solvente supramolecular), por meio de um processo conhecido como coacervação (Ballesteros-Gómez, Sicilia, Rubio, 2010).

Os SUPRAS são ricos em anfifílicos e não se misturam com o solvente (frequentemente água) do qual se originaram, mesmo que esse solvente seja um componente predominante dos SUPRAS, constituindo a fase contínua na qual os aglomerados supramoleculares se dispersam (Menger; Sykes, 1998). A solução em equilíbrio com os SUPRAS mantém monômeros anfifílicos na concentração crítica de agregação. A seguir, são discutidos de forma breve os fundamentos dos fenômenos associados à formação de SUPRAS (especificamente, auto-organização e separação de fase líquido-líquido).

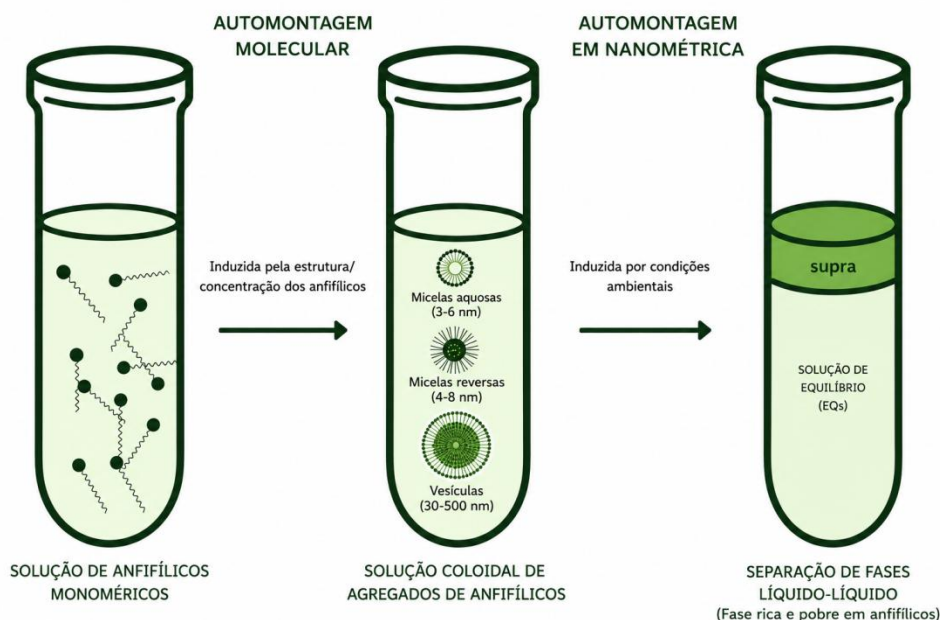


Figura 3: Síntese Supra

Legenda: Esquema representando as etapas de automontagem de anfílicos. À esquerda, solução de anfílicos monoméricos, com automontagem molecular causada pela estrutura/concentração dos anfílicos, formando agregados como micelas aquosas (3–6 nm), micelas reversas (4–8 nm) e vesículas (30–500 nm) na solução coloidal entrevista (centro). À direita, automontagem em nanométrica sob condições ambientais, resultando em separação de fases líquido-líquido, formando uma fase rica em anfílicos ("supra") e uma solução de equilíbrio (EQs).

Fonte: Autora, 2025.

O solvente de equilíbrio (EQS) se refere ao estado de equilíbrio em um sistema de solventes em que a distribuição de solutos entre as fases é estável e previsível. Esse conceito é crucial em várias aplicações, incluindo a separação de compostos e o estudo da solubilidade e do comportamento das fases. Além disso, o papel do solvente no controle do equilíbrio químico é significativo, pois pode influenciar os rendimentos da reação por meio de componentes de solvatação universais e específicos, que são considerações essenciais em físico-química (Prezhdo et al., 2007).

A associação do SUPRAS com outras tecnologias verdes, como solventes eutéticos profundos naturais (NADES) e extração assistida por ultrassom, aumenta a extração de compostos fenólicos, como visto na extração de *Lavandula pedunculata*, onde melhorias significativas na atividade antioxidante e nas capacidades inibitórias de enzimas foram observadas (Mansinhos et al., 2021). Além disso, esses sistemas naturais à base de solventes eutéticos profundos (NADES-SUPRAS) permitem a extração de fitoquímicos com variadas polaridades, conforme ratificado na extração de compostos das folhas de *Zanthoxylum bungeanum* (Götz, 2023). Esses sistemas aproveitam a formação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas para alcançar altas taxas

de extração, superando significativamente as dos solventes tradicionais, como água e etanol. O uso inovador do SUPRAS não apenas se alinha aos princípios da química verde, mas também oferece uma abordagem personalizável para extrair uma ampla gama de compostos bioativos de materiais vegetais, tornando-os altamente relevantes para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (Caballo et al., 2016).

Além disso, o SUPRAS tem sido usado com eficiência em aplicações de grande escala, como a extração de fenólicos, onde superam os métodos convencionais em rendimento e eficiência (Cai et al., 2023). Por exemplo, um estudo sobre *Prunella vulgaris* mostrou que o SUPRAS, preparado com micelas reversas de ácido octanóico em uma mistura de etanol e água, superou os solventes orgânicos convencionais em eficiência de extração e capacidade antioxidante (Xia et al., 2024)

Desta maneira, a aplicação do SUPRAS na extração de compostos fenólicos simbolizam um progresso significativo na química sustentável, apresentando uma alternativa verde, eficiente e escalável aos métodos tradicionais de extração (Cai et al., 2023; Heidari et al., 2020). Outro ponto importante é que os SUPRAS são considerados uma alternativa ecológica, particularmente conhecidos por seu baixo impacto ambiental devido à sua capacidade de serem sintetizados a partir de fontes naturais, verdes e econômicas, e sua baixa inflamabilidade e pressão de vapor (Candra et al., 2022). Isso os torna adequados para aplicações que requerem processamento sustentável, como na indústria de alimentos, onde SUPRAS à base de ciclodextrina têm sido usados para aumentar a eficiência de extração e a estabilidade de compostos bioativos (Zhou et al., 2024).

REFERÊNCIAS

- ABRIL-IBARRA, Z. **Antioxidantes producidos por microorganismos acuáticos y terrestres con uso potencial en cosméticos**. 2021. DOI: 10.17533/UDEA.ACBI.V44N116A02.
- AGUILERA, J; GRACIA-CAZÑA, T; GILABERTE, YOLANDA. **New developments in sunscreens**. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2023. doi: 10.1007/s43630-023-00453-x.
- AKILA, N. **Fermentation technology**. 2024. p. 72–79. DOI: <https://doi.org/10.58532/v3bgbt2p1ch7>.
- ALI, et al. **In vitro antibacterial and cytotoxic activities of various fractions of *Lippia alba* (Mill.)**. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 2023. DOI: 10.3329/bpj.v26i2.67804.
- ALMEIDA, M.Z. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, p. 221. 2011.
- AL-SADEK, T; YUSUF, N. **Ultraviolet Radiation Biological and Medical Implications**. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024. doi: 10.3390/cimb46030126.
- ÁLVAREZ-RIVERA, G; LLOMPART, M; LORES, M; GARCÍA-JARES, C. **Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods**. In: ALONSO, José L.; TURLI, Sílvia B. (Eds.). *Comprehensive Analytical Chemistry*. 7. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 109-132. doi: 10.1016/B978-0-444-63508-2.00009-6.
- ALVES, M. A.S.G.; QUEIROZ, T. M; MEDEIROS, I. A. **Fisiologia peniana e disfunção erétil: uma revisão de literatura**. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 16, n. 3, p. 439-444, 2012.
- ANDRADE, B.; et al. **Photoprotective activity of medicinal plants from the caatinga used as anti-inflammatories**. *Pharmacognosy Magazine*, v. 15, n. 61, p. 356, 2019. https://doi.org/10.4103/PM.PM_482_18.
- ANGELINI, P. **Plant-Derived Antimicrobials and Their Crucial Role in Combating Antimicrobial Resistance**. *Antibiotics*, 2024. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080746>
- ARORA, R. et al. **Evolving advances in the cosmetic use of probiotics and postbiotics: Health, regulatory and marketing aspects**. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2023. DOI: 10.2174/1389201024666230703115732.
- ARIGA, K; ITO, H; HILL, J.; TSUKUBE, H. **Molecular recognition: from solution science to nano/materials technology**. *Chemical Society Reviews*, 2012. DOI: 10.1039/C2CS35162E.
- ARRUDA, R. et al. **Natural Photoprotectors: A Literature Review**. *Research, Society and Development*, 2021. doi: 10.33448/RSD-V10I5.14603.

AZEVEDO, F. et al. ***Lippia thymoides* essential oils activity against *Candida* species from HIV+ individual oral lesions.** *Scientific Reports*, 2024. DOI: 10.21203/rs.3.rs-4263276/v1.

BALLESTEROS-GÓMEZ, A; SICILIA, M.D; RUBIO, S. **Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds: A review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 677, n. 2, p. 108-130, 2010. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.07.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010009359>.

BANKMAN-FRIED, S. **Taxonomy—An irreplaceable tool for validation of herbal medicine revisited.** 2021. In: [Book Title]. Elsevier, doi: 10.1016/b978-0-323-85542-6.00026-3.

BARREIROS, A.L.B.S.; et al. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.

BELEW, A. A. **Total phenol contents, total flavonoid contents, antioxidant activities of Methanol extracts of *Amomum Subulatum*, *Lippia adoensis*, *Coriandrum sativum*, and *Ruta chalepensis* sold from Jigjiga market, Ethiopia.** 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3149132/v1>. Acesso em: 30 mar. 2025.

BERNERD, F; PASSERON, T; CASTIEL, I; MARIONNET, C. **The damaging effects of long UVA (UVA1) rays: A major challenge to preserve skin health and integrity.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. doi: 10.3390/ijms23158243.

BIAGINI, A.; et al. **Accelerated Stability Testing in Food Supplements Underestimates Shelf Life Prediction of Resveratrol with Super-Arrhenius Behavior.** *Symmetry*, 2024. doi.org/10.3390/sym16040493.

BINTSIS, T. **Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics.** *Microbiology*, 2018. DOI: 10.3934/MICROBIOL.2018.4.665.

BOLOURI, P. et al. **Aplicações de óleos essenciais e extratos vegetais em diferentes indústrias.** *Molecules*, 2022. DOI: 10.3390/molecules27248999.

BORKAR, S. **Green Marketing- A Way Towards Sustainable Development.** *International Journal for Multidisciplinary Research*, 2023. DOI: 10.36948/ijfmr.2023.v05i05.8251.

BORSOI, F.T.; POSSAS, A.; PASTORE, G.M.; ARRUDA, H.S. **Essential oils from native Brazilian plants of the genus *Eugenia* as an innovative and sustainable source of active ingredients for food systems and human health and well-being.** *Horticulturae*, 2024. DOI: 10.3390/horticulturae10070768.

BRASIL, **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. *Ministério da Saúde*, 2015.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Séries Temáticas: Cosméticos Série Qualidade em Cosméticos.** ANVISA. Brasília: v. 1. 1. ed. 2004. 52 p.

BRASIL. **Conselho Nacional da Reserva Biosfera da Caatinga. Saiba quais são as características da Caatinga.** Fundação Joaquim Nabuco, 2019. Disponível em: <<https://www.fundaj.gov.br/index.php/conselho-nacional-da-reserva-da-biosfera-da-caatinga/9193-saiba-quais-sao-as-caracteristicas-da-caatinga#:~:text=%E2%80%9CAs%20principais%20caracter%C3%ADsticas%20da%20caatinga,v%C3%A1rias%20esp%C3%A9cies%20end%C3%A9micas%20em%20extin%C3%A7%C3%A3o>> Acesso em: 03 mai. 2021.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente.** Biodiversidade Brasileira. *Ministério do Meio Ambiente*, 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 14 set. 2018.

BRASIL. **Resolução – RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012.** Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 4 jun. 2012.

BUCKLEY, H. et al. **Design and testing of safer, more effective preservatives for consumer products.** *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017. DOI: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.7B00374.

BULI, G. A.; DUGA, A. G.; DESSALEGN, E. **Antimicrobial Activity of Lippia adoensis var. koseret Against Human Pathogenic Bacteria and Fungi.** *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 3, n. 3, p. 118, 2015. DOI: 10.11648/J.AJCEM.20150303.18.

CABALLO, C.; SICILIA, M. D; RUBIO, S. **Supramolecular solvents for green chemistry.** 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-805297-6.00005-X.

CÁCERES, M.; HIDALGO, W.; STASHENKO, E. E.; TORRES, R.; ORTIZ, C. **Metabolomic analysis of the effect of Lippia organoides essential oil on the inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*.** *Antibiotics*, v. 12, n. 5, p. 814, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050814>. Acesso em: 29 mar. 2025.

CAI, Z. et al. **Novel natural deep eutectic solvent-based supramolecular solvents designed for extracting phytochemicals from pigeon pea leaves and its scale-up and recovery process.** *Industrial Crops and Products*, 2023. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117240.

CANDRA, F. et al. **Phenolic compounds: Extraction, optimization, identification and applications in food industry**, 2022.

CANTON, M. et al. **Dereplication of natural extracts diluted in propylene glycol, 1,3-propanediol, and glycerin: comparison of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) extracts as a case study.** *Cosmetics*, v. 8, n. 1, 2021. DOI: 10.3390/COSMETICS8010010.

- CARDOSO, P. et al.. **An update of the Verbenaceae genera and species numbers.** *Plant Ecology and Evolution*, 2021. DOI: 10.5091/plecevo.2021.1821.
- CARVALHO, T. et al. **Chemical composition, antimicrobial and antifungal activity of *Lippia thymoides* essential oil in oral pathogens.** *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 2021. DOI: 10.20396/BJOS.V20I00.8660219.
- CASTRO, T. L. A. de; PINTO, G. A. do C.; CARDOSO, C. A. L. **A Systematic Review of the Photoprotective Potential of Native Edible Plants from Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, p. 182–189, 2022. <https://doi.org/10.17807/orbital.v14i3.17430>.
- CASTRO, T. L. A. de; ROSA, J. S. da; SANTOS, M. do S. M.; CARDOSO, C. A. L. **Potenciais fotoprotetor e antioxidante de blends de chás.** *Ensaaios e Ciência, Campo Grande*, v. 27, n. 2, p. 237-242, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2023v27n2p237-242>. Acesso em: 21 maio 2024.
- CATELAN, S. T. B. et al. **Evaluation of the *in vitro* photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 197, p. 111500, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2019.04.009>.
- CEDILLO-OLIVOS, A. E. et al. **Natural preservatives used in foods: a review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024. DOI: 10.1080/10408398.2024.2403000.
- CHAN, J.A.E. **A anti-inflammatory or skin moisturizing composition containing fermented plant extracts as an active ingredient.** 2013.
- CHAN, C.-F. et al. **Fermented Broth in Tyrosinase- and Melanogenesis Inhibition.** *Molecules*, v. 19, n. 9, p. 13122-13135, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules190913122>. Acesso em: 30 maio 2025.
- CHATAING, B. et al. **Chemical composition and bioactivity on bacteria and fungi of the essential oil from *Lippia organoides* H.B.K.** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 15, n. 3, p. 454-460, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644072>. Acesso em: 29 mar. 2025.
- CHERUBIM, D.J.L. et al. **Review Article: Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications.** *J Cosmet Dermatol*. n. 19(1). p. 33-37, 2019.
- CHOI, H. Y. et al.. **Revolucionando ingredientes cosméticos: aproveitando o poder de antioxidantes, probióticos, extratos vegetais e peptídeos em produtos de cuidados pessoais e da pele.** *Cosméticos*, 2024. DOI: 10.3390/cosmetics11050157.
- COELHO S. et al. **Fitocosméticos: benefícios de cosméticos de origem natural na estética.** *Revista FT*, 2024. doi:10.69849/revistaft/ni10202410312124.
- COSTA, P. S. et al. **Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae).** 44, v. 2, p. 158–171, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>. Acesso em: 29 mar. 2025.

COWAN, M. M. **Plant products as antimicrobial agents.** *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1999, vol. 12, no. 4, p. 564-582. DOI: 10.1128/CMR.12.4.564. PMID: 10515903; PMCID: PMC88925.

CRUZ, S. et al. **In Silico Evaluation of the Antimicrobial Activity of Thymol—Major Compounds in the Essential Oil of *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae).** *Molecules*, 2022. DOI: 10.3390/molecules27154768.

DE PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas.** 2010. p. 72-f.

DESSALEGN, E. **Effect of Extraction Solvents on Total Phenolic Contents and in vitro Antioxidant Activity of the Leaves of *Lippia adoensis* var. Koseret Sebsebe.** *Food Science and Quality Management*, v. 94, p. 29–37, 2020. Disponível em: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/FSQM/article/view/51410/53130>. Acesso em: 30 mar. 2025.

DIETZ, B. B. **Networked names: synonyms in eighteenth-century botany.** *History and Philosophy of The Life Sciences*, 2019. DOI: 10.1007/S40656-019-0286-6.

DINIZ, M. B. et al. **Região amazônica: biodiversidade e possibilidades de transformação industrial.** v. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18542/CEPEC.V6I1-6.7037>. Acesso em: 20 maio 2025.

DONG, H. et al. **Activity and safety evaluation of natural preservatives.** *Food Research International*, 2024. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114548.

DOU, J. et al. **Applications of probiotic constituents in cosmetics.** *Molecules*, 2023. DOI: 10.3390/molecules28196765.

ELLWANGER, J. H; NOBRE, C. A; CHIES, J. A. **Brazilian Biodiversity as a Source of Power and Sustainable Development: A Neglected Opportunity.** *Sustainability*, v. 15, n. 1, p. 482, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su15010482>. Acesso em: 21 maio 2025.

EZZAKY, Y. et al. **In vitro antimicrobial activity of extracts and essential oils of *Cinnamomum*, *Salvia*, and *Mentha* spp. against foodborne pathogens: A meta-analysis study.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13232>.

FARID, M.S. et al. **Recent trends in fermented plant-based analogues and products, bioactive peptides, and novel technologies-assisted fermentation.** 2024. doi: 10.1016/j.tifs.2024.104529.

FILHO, L. G. A. . et al. **Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*.** *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, v. 95, n. 1, p. e20220359, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220359>. Acesso em: 30 mar. 2025.

FRANCO, C. da S. et al. **Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer.** *African Journal of Biotechnology*, v.

13, n. 30, p. 3107-3113, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJB2012.2941>. Acesso em: 29 mar. 2025.

GÄNZLE, M.G. **Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage.** *Current Opinion in Food Science*, 2015. doi: 10.1016/J.COFS.2015.03.001.

GARCÍA-BORES, A. M. et al. ***Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 167:72-81. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.12.014.

GARG, S. **Synthetic Antioxidants.** p. 150–154, 2024. doi.org/10.58532/nbennurdsch15

GOMES, T.B.; BANDEIRA, F.P.S.F. **Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia.** *Acta Botanica Brasilica*, v.26, n. 4, p. 796-809, 2012.

GONZALEZ, A; COSTA, M; SIGNOR, A. **Desenvolvimento sustentável: perspectivas e desafios para a sociedade moderna.** *International Journal of Environmental Resilience Research and Science*, v. 2, n. 2, dez. 2020. DOI: 10.48075/ijerrs.v2i2.26260.

GOSWAMI, N. **Sustainability: the green cosmetic brands for eco-friendly transformation.** *Research Review International Journal of Multidisciplinary*, v. 9, n. 3, 2024. DOI: 10.31305/rrijm.2024.v09.n03.025.

GÖTZ, C. **A green and designable natural deep eutectic solvent-based supramolecular solvents system: Efficient extraction and enrichment for phytochemicals.** *Chemical Engineering Journal*, 2023. DOI: 10.1016/j.cej.2023.141333.

GRUNEBAUM, L.D. et al. **Effects of lavender olfactory input on cosmetic procedures.** *J Cosmet Dermatol*. 2011 Jun;10(2):89-93. doi: 10.1111/j.1473-2165.2011.00554.x. PMID: 21649812.

GUIJA-GUERRA, H; GUIJA-POMA, E. **Radicales libres y sistema antioxidante.** *Horizonte Médico (Lima)*, Lima, v. 23, n. 2, abr./jun. 2023. Epub 30 maio 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2023.v23n2.12>. Acesso em: 29 mar. 2025.

GUPTA, S. P. **Free Radicals.** 2024. p. 112–131. Disponível em: <https://doi.org/10.58532/nbennurdsch11>. Acesso em: 29 mar. 2025.

HALLA, N. et al. **Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies.** *Molecules*, 2018. doi: 10.3390/MOLECULES23071571.

HARTOG, B. J.; LIEM, D. H. **Preservation of cosmetics and contact lens solutions.** *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 174–176, 1981. DOI: 10.1007/BF02342203.

HEIDARI, SETAREH; S, E.; WOOD, D.A. **Large-scale molecular solvents for environmentally sustainable applications.** In: *Molecular Solvents for Environmentally Sustainable Applications*. 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-821884-6.00001-2.

HENAO, J.; MUÑOZ, L.; PADILLA, L.; RÍOS, E. **Extracción y caracterización del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. "Orégano de Monte" cultivado en el Quindío y evaluación de la actividad antimicrobiana.** *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, v. 21, n. 1, p. 82–86, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.33975/RIUQ.VOL21N1.684>. Acesso em: 29 mar. 2025.

HERMAN, A; HERMAN, A. P. **Biological activity of fermented plant extracts for potential dermal applications.** *Pharmaceutics*, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15122775.

HOANG, H. T.; MOON, J.-Y.; LEE, Y.-C. **Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: recent applications, challenges and perspectives.** *Cosmetics*, v. 8, n. 4, p. 106, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/COSMETICS8040106>. Acesso em: 21 maio 2024.

HSU, M.; CHIANG, B. **Stimulating effects of *Bacillus subtilis* natto fermented *Radix astragali* on hyaluronic acid production in human skin cells.** *J Ethnopharmacol*, p.474-81,2009.

HTET, A. N. et al. **Surface activity of octanoic acid in ethanol-water solutions from molecular simulation and experiment.** *Journal of Chemical Physics*, v. 142, n. 8, p. 084702, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4908539>. Acesso em: 18 ago. 2025.

HUANG, F; ANSLYN, E. V. **Introduction: supramolecular chemistry.** *Chemical Reviews*, 2015. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00352.

ISLAM, M. et al. ***In-vitro* Antimicrobial Activity of Essential Oils and Different Organic Extracts of *Lippia alba*.** 2, v. 1, p. 1–5, 2018.

JEITER, J; SMETS, E. **Comparative morphology at a crossroads.** *American Journal of Botany*, 2024. DOI: 10.1002/ajb2.16392.

JOMOVÁ, K.; VALKO, M. **Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease.** *John Wiley & Sons, Inc.*, 2011. p. 17–32. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118148143.CH2>. Acesso em: 29 mar. 2025.

KHAN, A. Q. et al. **Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2018. doi: 10.1002/EM.22176.

KANG, Y.-M. . et al. **Anti-Photoaging Effect of Plant Extract Fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk Fibroblasts and HaCaT Keratinocytes.** *Journal of Functional Biomaterials*, v. 11, n. 1, p. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JFB11010003>.

KHANNA, U.; SINGH, K. **Reef safe sunscreens: A call to action.** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2022. doi: 10.1111/jdv.18763.

- KHAYATAN, K. et al. **Plant-derived fermented products: an interesting concept for human health.** *Current Developments in Nutrition*, 2024. DOI: 10.1016/j.cdnut.2024.102162.
- KIM, S. et al. **Inhibitory effects of fermented *Codonopsis lanceolata* on tyrosinase and α -glucosidase activities.** *World Acad Sci Eng Technol*, p.446, 2010.
- KIM, S. Y. et al. **Antioxidant and moisturizing effects of fermented *Hordeum vulgare* L. extract and heat-killed probiotics by *Lactobacillus* lactic acid bacteria isolated from kimchi.** 2020. doi: 10.7845/KJM.2021.0125.
- KRZESŁOWSKA, W. J. et al. **The Skin's Sun Story: Risks and Precautions.** *Quality in Sport*, 2024, DOI: 10.12775/qs.2024.22.54290
- KUMAR, R; RAJPUT, R. **Role of Natural Preservatives and their Effect on Food's Shelf Life.** *Current Journal of Applied Science and Technology*, 2023. DOI: 10.9734/cjast/2023/v42i474312.
- KUMAR, S. et al. **Exploring bioactive compounds and antioxidant properties of twenty-six.** 2023.
- KUNFAN, FENG. **Biological fermentation bath cream and preparation method thereof.** *Patent*, 2014.
- LAMBERT-MOREIRA, L. G. et al. **Reflections and perspectives on the Caatinga drylands for the development of bioactive plant products as medicine.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 35, p. 78–91, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43450-024-00612-w>.
- LI, W. et al. **Research progress on natural preservatives of meat and meat products: classifications, mechanisms and applications.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024. DOI: 10.1002/jsfa.13495.
- LIANQIONG, Y. **Natural plant preservative combination and application thereof in cosmetics.** *Patente*, 2016.
- LIMA, D. J. et al. **Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications.** *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2019. DOI: 10.1111/jocd.13093.
- LIMA, H. S. et al. **Atividade fotoprotetora de extratos e frações de *Lippia insignis*.** *Seminário Integrado de Iniciação Científica*, 2019. doi: 10.13102/SEMIC.VOI22.4010.
- LIMA-SARAIVA, S. R. G. de. et al. **Chemical analysis and evaluation of antioxidant, antimicrobial, and photoprotective activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae).** *The Scientific World Journal*, v. 2017, p. 1713921, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1713921>.
- LOPES, F. M; CRUZ, REINAN DE O DA; BATISTA, K. A. **Radiação ultravioleta e ativos utilizados nas formulações de protetores solares.** 2012. doi: 10.17921/1415-6938.2012V16N4P%P.

- LUO, X. et al. **Fermentation: improvement of pharmacological effects and applications of botanical drugs.** *Frontiers in Pharmacology*, 2024. DOI: 10.3389/fphar.2024.1430238.
- MAGALHÃES, A.O. **Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae).** 2018.125f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia)- Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2018.
- MAKHAMRUEANG, N. et al. **Beneficial Bio-Extract of *Camellia sinensis* var. *assamica* Fermented with a Combination of Probiotics as a Potential Ingredient for Skin Care.** *Cosmetics*, 2023. DOI: 10.3390/cosmetics10030085.
- MALINOWSKA, M.A; DZIKI, A.D; MATUSIK-TABOR, A.M. **O potencial de extratos vegetais selecionados em formulações de cuidados com a pele antiacne.** *Journal of Applied Cosmetology* , 2022. DOI: 10.56609/jac.v40i2.24.
- MANDI, S; SEN, S. **Natural Ultraviolet Radiation.** In: *Advances in Environmental Science and Technology*. 2015. DOI: 10.1007/978-81-322-2767-0_1.
- MANSINHOS, I. et al. **Ultrasonic-assisted extraction and natural deep eutectic solvents combination: A green strategy to improve the recovery of phenolic compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco.** *Antioxidants*, 2021. doi: 10.3390/ANTIOX10040582.
- MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; SANTOS FILHO, L. **Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado.** 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro : *CNCFlora*, 2014. 320 p.
- MARTINS, F. J. et al. **Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 161, p. 34–39, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.05.012>.
- MAURÍCIO, M. E. et al. **Evaluation of Biotechnological Active Peptides Secreted by *Saccharomyces cerevisiae* with Potential Skin Benefits.** *Antibiotics*, 2024. DOI: 10.3390/antibiotics13090881.
- MEDEIROS, L. L. B. de. et al. **Potencial antibacteriano do hidrolato de *Lippia grata* em cepas planctônicas de *Salmonella entérica*.** *Agropecuária Científica No Semi-Árido*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.30969/wvvhf0q42>. Acesso em: 29 mar. 2025.
- MENEZES, P. M.N. et al. **Spasmolytic and antidiarrheal activities of *Lippia thymoides* (Verbenaceae) essential oil.** *Natural Product Research*, v. 4, p. 1-3, 2018.
- MENGER, F.; SYKES, B. **Anatomy of a coacervate.** *Langmuir*, v. 14, n. 15, p. 4131-4137, 1998. DOI: 10.1021/la980208m. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0032120879&doi=10.1021%2fla980208m&partnerID=40&md5=5e6492f9ece74b85ff458646266d9285>. Acesso em: 9 dez. 2024.

- MILUTINOV, J. et al. **The potential of natural compounds in UV protection products.** *Molecules*, 2024. doi: 10.3390/molecules29225409.
- MIRRA, F. et al. **Taxonomic Revision of *Lippia* in Paraguay.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2024. DOI: 10.3417/2024926.
- MIRZA, F. N. . et al. **Considering sun safety policies in the United States.** *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2023. doi: 10.59249/FMWG8617.
- MISHRA, A. K. **Know your sunscreen.** *International Journal for Multidisciplinary Research*, 2024. doi: 10.36948/ijfmr.2024.v06i04.24611.
- MITRA, P. et al. **An Overview of Endocrine Disrupting Chemical Paraben and Search for An Alternative - A Review.** *Proceedings of the Zoological Society*, v. 74, p. 479-493, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12595-021-00418-x>. Acesso em: 30 maio 2025.
- MONTERO, P. et al. **Damaging effects of UVA, blue light, and infrared radiation: in vitro assessment on a reconstructed full-thickness human skin.** *Frontiers in Medicine*, 2023. doi: 10.3389/fmed.2023.1267409.
- MORAIS, D. V. de. et al. **Antioxidant, photoprotective and inhibitory activity of tyrosinase in extracts of *Dalbergia ecastaphyllum*.** *PLOS ONE*, v. 13, n. 11, 2018. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0207510>.
- MORONI, P; AIS, J; O'LEARY, N. C. **Las Verbenáceas comestibles de América: Una revisión bibliográfica.** *Darwiniana*, 2021. DOI: 10.14522/darwiniana.2022.101.1023.
- MOUSAVI, Z. et al. **Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds.** *Food Biotechnology*, 2013. DOI: 10.1080/08905436.2012.724037.
- MÜLLER, V. **Bacterial fermentation.** *Microbiology*, [s. l.], 19 abr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001415>.
- MURPHY, B. et al. **In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome.** *PLOS ONE*, v. 16, n. 7, 2021. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0254172.
- NAKAGAMI, I. A.; PINTO, L. P. **Beleza Sustentável: Ativos Naturais na Formulação de Cosméticos Orgânicos.** *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento* , 2019. DOI: 10.33448/RSD-V9I2.2064.
- NASCIMENTO, L. D. et al. **Drying Effects on Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lippia thymoides* Essential Oil, a Natural Source of Thymol.** *Molecules*, 2021. DOI: 10.3390/MOLECULES26092621.
- NAZ, A. et al. **A critical review on the active anti-viral metabolites of bioprospecting traditionally used plant species from semi-arid regions of the**

subcontinent. *J Complement Integr Med.* 2024 Oct 10;21(4):412-439. doi: 10.1515/jcim-2024-0186. PMID: 39382949.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N. **Biochemical processing of fats and oils as a means of obtaining lipid products with improved biological and physicochemical properties: A review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002. DOI: 10.1023/A:1019948830882.

NGASSAPA, O. D . et al. **Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng. (Verbenaceae).** *Flavour and Fragrance Journal*, v. 18, n. 3, p. 221–224, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/FFJ.1195>. Acesso em: 29 mar. 2025.

NITTA, J. H. . et al. **An open and continuously updated fern tree of life.** *Frontiers in Plant Science*, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.909768.

NOLASCO-ONTIVEROS, E. et al. Phenolic Compounds with Photo-Chemoprotective Activity. **In: BENTHAM Science Publishers**, 2024. p. 90–114. <https://doi.org/10.2174/9789815223163124090007>.

NUNES, A. R. et al. **Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 189, p. 119–123, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.10.013>.

OEY, I; AGYEI, D. **Learning from tradition: Health-promoting potential of traditional lactic acid fermentation to drive innovation in fermented plant-based dairy alternatives.** *Fermentation*, 2023. doi: 10.3390/fermentation9050452.

PAIVA, P.C.B.; LUCENA, R.F.P. **O uso dos extratos vegetais da Caatinga e da Amazônia para produção de fitocosméticos.** *Rev. Bras. Gest. Amb. Sustent.* [online]. v. 7, n. 15, p. 171-191, 2020.

PAIXÃO, T. P. et al. **Plants from Brazil with Potential Photoprotective Activity: A Review.** *Pharmacognosy Reviews*, p. 204–213, 2023. <https://doi.org/10.5530/097627870191>.

PEIXOTO, M. G. et al. **Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi.** *Bioscience Journal*, v. 34, n. 5, p. 1136–1146, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/BJ-V34N5A2018-39385>. Acesso em: 29 mar. 2025.

PÉREZ-RIVERO, C; LÓPEZ-GÓMEZ, J. P. **Unlocking the potential of fermentation in cosmetics: A review.** *Fermentation*, 2023. DOI: 10.3390/fermentation9050463.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. **UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer.** *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2011. doi: 10.1039/C1PP05144J.

PICKERING, J. **Discover Life's Global Mapper: *Lippia thymoides*.** Disponível em: http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map.

PINTO, C. da P. et al.. **Antimicrobial Activity of Lippia Species from the Brazilian Semi-arid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 614501. DOI: 10.1155/2013/614501.

PINTO, L; AYALA-ZAVALA, J. F. **Application of Plant Antimicrobials in the Food Sector: Where Do We Stand?** *Foods*, 2024. DOI: 10.3390/foods13142222.

POLONINI, H. C. et al. **A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter.** *RSC Advances*, v. 4, n. 107, p. 62566–62575, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA11577E>.

POLONINI, H. C. et al. **A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter.** *RSC Advances*, 4(107):62566-62575, 2014. doi: 10.1039/C4RA11577E.

PREZHDO, O. V. et al. **Control of chemical equilibrium by solvent: A basis for teaching physical chemistry of solutions.** *Journal of Chemical Education*, 2007. doi: 10.1021/ED084P1348.

RATHOD, R.; TEMBHARE, K.; HIRE, V. **Fermentation as biotechnological tool and its role in human civilization.** 2024. p. 109–128. DOI: <https://doi.org/10.58532/v3bjbt12p7ch1>.

RAYMOND-LEZMAN, J. R.; RISKIN, S. **Attitudes, behaviors, and risks of sun protection to prevent skin cancer amongst children, adolescents, and adults.** *Cureus*, 2023. doi: 10.7759/cureus.34934.

REIS, G. et al. **Evaluation of the Photoprotective Potential and Antioxidant Activity of Plant Extracts from Restinga de Jurubatiba (Brazil).** *Drug Analytical Research*, v. 8, n. 1, p. 54–61, 2024. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.140415>.

RESHI, M.; BHAT, A.; KAUR, P. **The role of antioxidants in human health.** 2013.

ROSIC, N; CLIMSTEIN, M; BOYLE, G. M.; FENG, Y. **Exploring Mycosporine-like Amino Acid UV-Absorbing Natural Products for a New Generation of Environmentally Friendly Sunscreens.** *Marine Drugs*, v. 21, n. 4, p. 253, 2023. doi: 10.3390/md21040253.

RUIZ, N. Q. et al. **Antigenotoxic effect against ultraviolet radiation-induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 93, n. 4, p. 1063–1072, 2017. <https://doi.org/10.1111/PHP.12735>.

RUKSAAR, S. **Introduction to Free Radicals.** p. 93–111, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.58532/nbennurdsch10>. Acesso em: 29 mar. 2025.

SAEWAN, N.; JIMTAISON, A. **Photoprotection of natural flavonoids.** *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 5, n. 3, p. 129-141, 2015.

SALGUEIRO, L. et al. **Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala.** *Planta Medica*, v. 69, n. 1, p. 80–

83, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/S-2003-37032>. Acesso em: 29 mar. 2025.

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. 2020. *Lippia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15170>>. Acesso em: 09 mai. 2021.

SALIMENA, F.R.G., CARDOSO, P.H. 2025. *Lippia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB21457>.

SALIMENA, F.R.G., MULGURA, M. 2020. *Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB21457>

SALMERI, CRISTINA. **Plant morphology: outdated or advanced discipline in modern plant sciences?**. 2018.

SAMFIRA, I.; BUTNARIU, M. **Free radicals and oxidative stress**. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, v. 4, n. 3, p. 1–3, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/JBB.10000E13>. Acesso em: 29 mar. 2025.

SANTOS, B. N. et al. **Chemical Profile of the Essential Oil of *Lippia origanoides* Kunth and Antibiotic Resistance-modifying Activity by Gaseous Contact Method**. *Journal of Herbal Medicine*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100703>. Acesso em: 29 mar. 2025.

SANTOS-NEVES, P. S. et al. **Biocultural heritage of the Caatinga: a systematic review of Myrtaceae and its multiple uses**. *Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society*, 2024. doi.org/10.1111/brv.13092.

SANTOS-NEVES, P.S. et al. **Biocultural heritage of the Caatinga: a systematic review of Myrtaceae and its multiple uses**. *Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society*, 2024. DOI: 10.1111/brv.13092.

SARKAR, D; ANKOLEKAR, C; SHETTY, K. **Beneficial lactic acid bacteria (LAB)-based biotransformation of plant and dairy substrates to enhance type 2 diabetes-relevant health benefits**. *CRC Press*, 2020. DOI: 10.1201/9781003003793-20.

SARKIC, A; STAPPEN, I. **Essential oils and their single compounds in cosmetics—A critical review**. *Cosmetics*, Basel, v. 5, n. 1, p. 11, 2018. DOI: 10.3390/cosmetics5010011. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/11>. Acesso em: 20 maio 2025.

SCHNEIDER, E. L.A. et al. **Controle Microbiológico de Cosméticos e Instrumentos Empregados no Processo de Maquiagem**. *Revista Brasileira de Revisão de Saúde*, 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n2-191.

SENTHILKUMAR, K.; VIJAYALAKSHMI, A. **Review: Advances in Self-Preservation Techniques in Cosmetics Using Hurdle Technology**. *South Eastern*

European Journal of Public Health, p. 1061–1072, 2024.
doi.org/10.70135/seejph.vi.2278.

SHARMA, G. et al. **Mechanistic Role of Probiotics in Improving Skin Health**. In: *Probiotics in Health and Disease*, 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-5628-6_2.

SHARMA, R.N. **The role of green marketing in promoting environmentally friendly products**. *Indian Scientific Journal of Research in Engineering and Management*, 2024. DOI: 10.55041/ijsrem32238.

SHARMEEN, J.B., et al. **Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals**. *Molecules*. 2021 Jan 27;26(3):666. doi: 10.3390/molecules26030666. PMID: 33514008; PMCID: PMC7865210.

SHIFERAW, N; TEREFE, M. A; AUGUSTIN, T. **Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1666250.

SILLER-SÁNCHEZ, A. et al.. **Solid-state fermentation-assisted extraction of flavonoids from grape pomace using co-cultures**. *Processes*, v. 12, n. 9, 2024. DOI: 10.3390/pr12092027.

SILVA, F. S. **Estudos fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides***. 2012. 142f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2012.

SILVA, F. S. et al. **Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides***. *Pharmaceutical Biology*, p. 4-6, 2015b.

SILVA, F. S. et al. **Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides***. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015b, p. 463248. DOI: 10.1155/2015/463248.

SILVA, F. S. et al. **Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides***. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 1, p. 25–34, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1005751.

SILVA, F.S. et al. **Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides***. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-10, 2015a.

SINGH, P. et al. ANKAJ; SHUKLA, SHIKHA; GUPTA, ANKIT; SINGH, RAM LAKHAN. **Estimation of phytochemical constituents and analysis of antioxidant activity in different parts of plant**. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*, 2023. doi: 10.18231/j.ijpca.2023.032.

SINGULANI, J. de L. et al. **Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species**. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 6, n. 27, p. 4416–4422, 2012. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.533>.

SOUSA, F. das C. A. et al. **Atividade antioxidante in vitro de *Lippia origanoides* H.B.K.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I8.16716>. Acesso em: 30 mar. 2025.

SOUSA, B. et al. **Use of essential oils extracted from the Caatinga as an alternative for the treatment of infectious diseases and inflammation.** 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.56238/sevened2024.016-007>. Acesso em: 30 maio 2025.

SOUZA, L. M. de. **Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.).** 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/NCAP-9XXHP9/1/luciana.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2025.

SOUZA, L. M.. et al. **Antioxidant activity and flavonoid content in *Lippia origanoides* Kunth.** *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 23, n. 3, 2018. Disponível em: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/591/322>. Acesso em: 30 mar. 2025.

SOUZA, Z. N., CÓRDULA, C. R., CAVALCANTI, I. M. (2024). **The potential usage of Caatinga natural products against multi-drug-resistant bacteria.** *Fitoterapia*, 172, 105752. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105752>

STAHL, W.; SIES, H. **Carotenoids and UV protection.** *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 11, n. 6, p. 926-932, 2012.

STASHENKO, E. E. et al. **Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia.** 38, p. 89–105, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.156>. Acesso em 29 mar. 2025.

TEIXEIRA, M. L. et al. NELSON, D. R. **Evaluation of the antioxidant activity of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) and *Lippia origanoides* (Kunth.) by various methods.** *Journal of Essential Oil Research*, v. 35, n. 2, p. 143–153, 2022. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2115570>.

TELES, S. et al. **Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K.** *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 169-176, 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.010

TOTH, P; NÉMETH, Á. **Investigation and characterisation of new eco-friendly cosmetic ingredients based on probiotic bacteria ferment filtrates in combination with alginite mineral.** *Processes*, 2022. doi: 10.3390/pr10122672.

TRINDADE, S. C. et al. **Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I9.18051.

TRINDADE, S. C. et al. **Atividade Antimicrobiana dos Extratos Metanólicos de Diferentes Espécies do Gênero *Lippia*.** *Research, Society and Development*, 2021. doi: 10.33448/RSD-V10I9.18051.

TYRRELL, R, E.X .M. **Sol, UV, and Age, and Skin Protection: The Boosting of Natural Defenses and Healing by Cosmeceuticals.** 2012

UC-CACHÓN, A. H. et al. **Potential Anti-Infectious Activity of Essential Oil Chemotypes of *Lippia origanoides* Kunth on Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains.** *Plants*, 2024. DOI: 10.3390/plants13091172.

UPADHYAY, P; MALIK, P; UPADHYAY, S. **Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil concentration in micro-emulsion with antibacterial and antifungal activity: An overview.** *Current Drug Therapy*, 2023. DOI: 10.2174/1574885518666230228103854.

UPTON, ROY. **Nomenclature: Herbal Taxonomy in the Global Commerce of Botanicals.** *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 2022. doi: 10.1007/978-3-031-26768-0_3.

VALISAKKAGARI, H; CHATURVEDI, C; RUPASINGHE, H. V. **Green extraction of phytochemicals from fresh vegetable waste and their potential application as cosmeceuticals for skin health.** *Processes*, v. 12, n. 4, 2024. DOI: 10.3390/pr12040742.

VERMA, A. et al. **Skin protection from solar ultraviolet radiation using natural compounds: a review.** *Environmental Chemistry Letters*, 2023. DOI: 10.1007/s10311-023-01649-4.

VIEIRA, R.P. et al. **Physical and physicochemical stability evaluation of cosmetic formulations containing soybean extract fermented by *Bifidobacterium animalis*.** *Braz J Pharm Sci*, p.515-25, 2009.

VOKBECK, M. L. et al. **Lipid alterations during the fermentation of vegetables by the lactic acid bacteria.** *Journal of Food Science*, 1963. doi: 10.1111/J.1365-2621.1963.TB00233.X.

WANG, M. et al. **Research on the development and biological activity of an antioxidant compound fruit and vegetable ferment.** 2020. DOI: 10.1063/5.0000428.

WEBER, K; SIEBERT, J.M. **Organic acids: a modern alternative for preservation of cosmetics.** In: *Conference Proceedings*, 2003.

WILLIAM, H. R.; ABDULLAYEVA, D; OBIDJON, Q. **Probiotic fermentation of herbal medicine: progress, challenges, and opportunities.** *The American Journal of Chinese Medicine*, 2023. doi: 10.1142/s0192415x23500519.

XIA, B.-H. et al. **Green and Efficient Extraction of Phenolic Components from Plants with Supramolecular Solvents: Experimental and Theoretical Studies.** *Molecules*, 2024, v. 29, p. 2067. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29092067>.

YADAV, B. et al. **Insights into the germplasm conservation and utilization: Implications for sustainable agriculture and future crop improvement.** *Archives of Agriculture and Environmental Science*, v. 9, n. 1, p. 180-193, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.26832/24566632.2024.0901026>. Acesso em: 30 maio 2025.

YAPICI, ISMAIL. **Natural antioxidants**. doi: 10.69860/nobel.9786053359333.2, 2024.

YOUNG, A. R. **The adverse consequences of not using sunscreens**. *International Journal of Cosmetic Science*, 2023, DOI: 10.1111/ics.12897.

YUAN, H. et al. **Optimized extraction and component identification of *Physalis alkekengi* L. calyx polyphenols and antioxidant dynamics during thermal processing**. *Processes*, v. 13, n. 9, p. 2793, 2025. DOI: 10.3390/pr13092793.

ZAPATA-ZAPATA, C. et al. ***Lippia organoides* Essential Oil or Thymol in Combination with Fluconazole Produces Damage to Cells and Reverses the Azole-Resistant Phenotype of a *Candida tropicalis* Strain**. *Journal of Fungi*, v. 9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9090888>

ZHANG, J. et al. **Effect of fermentation by *Lactobacillus* (L. acidophilus NCIB1899, L. casei CRL 431, L. paracasei LP33) on free and bound polyphenolic activities and antioxidant properties in three cultivars of *Chenopodium quinoa***. *Food Science Review*, v. 88, n. 6, p. 2679-2692, June 2023. DOI: 10.1111/1750-3841.16604.

ZHANG, X. et al.. **Research advances in probiotic fermentation of Chinese herbal medicines**. *iMeta*, 2023. DOI: 10.1002/imt2.93.

ZHENBIN, M. **Cosmetic preservative and preparation method and application thereof**. *Patente*, CN 202010288173.3 A, 2018.

ZHOU, P. et al. **Supramolecular deep eutectic solvents: Current advances and critical evaluation of cyclodextrins from solute to solvent in emerging functional food**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2024. DOI: 10.1111/1541-4337.70026.

CAPÍTULO 1: OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER COM POTENCIAL USO COSMÉTICO

Acsa Oliveira Magalhães^{1*}, Geany Peruch Camilloto², Danielle Figuerêdo da Silva³, Târis Maria Macedo de Santana¹, Angélica Maria Lucchese¹

RESUMO

A crescente demanda por ingredientes sustentáveis e funcionais na indústria cosmética tem impulsionado pesquisas voltadas para compostos bioativos naturais com eficácia e segurança comprovadas. *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, uma planta medicinal nativa do Brasil, é conhecida por suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antioxidante e antimicrobiana. A fermentação utilizando microrganismos probióticos, como *Lacticaseibacillus rhamnosus*, surgiu como uma ferramenta biotecnológica verde, capaz de aumentar a biodisponibilidade e a potência dos fitoquímicos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo otimizar parâmetros de fermentação das folhas de *Lippia thymoides* utilizando *Lacticaseibacillus rhamnosus* para potencializar suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com aplicação potencial como conservantes naturais em formulações cosméticas sustentáveis. Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional 2² para avaliar os efeitos combinados da concentração da planta (0,586–3,414%) e do inóculo bacteriano (de $1 \times 10^{1,172}$ até $1 \times 10^{6,828}$ UFC/mL). As fermentações foram realizadas por 24 horas em meio contendo extrato de levedura e dextrose. Foram avaliadas a atividade antioxidante (DPPH e ABTS), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), e a toxicidade através do ensaio com *Artemia salina*. A fermentação aumentou significativamente a atividade antioxidante, alcançando 85,15% de inibição no ensaio DPPH e 52,56% no ABTS, utilizando apenas 3,0% de concentração da planta e $1 \times 10^{3,5}$ UFC/mL de inóculo — equivalente aos extratos não fermentados em concentrações 12 vezes maiores. A CIM frente a *S. aureus* foi de 0,94 µg/mL (equivalente a 3,125 µg de folha fermentada/mL), demonstrando alta eficácia antimicrobiana. Ensaio toxicológicos confirmaram a segurança do extrato fermentado nas condições testadas. Conclui-se que a fermentação com *L. rhamnosus* é uma estratégia promissora e ambientalmente amigável para potencializar a bioatividade de *Lippia thymoides*, apoiando sua aplicação em produtos cosméticos naturais, sustentáveis e funcionais.

Palavras-chave: Fermentação, *Lippia thymoides*, antioxidantes, antimicrobianos, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, cosméticos naturais.

¹Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil ² Departamento de Tecnologia, Departamento de Saúde Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036- 900 Feira de Santana – BA, Brasil *E-mail: acsaomagalhaes@hotmail.com

ABSTRACT

The growing demand for sustainable and functional ingredients in the cosmetic industry has driven research toward natural bioactive compounds with proven efficacy and safety. *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, a medicinal plant native to Brazil, is known for its therapeutic properties, including antioxidant and antimicrobial activities. Fermentation using probiotic microorganisms, such as *Lacticaseibacillus rhamnosus*, has emerged as a green biotechnological tool capable of enhancing the bioavailability and potency of phytochemicals. In this context, the present study aimed to optimize the fermentation of *Lippia thymoides* leaves using *Lacticaseibacillus rhamnosus* to enhance their antioxidant and antimicrobial properties, with potential application as natural preservatives in sustainable cosmetic formulations. A 2^2 Central Composite Rotational Design was used to evaluate the combined effects of plant concentration (0.586–3.414%) and bacterial inoculum ($1 \times 10^{1.172}$ to $1 \times 10^{6.828}$ CFU/mL). Fermentations were carried out for 24 hours in a medium containing yeast extract and dextrose. Antioxidant activity (DPPH and ABTS), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and toxicity using the *Artemia salina* assay were evaluated. Fermentation significantly increased antioxidant activity, reaching 85.15% inhibition in the DPPH assay and 52.56% in ABTS, using only 3.0% plant concentration and $1 \times 10^{3.5}$ CFU/mL of inoculum — equivalent to unfermented extracts at 12 times the concentration. The MIC against *S. aureus* was 0.94 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to 3.125 μg of fermented leaf/mL), demonstrating high antimicrobial efficacy. Toxicological assays confirmed the safety of the fermented extract under tested conditions. It is concluded that fermentation with *L. rhamnosus* is a promising and environmentally friendly strategy to enhance the bioactivity of *Lippia thymoides*, supporting its application in natural, sustainable, and functional cosmetic products.

Keywords: Fermentation, *Lippia thymoides*, antioxidants, antimicrobials, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, natural cosmetics

1 INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações com a sustentabilidade ambiental e a segurança dos consumidores têm impulsionado a busca por alternativas biotecnológicas aos conservantes sintéticos tradicionalmente utilizados nas indústrias cosmética e farmacêutica. Nesse contexto, a fermentação, especialmente envolvendo microrganismos probióticos, surge como uma tecnologia promissora para a produção de extratos naturais enriquecidos com metabólitos bioativos (Ponnamma, 2024; Dey et al., 2016). Esses compostos oferecem não apenas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, mas também atendem às exigências contemporâneas por produtos mais seguros, naturais e ecologicamente responsáveis (Rathee et al., 2023).

A fermentação é um processo biotecnológico versátil que utiliza a atividade metabólica de microrganismos para transformar matérias-primas em produtos de maior valor agregado. Espécies como *Lactobacillus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae* vêm sendo amplamente empregadas para a geração de pós-bióticos e metabólitos de interesse farmacológico e cosmético (Duarte et al., 2023; Makhamrueang et al., 2023). Estudos recentes indicam que a fermentação promove o aumento da concentração de compostos fenólicos e antioxidantes, além de melhorar a biodisponibilidade dos ativos, potencializando sua eficácia em aplicações tópicas e sistêmicas (Puspitasari; Riyanti, 2024; Yu et al., 2022). A fermentação com bactérias do ácido láctico aumentou o conteúdo de fenóis totais em 36,1% na *Withania somnifera*, além de melhorar a atividade antioxidante (Yu et al., 2022). Além disso, a biotransformação de compostos de alto peso molecular em estruturas menores durante a fermentação resulta em maior absorção e eficácia, especialmente em produtos cosméticos (Majchrzak et al., 2022). Esses benefícios fazem da fermentação uma técnica promissora para o desenvolvimento de ingredientes bioativos com aplicação em cosméticos e produtos farmacêuticos (Duarte et al., 2023; Makhamrueang et al., 2023).

Os conservantes naturais são derivados de plantas, animais e microrganismos, e possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antienzimáticas que os tornam adequados para diversas aplicações industriais (Geetha, 2025; Pişkin; Seyhan 2021). Óleos essenciais, extratos vegetais e substâncias naturais vêm se destacando como alternativas aos conservantes sintéticos, contribuindo para a formulação de produtos mais sustentáveis, aumentando a vida de prateleira e prevenindo a contaminação microbiana dos produtos (Geetha, 2025; Pişkin; Seyhan, 2021). Entre as fontes vegetais,

destaca-se o alecrim, cujos extratos são ricos em compostos fenólicos com potente ação antioxidante e antimicrobiana, sendo amplamente aplicados na conservação de alimentos e cosméticos (Yarmolinsky et al., 2024; Delesa, 2018). Substâncias microbianas como bacteriocinas e metabólitos de fermentação também oferecem alta eficácia na inibição de microrganismos deteriorantes (Tizzano, 2022; Cedillo-Olivos et al., 2024). Além disso, combinações sinérgicas entre compostos naturais, como óleos essenciais e bacteriocinas, podem potencializar sua eficácia preservante (Cedillo-Olivos et al., 2024). Apesar dos avanços, ainda há desafios quanto à padronização, variabilidade de eficácia e regulamentação (Cheng et al., 2023). Mesmo assim, a tendência por soluções mais naturais e ecológicas continua impulsionando a adoção desses conservantes em escala industrial.

O Brasil possui uma rica biodiversidade, e no bioma Caatinga, o gênero *Lippia* é amplamente representado. A espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer tem ganhado destaque devido ao seu potencial como conservante natural, baseado em suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes presentes em óleos essenciais e extratos, que contêm compostos bioativos como timol e carvacrol (Sousa et al., 2017). Esses compostos demonstram eficácia contra microrganismos comuns em contaminação de cosméticos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Costa et al., 2017; Trindade et al., 2021). A capacidade antioxidante da planta, atribuída ao timol e carvacrol, ajuda a prevenir a oxidação de ingredientes sensíveis em formulações cosméticas, aumentando a estabilidade e a vida útil dos produtos (Trevisan et al., 2016; Sousa et al., 2017).

Assim, este estudo teve como objetivo otimizar a fermentação das folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer utilizando *Lactobacillus rhamnosus* para potencializar suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, reduzindo sua toxicidade, com potencial aplicação como conservantes naturais em formulações cosméticas sustentáveis. Nesse cenário, a fermentação, utilizando espécies nativas como *Lippia thymoides*, destaca-se como uma estratégia verde inovadora. Essa abordagem, alinhada aos princípios da economia circular e da biotecnologia sustentável, propicia o aproveitamento da biodiversidade brasileira para impulsionar a inovação nas indústrias cosmética e farmacêutica, além de contribuir para a redução dos impactos ambientais (Fu et al., 2014).

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *L. thymoides* foram coletadas no mês de setembro de 2021, na região do semiárido, no povoado Buraco do Vento em Tucano-BA, que se encontra a uma latitude de 10°57'15.2" Sul; longitude de 38°43'53.7" Oeste.

O material fértil foi herborizado para a confecção da exsicata e em seguida, depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), sob número de registro 241404 (Figura 1). Cadastro no Sisgen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) nº AB57225.

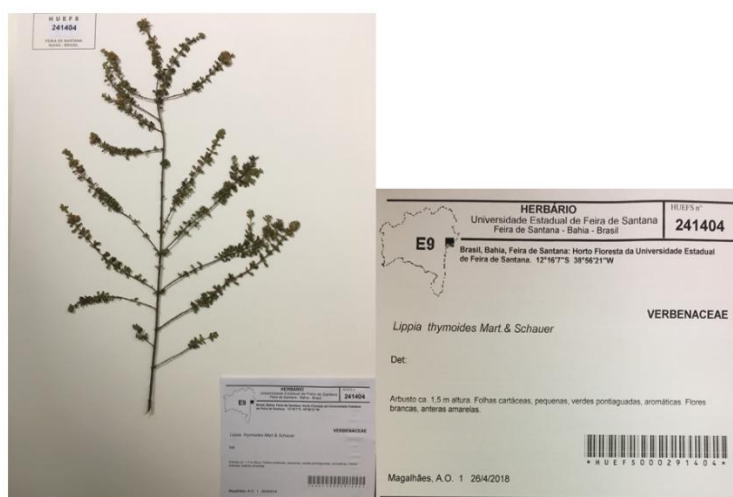


Figura 1: Exsicata e ficha de identificação de *Lippia thymoides*.

2.2 TESTES PRELIMINARES DE FERMENTAÇÃO DAS FOLHAS *L. thymoides*.

2.2.1 Seleção do microrganismo

Foram realizados testes com o objetivo de selecionar o microrganismo probiótico mais adequado para a fermentação das folhas de *Lippia thymoides*. A partir de uma revisão da literatura, foram selecionados quatro probióticos que apresentam propriedades funcionais previamente descritas, como atividade antioxidante, capacidade imunomoduladora, produção de metabólitos bioativos com potencial anti-inflamatório e ação antimicrobiana, sendo características relevantes para formulações cosméticas (Dou et al., 2023; Yadav et al., 2024). Além disso, todos apresentam comportamento de

anaeróbios facultativos, o que facilita seu uso em processos fermentativos. Os microrganismos selecionados para os testes preliminares foram *Lacticaseibacillus rhamnosus* CGMCC 1.12734 (LR), *Bifidobacterium longum* CGMCC 10452 (BL), *Bacillus coagulans* MTCC 25157 (BC) e *Saccharomyces boulardii* CCTCC M2012116 (SC), todos na concentração de 10^7 UFC/ML. As cepas probióticas utilizadas nos testes foram adquiridas em forma liofilizada. A preparação dos inóculos foi realizada por pesagem direta do pó liofilizado, utilizando balança analítica, seguida de reconstituição em solução salina estéril (0,85%). A quantidade de pó adicionada foi calculada com base na concentração de UFC/g informada pelos fornecedores de cada cepa, de modo a obter uma suspensão final contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL. A homogeneização das suspensões foi realizada por agitação manual e posterior repouso para reidratação completa.

Os chás foram preparados em frascos reagentes Schott Duran de 100 mL, adaptados com airlocks, utilizando uma solução composta por 1% (m/v) de folhas (secas e trituras em moinho de facas), 1% (m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de açúcar (dextrose) em água destilada. O preparo foi submetido a decocção por 10 minutos, com temperatura controlada entre 75°C e 85°C, e realizado em triplicata. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os microrganismos probióticos foram inoculados em cada frasco.

A fermentação foi conduzida por 24 horas a 37 °C, em estufa com controle de temperatura e protegida da luz e foram observados as mudanças de pH. Para a avaliação preliminar do potencial antioxidante das amostras fermentadas, foram realizados testes de atividade antioxidante pelos métodos de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS).

2.3.2 Escolha da concentração do inóculo

Após a seleção do microrganismo *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LR), foram realizados testes para se avaliar a melhor concentração do inóculo para a fermentação. Os chás foram preparados e fermentados seguindo o protocolo descrito no item 2.2.1, com a única modificação sendo a variação na concentração inicial de *Lacticaseibacillus rhamnosus*, ajustada para 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/mL.

2.3.3 Escolha do tempo de fermentação

Após eleger a melhor concentração de inóculo, realizaram-se experimentos para selecionar o melhor tempo de fermentação das folhas. Os chás foram preparados e fermentados iguais ao item 2.2.1 e os períodos de fermentações foram de 8, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 para cada uma das respostas estudadas, com o intuito de avaliar a influência conjunta das duas variáveis: concentração de planta (folha) (0,586 a 3,414%), concentração inicial de inóculo *L. rhamnosus* ($1 \times 10^{1,172}$ a $1 \times 10^{6,828}$ UFC/mL), como descrito na Tabela 1. Os chás foram preparados com 1% de substrato (extrato de levedura) e 1% de açúcar (dextrose) dissolvidos em água destilada, sendo submetidos à decocção por 10 minutos, com temperatura controlada entre 75 °C e 85 °C. Os experimentos de fermentação foram realizados durante 24 horas sob essas condições, com o objetivo de avaliar o comportamento das amostras. As respostas estudadas foram atividade antioxidante (sequestro dos radicais DPPH e ABTS). Adicionalmente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente ao *Staphylococcus aureus* 38 (MRSA), utilizando o método de microdiluição em caldo, com o intuito de identificar a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano. Esse tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada em 5 diferentes níveis (-1,414, -1, 0, +1, +1,414), cada nível possui seu respectivo valor nominal (Box; Hunter; Hunter, 1978).

Tabela 1: Parâmetros e níveis codificados das variáveis utilizadas na fermentação *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Parâmetros Variáveis	-1,41421	-1	0	+1	+1,41421
[] inicial de Inóculo (UFC/mL) <i>L. rhamnosus</i>	$1 \times 10^{1,172}$	1×10^2	1×10^4	1×10^6	$1 \times 10^{6,828}$
Concentração da Planta%	0,586	1	2	3	3,414

O planejamento experimental foi realizado com o intuito de estabelecer as condições mais adequadas à fermentação, assim a matriz totalizou 11 ensaios. O

planejamento fatorial foi analisado com o software *Statistica* versão 12, sendo utilizada uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição do modelo matemático.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi avaliada por espectroscopia no UV-Vis, observando-se uma diminuição na absorbância a 517 nm. Para isso, foram utilizadas amostras de diferentes extratos fermentados, todos padronizados na concentração de 0,5%, para permitir a comparação direta entre as amostras. Assim, adicionou-se em microplacas de 96 poços as amostras dos extratos fermentados e a solução de DPPH (40,0 µg/mL) na proporção 1:2 amostra/DPPH, homogeneizou-se e foram deixadas em repouso por 30 minutos ao abrigo de luz. Em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda de 517 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. O controle de DPPH foi preparado com uma mistura de água e solução metanólica de DPPH (40,0 µg/mL) na proporção de 1:2, enquanto o branco foi realizado apenas com metanol.

As amostras foram avaliadas por porcentagem de Sequestro do Radical Livre DPPH• (% I) mediante a Equação:

$$\% I = \frac{ADPPH - (AA - AC)}{ADPPH} \times 100$$

Onde:

ADPPH = absorbância do controle da solução do DPPH•

AA = absorbância da amostra

AC = absorbância do controle da amostra

Após a definição do ponto ótimo, foram realizados testes de atividade antioxidante para determinar a Concentração Efetiva 50% (CE50), que corresponde à quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Para isso, foram utilizadas equações lineares derivadas dos gráficos ($R^2 > 0,99$), com as concentrações de folhas variando entre 0,375 e 7,5 mg/mL. Além disso, foi realizado o teste TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) para avaliar a capacidade antioxidante das amostras em relação ao padrão Trolox. Esse teste mede a capacidade das amostras de neutralizar o radical DPPH• em comparação direta com o

padrão Trolox. As amostras fermentadas no ponto ótimo foram testadas em diferentes concentrações, e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox. O padrão Trolox foi utilizado em concentrações variando entre 3,61 e 100 μM como referência. Os resultados da atividade antioxidante em TEAC foram expressos em micromoles de Trolox por grama de folha ($\mu\text{mol Trolox/g}$). A concentração de antioxidantes no poço de reação [CP] foi expressa em concentração equivalente de Trolox (μM). Mediante reta da curva de calibração foi calculado o valor [CP] usando a Equação:

$$\text{CP} = \frac{(\text{Abs} - b)}{a}$$

Onde:

Abs = absorvância da amostra.

a = coeficiente angular obtido para a curva de calibração.

b = coeficiente linear obtido para a curva de calibração.

[CP] = concentração de antioxidantes no poço de reação

Levando em consideração a quantidade em gramas de folha utilizada (0,015 g em 100 mL de água), tem-se a atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol/ grama de folha}$) (TEAC), Equação:

$$\text{TEAC} = [\text{CP}] \frac{(0,1\text{L})}{(0,015\text{g})}$$

2.4.2 Método de sequestro do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico (ABTS)

Outro método empregado para avaliar a ação antioxidante foi o do sequestro de do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico (ABTS). Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de ABTS a 7 mM, dissolvendo-se 192 mg de ABTS em água destilada em um balão volumétrico de 50 mL. A solução foi fornecida para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Paralelamente, a solução de persulfato de potássio a 140 mM foi obtida pela dissolução de 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada em um frasco volumétrico de 10 mL, sendo fornecido para outro frasco de vidro âmbar, etiquetado.

O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi gerado pela preparação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, em temperatura ambiente, por 16 horas. Posteriormente, diluiu-se 1 mL dessa mistura em álcool etílico até que a absorção atingisse $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Para determinar a atividade antioxidante das amostras dos testes preliminares e as do delineamento composto central rotacional (DCCR), essas amostras foram diluídas a 5%. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL da amostra diluída para um tubo de vidro, adicionou-se 3 mL da solução do radical ABTS^{•+}, homogeneizou-se a mistura e fez-se a leitura da absorção em 734 nm, após 6 minutos.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata, e o álcool etílico foi utilizado como branco.

A porcentagem de inibição do radical do ABTS^{•+} (I%) foi calculada mediante a utilização da Equação:

$$\% I = \frac{A_{ABTS} - (A_A - A_C)}{A_{ABTS}} \times 100$$

Onde:

ABTS = absorbância do controle da solução do ABTS^{•+}

AA = absorbância da amostra

AC = absorbância do controle da amostra

Após a definição do ponto ótimo, foram realizados testes de atividade antioxidante para determinar a concentração efetiva 50% (CE₅₀) do método de ABTS. Para isso, foram utilizadas equações lineares derivadas dos gráficos (R² > 0,99), com as concentrações de folhas variando entre 60 a 510 mg/mL. Os resultados da atividade antioxidante também foram expressos em TEAC, em µM de Trolox por g de folha. A curva padrão do Trolox foi construída com concentrações variando entre 100 e 1000 µM.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada através do método de microdiluição em caldo do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; CLSI, 2016). A concentração inibitória mínima foi determinada frente a cepas de *Staphylococcus aureus* 38 (MRSA) mantidas no setor de microbiologia do Lapron para realização dos testes.

As bactérias usadas no preparo dos inóculos foram repicadas 24 horas antes. As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller–Hinton Agar (MHA), mantidas em estufa de crescimento com circulação de ar a 37 °C, por 24 h. Para o preparo do inóculo, 3-5 colônias isoladas foram adicionadas a 5 mL de solução

salina a 0,85% com o uso de alça microbiológica. Após inoculação, os tubos foram agitados em Vortex (Biomixer® QL-901) e a leitura da absorbância da suspensão foi realizada em colorímetro Biochrom® a 580 nm. A absorbância das suspensões foi ajustada para a faixa de 0,10 nm para *S. aureus*, visando atingir a concentração $1-5 \times 10^8$ UFC/mL para bactéria, equivalente a escala 0,5 de McFarland. Uma nova diluição foi realizada para finalização do preparo do inóculo, adicionando 20 μ L da suspensão em 29,98 mL de meio MH para a bactéria para a levedura de maneira que cada poço contenha aproximadamente 5×10^4 UFC/mL.

As amostras dos fermentados foram autoclavadas e, após o processo de autoclavagem, utilizadas no primeiro poço do ensaio, sem diluição prévia. Os controles positivos foram feitos com o antibiótico cloranfenicol (CLO, Sigma Aldrich), que foram mantidos em uma concentração estoque de 10 mg/mL.

Essas soluções foram utilizadas para realização do teste de microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços (figura 2).

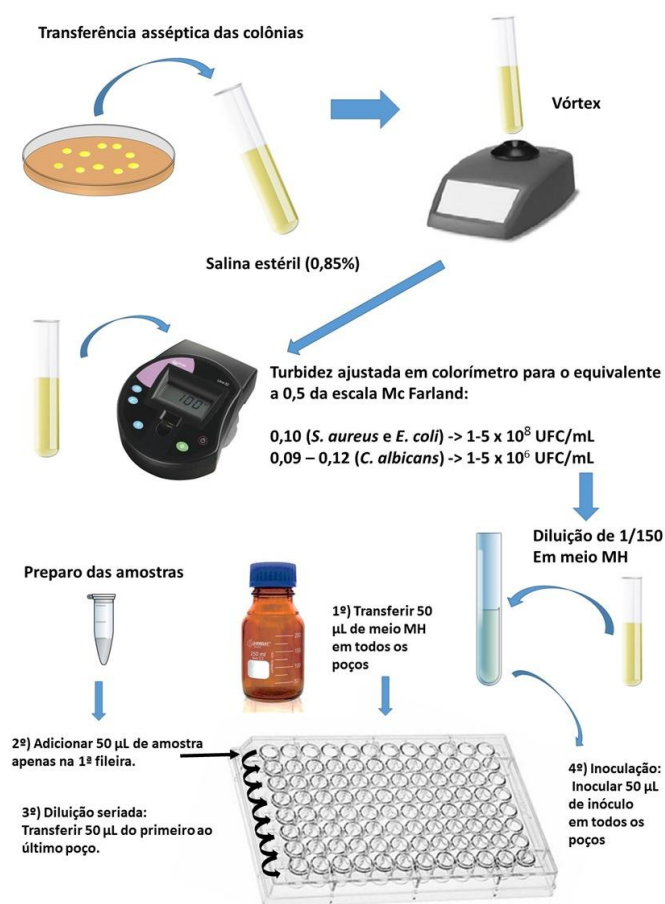


Figura 2: Esquema de preparação do CIM.

Também foram feitos controles da viabilidade dos patógenos e controles para verificar a esterilidade do meio, solução salina, água destilada e das amostras utilizadas. As placas contendo bactérias foram acondicionadas em sacos plásticos e incubadas em estufa de crescimento por 21 h a 36 °C. Após esse período, as placas foram reveladas com resazurina, adicionando-se em cada poço 30 µL de uma solução de resazurina a 0,01%. As placas então foram novamente colocadas em sacos plásticos e incubadas por mais 3 h. Após esse período, foi feita a leitura dos resultados: nos poços em que a coloração mudou para rosa, houve crescimento bacteriano, enquanto a menor concentração em que se manteve a coloração azul foi considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi expressa como a menor concentração do extrato fermentado, em percentual calculado com base na quantidade de material vegetal seco utilizada no preparo da fermentação, capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. As amostras foram testadas em oito concentrações sucessivas, com diluição em fator 2, variando de 25% no primeiro poço até 0,20% no oitavo (25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,20%). Também foi analisado o valor correspondente em miligramas por mililitro (mg/mL) do extrato liofilizado. A inibição foi determinada pela manutenção da coloração azul da resazurina, indicando ausência de crescimento microbiano.

2.6 TESTE DE TOXICIDADE

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* está de acordo com o método proposto por Meyer e colaboradores (1982). Inicialmente, foram pesados 19 g de sal marinho, que foram divididos em 5 litros de água mineral (água sem cloro) com eficiência até a dissolução completa. Em seguida, a água do mar artificial foi reduzida para o tamanho, enquanto a bomba foi ligada para promover a oxigenação da água. Os ovos de *Artemia salina* foram colocados na parte escura do aquário, e após 24 horas, ocorreu sua eclosão. Os *nauplii* recém-eclodidos (estágio larval do camarão) migraram para a parte iluminada, de onde foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Dez *nauplii* foram transferidos para cada frasco de teste, sendo expostos as amostras por um período de 24 horas. As amostras das soluções fermentadas e não fermentadas foram previamente liofilizadas para a obtenção dos extratos secos. Posteriormente, os extratos foram solubilizados em água do mar

artificial, em diferentes concentrações variando de 50 a 1000 µg/mL, para a realização dos ensaios. O controle foi preparado com 10 *nauplii*, utilizando-se apenas água do mar artificial (5 ml). Todos os testes foram realizados em triplicata. Os frascos foram posicionados próximos a uma lâmpada incandescente de 60 W, e após 24 horas de incubação, os camarões sobreviventes foram contados em todos os frascos, com o auxílio de uma lupa com lente de aumento para facilitar a visualização. Os *nauplii* foram considerados mortos quando não exibiram qualquer movimento durante dez segundos de observação. A porcentagem de mortalidade em cada concentração foi determinada pela média aritmética dos valores obtidos nas três triplicadas. Nos casos em que houve mortalidade sem controle, os dados foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbot:

$$\% \text{mortos} = \left[\frac{\text{teste} - \text{controle}}{\text{controle}} \right] \times 100$$

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico por meio do programa Microsoft Excel 2010, que gerou o valor da concentração letal média (CL₅₀) das amostras, com um intervalo de confiança de 95%. O gráfico de atividade citotóxica foi utilizado para determinar a faixa de concentração a ser testada, priorizando sempre a maior concentração em que se observou 0% de mortalidade e a menor concentração em que ocorreu 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desses limites, permitindo a obtenção da CL₅₀ (dose letal para 50% da população) dos extratos testados (Veiga et al., 1989).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para detecção de diferenças significativas entre tratamentos, e, quando identificada significância pelo teste F, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais médias diferiram entre si. As análises foram realizadas no Excel 2010, e os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão, acompanhados de valores de p e intervalos de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTES PRELIMINAR

3.1.1 Seleção do microrganismo

Os resultados reunidos na Tabela 3 apresentam o percentual de inibição nos testes antioxidantes de sequestro dos radicais DPPH e ABTS para escolha dentre os quatro microrganismos testados (*Bifidobacterium longum* (BL); *Saccharomyces boulardii* (SB); *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Bacillus coagulans* (BC)), o *L. rhamnosus* foi selecionado para os experimentos subsequentes, destacando-se por apresentar o maior percentual de inibição (I%) no teste de DPPH ($\approx 52,26\%$) (Tabela 3). O tipo de microrganismo mostrou ter efeito significativo ($p < 0,05$) sobre I% no teste de DPPH, segundo a ANOVA. No entanto, o teste de Tukey não revelou diferenças significativas ($p\text{-ajustado} > 0,05$) entre LR ($\approx 52,26\%$) e SB ($\approx 51,16$). Porém, em critério de desempate *L. rhamnosus* também apresentou o maior percentual de inibição ($\approx 24,67\%$) ($p < 0,05$) no método ABTS. Esses dados levaram a escolha de *L. rhamnosus* como o microrganismo mais promissor para a fermentação, considerando sua superioridade nos testes de atividade antioxidante. Além disso, quando comparado ao chá não fermentado, observa-se que todas as amostras fermentadas apresentaram incremento na capacidade antioxidante, sobretudo no teste DPPH. O chá apresentou um percentual de inibição de aproximadamente 36,12% no teste DPPH, valor inferior ao registrado para todas as cepas fermentativas, especialmente para *L. rhamnosus* e *S. boulardii*. Da mesma forma, no teste ABTS, o chá apresentou o menor percentual de inibição ($\approx 19,00\%$), inferior ao de todas as amostras fermentadas, evidenciando que o processo fermentativo contribui para o aumento da atividade antioxidante das folhas de *Lippia thymoides*.

Observou-se também que as amostras fermentadas apresentaram redução de pH em relação ao chá não fermentado, variando de aproximadamente 5,6 para 4,9 ao final do processo. Essa acidificação, típica da produção de ácidos orgânicos durante a fermentação, indica atividade metabólica dos microrganismos e pode favorecer a liberação, transformação e estabilidade de compostos fenólicos presentes na matriz vegetal (Wang et al.,2020). Tal condição pode ter contribuído para o aumento da capacidade antioxidante observado nos testes de DPPH e ABTS, reforçando o papel da

fermentação probiótica na potencialização da atividade bioativa das folhas de *Lippia thymoides*.

Esses resultados indicam que a fermentação utilizando microrganismos probióticos promove uma potencialização da atividade antioxidante da matriz vegetal, sendo que *L. rhamnosus* se destacou como o mais promissor, justificando sua escolha para os ensaios posteriores.

Tabela 3: Percentual de inibição nos testes antioxidantes de sequestro dos radicais DPPH e ABTS para escolha do microrganismo

Teste	BL	LC	LR	SB	CHÁ sem fermentar
DPPH	34,21±1,82 ^c	43,46±0,64 ^b	52,26±1,91^a	51,16±1,04 ^a	36,12±1,76 ^c
ABTS	22,24±0,51 ^b	22,48±0,44 ^b	24,67±0,14^a	22,71±0,91 ^b	19±0,7 ^c

Legenda: BL = *Bifidobacterium longum*; LC = *Bacillus coagulans*; LR = *Lactocaseibacillus rhamnosus*; SB = *Saccharomyces boulardii*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada linha, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante observada nos testes de sequestro de DPPH e ABTS destaca a eficácia de *L. rhamnosus* na potencialização dos compostos bioativos durante a fermentação das folhas de *Lippia thymoides*. Diversos estudos científicos têm demonstrado que *L. rhamnosus* pode aumentar a atividade antioxidante de produtos fermentados. Wang e colaboradores (2020) utilizaram frutas e vegetais ricos em diversos compostos antioxidantes naturais como matérias-primas principais e conduziram estudos de fermentação com cepas de *Lactocaseibacillus rhamnosus*. A fermentação resultou em um aumento significativo na atividade antioxidante, com o teor de polifenóis aumentando em 29,3 mg/L e o conteúdo de flavonoides em 58 mg/L. Além disso, o estudo relatou um aumento de 100% na capacidade de eliminação de radicais livres, destacando o potencial desses produtos fermentados para melhorar as propriedades antioxidantes e prevenir problemas relacionados ao estresse oxidativo.

Lactocaseibacillus rhamnosus pode aumentar a atividade antioxidante por meio de vários mecanismos metabólicos e interações bioquímicas durante a fermentação, produzindo metabólitos antioxidantes como ácido lático, ácido acético e peptídeos, ou induzindo as vias antioxidantes da célula hospedeira (Hu et al., 2023; Ding et al., 2023). Outro mecanismo relevante envolve a ação enzimática sobre a matriz vegetal, promovendo (i) a hidrólise parcial da parede celular, o que libera compostos fenólicos previamente ligados, e (ii) a transformação de fenólicos em moléculas menores, mais bioacessíveis e com maior atividade antioxidante. Esses processos podem explicar a

superioridade de *L. rhamnosus* nos testes DPPH e ABTS em relação ao chá não fermentado e a outras cepas testadas. Nesse sentido, a determinação quantitativa do teor de fenólicos totais e flavonoides nas amostras fermentadas e não fermentadas poderia confirmar essa hipótese e estabelecer uma relação mais direta entre a modificação da matriz vegetal pela fermentação e a elevação da capacidade antioxidante (Fadlillah et al., 2021; Wang et al., 2011).

As enzimas antioxidantes de *L. rhamnosus*, como a superóxido dismutase e a catalase, ajudam a eliminar os radicais livres, aliviando o estresse oxidativo (Hu et al., 2023). Além disso, *L. rhamnosus* pode modificar o ambiente de fermentação, influenciando a disponibilidade de nutrientes e a composição do substrato para favorecer a produção de compostos antioxidantes (Zhang et al., 2023). As interações sinérgicas com o substrato podem aumentar ainda mais a atividade antioxidante de *L. rhamnosus*, conforme observado em produtos lácteos fermentados com maior capacidade antioxidante de polifenóis (Zhang et al., 2023). A capacidade de quelação de metais de *L. rhamnosus* também auxilia na redução da formação de espécies reativas de oxigênio associadas a íons metálicos, contribuindo para seu efeito antioxidante geral (Zhou et al., 2022). A introdução de bactérias do ácido láctico (LAB) aumentou significativamente as propriedades antioxidantes da quinoa. A mistura com *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* resultou em um aumento de 15,7%-79,4% nos compostos fenólicos livres (PCs) e de 7,6%-84,3% nos flavonoides livres (FCs), em comparação com bebidas não fermentadas. A investigação também resultou em aumentos provenientes de compostos antioxidantes como procianidina B2, ácido protocatecuico e kaempferol. No geral, a fermentação com LAB aumentou a atividade antioxidante da quinoa, com a cepa *L. acidophilus* demonstrando uma maior capacidade metabólica (Zhang et al., 2023).

Esses mecanismos combinados mostram a capacidade de *L. rhamnosus* de aumentar a atividade antioxidante durante a fermentação, influenciada por vários fatores, como condições de fermentação e características do substrato.

3.1.2 Escolha da concentração inóculo

Como demonstrado na Tabela 4 as melhores concentrações para o teste de DPPH foram de 10^4 e 10^6 UFC/mL ($I\% \approx 42$), entretanto, no método ABTS não

houve diferença estatística significativa, a concentração 10^4 foi escolhida para dar prosseguimento nos demais testes, pois a escolha foi baseada em usar uma quantidade menor de microrganismos. Densidades celulares mais baixas na fermentação microbiana podem favorecer a eficiência metabólica e enzimática ao reduzir a competição por nutrientes e aumentar a disponibilidade de oxigênio, resultando em maior produção de metabólitos antioxidantes, como ácidos orgânicos, peptídeos bioativos e enzimas que hidrolisam a parede celular vegetal, liberando compostos fenólicos e convertendo-os em moléculas menores e mais bioacessíveis (Fadlillah et al., 2021; Zhang et al., 2025).

Durante o processo fermentativo, verificou-se redução do pH em todas as amostras, evidenciando a produção de ácidos orgânicos por *L. rhamnosus*. Nos inóculos de 10^4 e 10^6 UFC/mL, o pH diminuiu de 5,5 para 4,6, enquanto no de 10^8 UFC/mL a queda foi mais acentuada, de 5,4 para 3,6 após 24 horas. Essa acidificação coincidiu com a menor atividade antioxidante observada no método DPPH, sugerindo que um pH mais baixo pode comprometer a preservação de compostos antioxidantes, possivelmente pela degradação de fenólicos ou de outras moléculas bioativas sensíveis à acidez elevada. Esse resultado sugere que um pH excessivamente baixo pode não ser favorável à preservação ou potencialização de compostos antioxidantes ativos frente ao radical DPPH, possivelmente devido à degradação de moléculas fenólicas ou outras substâncias bioativas sensíveis à acidez extrema.

Assim, embora o aumento da densidade celular inicial tenha acelerado a acidificação, isso não se traduziu em maior atividade antioxidante. Pelo contrário, a condição de pH mais moderada obtida com menores inóculos iniciais parece ter sido mais favorável à manutenção dos compostos responsáveis pela ação antioxidante contra o DPPH.

Tabela 4: Percentual de inibição de DPPH e ABTS para escolha da concentração do inóculo inicial de *L. rhamnosus*

UFC	10^4	10^6	10^8
DPPH	42,27±4,23 ^a	42,79±3,22 ^a	29,89±2,11 ^b
ABTS	23,77±1,2 ^a	24,07±0,66 ^a	25,86±1,6 ^a

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A concentração inicial de microrganismos é um fator crucial em culturas microbiológicas, influenciando diretamente o crescimento, a viabilidade e o metabolismo dos organismos. No caso específico do *L. rhamnosus*, uma bactéria amplamente reconhecida por suas propriedades probióticas, a escolha da concentração

inicial é fundamental para maximizar sua atividade metabólica e probiótica. Segundo Kleerebezem e Hols (2007) diferentes concentrações podem afetar a dinâmica de crescimento da cultura, a produção de metabólitos desejáveis e a competição com outros microrganismos no meio de cultivo.

3.1.3 Escolha do tempo de fermentação

Os resultados do tempo de fermentação estão descritos nas Tabela 5 onde foram avaliados dez tempos (8–168 h). A maior inibição de DPPH ocorreu em 24 h (46,12%), enquanto ABTS não apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo do período. O pH do sistema decresceu do valor inicial do chá (5,8) para 3,9 em 168 h, caracterizando uma acidificação progressiva. O pico de DPPH em 24 h coincide com a fase inicial da acidificação, antes de o meio atingir os valores mínimos observados ao final; nessa janela, a fermentação tende a liberar e/ou formar compostos bioativos (fenólicos e peptídeos) sem ainda sofrer as perdas associadas à acidez prolongada (Liang et al., 2023; Aji; Wikandari, 2024). Após 30 h, a queda de DPPH é compatível com a combinação de degradação química (oxidação) e consumo microbiano de antioxidantes, além de menor síntese sob estresse ácido e limitação de substratos (Liang et al., 2023; Putri et al., 2022), culminando nos menores valores quando o pH chega a 3,9 em 168 h. A estabilidade dos resultados de ABTS sugere que os compostos que respondem a esse método são menos sensíveis às mudanças de pH e/ou diferem em polaridade e mecanismo de ação em relação aos detectados por DPPH (Aji; Wikandari, 2024). Assim, 24 h foi selecionado como tempo ótimo por representar o melhor compromisso entre formação e estabilidade dos antioxidantes, evitando os efeitos adversos da acidificação prolongada.

Tabela 5: Percentual de inibição de DPPH e ABTS para escolha o tempo de fermentação.

Horas	DPPH	ABTS
8	36,87±1,1 ^b	23,53±1,3 ^a
12	37,25±2,5 ^b	22,13±1,9 ^a
24	46,12±1,1 ^a	23,74±2,8 ^a
30	38,72±2,1 ^b	24,70±2,2 ^a
48	36,69±2,3 ^b	24,23±1,6 ^a
72	38,48±2,5 ^b	23,03±1,2 ^a
96	33,79±3,1 ^b	22,84±0,8 ^a
120	34,16±2,3 ^b	24,04±1,7 ^a
144	30,37±2,4 ^c	22,29±2,2 ^a
168	30,76±1,4 ^c	20,39±2,1 ^a

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Estudos prévios têm investigado diversos tempos de fermentação para *L. rhamnosus* em diferentes aplicações. Dhanana e seus colaboradores (2021) discutem como diferentes tempos de fermentação podem influenciar significativamente a produção de ácido láctico e outros metabólitos importantes para as propriedades probióticas dessa bactéria. Eles destacam que períodos mais longos podem favorecer uma maior produção de ácido láctico, aumentar a acidez, diminuir o pH e melhorar o aroma e sabor na bebida de soja.

Jafarpour e Hashemi (2023) investigaram o impacto do tempo de fermentação nas propriedades bioativas e funcionais das sementes de quinoa fermentadas com *L. rhamnosus* e *L. fermentum*, tanto individualmente quanto em co-cultura. O aumento do tempo de fermentação resultou no crescimento da população bacteriana e em um aumento significativo nos fenóis totais e na atividade antioxidante. No entanto, os níveis de tocoferóis e vitamina C diminuíram, especialmente na co-cultura, devido à utilização pelas bactérias ou à degradação. O pH também diminuiu, especialmente na co-cultura, o que pode contribuir para a preservação e segurança do produto. O estudo destaca que a otimização do tempo de fermentação e das combinações bacterianas pode melhorar os benefícios nutricionais e funcionais das sementes de quinoa fermentadas.

Dong-mei e sua equipe (2008) avaliaram a eficácia antimicrobiana do *Lactobacillus casei* subsp. *L. rhamnosus* LCR 719, que se destaca como uma característica promissora, especialmente contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhimurium*. Essa capacidade antimicrobiana está diretamente relacionada à produção de ácidos orgânicos, particularmente o ácido láctico, durante a fermentação. A dinâmica na produção de ácidos ao longo do tempo também

evidencia a importância da duração da fermentação. A mudança gradual na proporção entre ácido lático e ácido acético — de 0,28 nas primeiras 6 horas para 2,63 após 60 horas — foi crucial para intensificar a atividade antimicrobiana. Assim, o tempo de fermentação não é apenas um parâmetro técnico, mas um fator determinante na regulação da produção de compostos bioativos.

Esses estudos destacaram a importância de selecionar um tempo de fermentação para otimizar a produção de compostos bioativos e maximizar as propriedades funcionais dos produtos fermentados. A duração da fermentação influencia diretamente a atividade microbiológica, a produção de ácidos orgânicos, como ácido lático, e a liberação de compostos com efeitos benéficos, como antioxidantes e propriedades antimicrobianas. Além disso, o tempo de fermentação pode afetar a segurança e a preservação do produto, ao reduzir o pH e inibir organismos deteriorantes. Assim, compreender como o tempo de fermentação impacta esses aspectos é essencial para desenvolver produtos mais eficientes (Gebreel, 2022; Jafarpour; Hashemi, 2023; Dong-Mei et al., 2008)

3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Em processos fermentativos cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis, assim é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ou faixa ótima seja escolhida, nas condições experimentais. Alguns dos parâmetros avaliados nos experimentos univariados auxiliaram na construção da matriz, como tempo de fermentação (24 h) e concentração do inóculo (10^4 UFC/mL), estipulados como ponto central.

Os resultados da Matriz DCCR 2^2 estão descritos na Tabela 7 com total de 11 ensaios distribuídos entre 4 pontos fatoriais, 3 centrais e 4 axiais necessários para estimar a curvatura e a interação entre os efeitos da concentração de planta e de inóculo.

Tabela 7: Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional (DCCR) para fermentação de *L. thymoides* com *L. rhamnosus*.

ENSAIO	[PLANTA] codificada	[MICRO] codificada	[PLANTA] (%)	[MICRO] (UFC/mL)	I% DPPH	I% ABTS	CIM (%)	CIM (mg/mL)
1	-1	-1	1	2	43,25	20,68	12,5	4,35
2	-1	1	1	6	40,08	26,53	12,5	4,35
3	1	-1	3	2	84,93	52,02	6,25	2,18
4	1	1	3	6	84,87	50,9	6,25	2,18
5	-1,414	0	0,586	4	20,87	15,83	12,5	4,35
6	1,414	0	3,414	4	84,87	48,17	3,13	1,09
7	0	-1,414	2	1,172	65,33	36,71	6,25	2,18
8	0	1,414	2	6,828	71,25	38,42	12,5	4,35
9	0	0	2	4	73,16	37,71	6,25	2,18
10	0	0	2	4	73,97	37,52	6,25	2,18
11	0	0	2	4	73,04	36,61	6,25	2,18

Legenda: [PLANTA] - concentração de folha de *L. thymoides*; [MICRO]- concentração de micro-organismos *L. rhamnosus*; I%- Percentual de inibição; CIM (%): concentração inibitória mínima expressa como percentual do fermentado em relação à concentração inicial correspondente a 34,8 mg/mL de extrato seco.

Foram avaliados os efeitos individuais das variáveis, concentração de planta e concentração de microrganismo, bem como a interação entre elas. A significância estatística de cada efeito foi determinada com base nos efeitos padronizados (valores t) e nas respectivas probabilidades associadas (valores p), conforme apresentado na Tabela 8. Apenas a concentração de planta exerceu efeito sobre a I% no teste de inibição de DPPH (Tabela 8). O coeficiente linear para o fator [PLANTA] (quantidade das folhas de *L. thymoides*) foi de 22,12, sugerindo um efeito positivo significativo deste fator sobre DPPH, ou seja, à medida que o valor de [PLANTA] aumenta, o valor de DPPH também aumenta de forma linear. Além disso, o coeficiente quadrático para o fator [PLANTA] foi de -9,04, evidenciando uma relação quadrática com concavidade para baixo entre [PLANTA] e DPPH. Este resultado sugere a existência de um ponto de máximo, após o qual o valor de DPPH começa a diminuir à medida que o valor de [PLANTA] aumenta. Os intervalos de confiança indicam a faixa na qual os verdadeiros valores dos efeitos podem ser esperados, com 95% de confiança.

Tabela 8: Coeficiente de regressão para atividade antioxidante (DPPH).

Variáveis	Coeficiente da regressão	Erro padrão	Valor de p
[PLANTA] (L)	22,1241	0,9649	0,000000
[PLANTA] (Q)	-9,0352	1,0978	0,000036

Legenda: (L): fator linear, (Q): fator quadrático

Para identificação do ponto ótimo da [PLANTA] para variável DPPH, foi utilizado o modelo de regressão:

$$\text{DPPH} = 71,66 + 22,15 * [\text{PLANTA}] - 9,04 * [\text{PLANTA}]^2 \text{ (R}^2 = 0,98668\text{)}$$

Onde:

DPPH = atividade antioxidante medida pelo método DPPH

[PLANTA] = concentração de planta (*L. thymoides*)

R² = coeficiente de determinação

Os resultados indicam que tanto os efeitos lineares quanto os quadráticos do fator [PLANTA] são altamente significativos para a inibição do DPPH, com o modelo ajustado apresentando R₂=0,987, ou seja, 98,67% da variabilidade observada é explicada pelas variações na concentração de planta. O intercepto de 71,66 representa a atividade antioxidante esperada na ausência de material vegetal. A análise do ponto ótimo revelou que a concentração de 2,86% (1,22 codificado) maximiza a atividade antioxidante, correspondendo ao nível em que o efeito positivo da adição de planta é equilibrado com fatores limitantes.

Embora inicialmente pudesse se esperar um efeito linear, com maior concentração de planta resultando em maior atividade antioxidante, observou-se que concentrações acima do ponto ótimo causam declínio na atividade. Esse comportamento pode ser explicado por fatores físicos e bioquímicos: altas concentrações aumentam a viscosidade do meio, dificultando a transferência de massa e a liberação eficiente de compostos fenólicos e peptídeos antioxidantes (Galia et al., 2025). Além disso, concentrações elevadas podem favorecer interações entre compostos, resultando em precipitação, encapsulamento ou degradação de metabólitos ativos, reduzindo sua disponibilidade para reagir com os radicais livres no ensaio DPPH (Xavier et al., 2022).

Portanto, o ponto ótimo de 2,86% representa a condição em que a quantidade de material vegetal é suficiente para fornecer metabólitos antioxidantes em níveis máximos, sem sofrer os efeitos adversos das altas concentrações sobre a eficiência de extração, solubilidade e acesso dos radicais aos antioxidantes. Esse parâmetro é crucial para o planejamento de formulações ou processos que busquem maximizar a atividade antioxidante de forma eficiente.

Os resultados da ANOVA para modelo de regressão descritos na Tabela 9 indicam que o modelo de regressão é estatisticamente significativo, evidenciado pelo alto valor da estatística F (F_{cal} = 296,16) em comparação com o valor crítico (F_{tab} =

4,46). Isso confirma que ao menos um dos preditores influencia de forma significativa a variável dependente.

Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) para variável DPPH para Modelo de Regressão: Significância Global e Avaliação de Ajuste.

FV	GL	SQ	QM	Fcal
Regressão Resíduo	2	4395,1	2197,6	296,16*
	8	59,44	7,419	
FAJ	6	58,8		
Erro puro	2	0,5		
Total	10	4454,5		

Legenda: GL (Graus de Liberdade); SQ (Soma dos Quadrados); QM (Quadrado Médio) Fcal (Valor F calculado). $F_{tab}(2,8) = 4,46$: Como $F_{cal} > F_{tab}$ o modelo é significativo.

O gráfico de superfície ajustada (Figura 3) representa como a variável de resposta DPPH varia em função das variáveis independentes [PLANTA] e [MICRO].

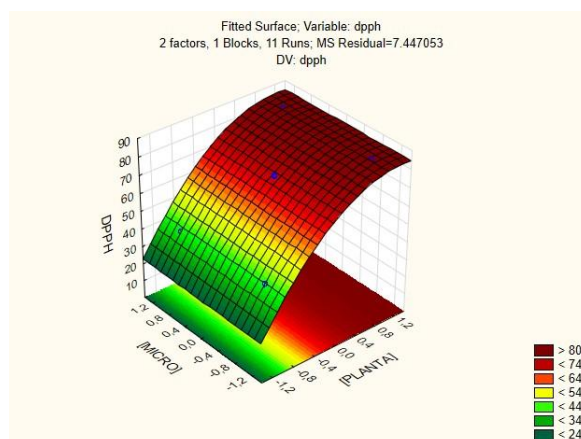


Figura 3: Gráfico de Superfície de Resposta Ajustada para a Variável DPPH.

Legenda: Eixo X [PLANTA]: Representa a variável associada à planta utilizada no experimento; Os valores variam de aproximadamente -1,5 a 2,0; Eixo Y [MICRO]: Representa a variável associada ao método de preparação ou uma outra variável operacional. Os valores variam de aproximadamente -1,5 a 1,5. Eixo Z (DV: DPPH): Representa a variável de resposta medida (% I DPPH), que indica a porcentagem de inibição do radical livre DPPH, uma medida da atividade antioxidante. Os valores variam de aproximadamente 30 a 80.

Os padrões observados mostram que as regiões de alta atividade antioxidante (vermelho) indicam condições onde a atividade antioxidante medida (% I DPPH) é mais elevada. Essas áreas estão localizadas quando os valores da variável [PLANTA] estão entre aproximadamente 0,5 a 2,0. Já as regiões de baixa atividade antioxidante (verde) correspondem a valores de [PLANTA] entre -1,5 a 0,5.

Os resultados indicam que a atividade antioxidante (% I DPPH) aumenta significativamente com a elevação dos valores da variável [PLANTA], sugerindo que

maiores proporções de material vegetal contribuem para uma maior presença de compostos antioxidantes ativos.

Embora o gráfico represente também a variável [MICRO], a análise estatística demonstrou que essa variável não foi significativa, ou seja, suas variações não exerceram efeito estatisticamente relevante sobre a atividade antioxidante. Dessa forma, a resposta antioxidante observada pode ser explicada exclusivamente pela variação da concentração de [PLANTA], sendo esta a variável determinante no comportamento do sistema. Os dados deste estudo destacam a importância do fator [PLANTA] na determinação dos níveis de DPPH, com efeitos lineares e quadráticos significativos. A compreensão destes efeitos permite uma base sólida para otimizar o uso de [PLANTA] em aplicações que melhoram a atividade antioxidante.

A fermentação é um processo transformador que desempenha um papel fundamental na amplificação da biodisponibilidade e da bioatividade de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, a partir de matrizes vegetais complexas. Essa transformação é conduzida por enzimas microbianas, como beta-glucosidase, fenoloxidase e esterase, que atuam rompendo as ligações glicosídicas e liberando compostos antioxidantes previamente ligados ou inativos (Huynh et al., 2014). O gênero *Lippia*, amplamente reconhecido por seu elevado conteúdo de flavonoides, se mostra particularmente beneficiado por esse processo, com ganhos significativos em sua capacidade de neutralizar radicais livres, um efeito atribuído à conversão dos compostos fenólicos para formas mais biodisponíveis (Bautista-Hernández et al., 2024).

No que diz respeito ao impacto da fermentação sobre o conteúdo fenólico, estudos têm evidenciado que a ação de microrganismos como *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus brevis* contribui diretamente para o aumento do conteúdo fenólico total e da atividade antioxidante em diversas plantas (Puspitasari; Riyanti, 2024). Isso ocorre graças à quebra das estruturas da parede celular vegetal pelas enzimas microbianas, que promovem a liberação de compostos fenólicos ligados, além da sua conversão em metabólitos mais ativos por meio de processos como glicosilação e desglicosilação (Huynh et al., 2014). A fermentação pode ainda gerar novos metabólitos fenólicos, como o ácido gálico e a quercetina, que reforçam a capacidade antioxidante do extrato resultante (Liang et al., 2023).

A influência microbiana na bioatividade dos flavonoides também é um fator determinante. A escolha das cepas e das condições fermentativas exerce forte impacto na liberação e modificação dos compostos bioativos. Por exemplo, foi demonstrado que

Aspergillus oryzae e *Lactobacillus plantarum* possuem capacidade efetiva de hidrolisar ligações glicosídicas em compostos fenólicos, aumentando sua atividade biológica (Liang et al., 2023).

Em resumo, o comportamento observado parece refletir um equilíbrio entre a quantidade de material vegetal disponível (variável [PLANTA]), que determina a presença inicial de compostos fenólicos, e a capacidade do sistema fermentativo de liberá-los e ativá-los por meio da ação enzimática. Nesse contexto, a fermentação atua como uma ferramenta promissora para intensificar os efeitos antioxidantes de espécies vegetais, como *Lippia thymoides*, desde que sejam controladas adequadamente as condições microbianas envolvidas.

Os resultados da análise estatística em destaque na Tabela 10 revelaram efeito significativos apenas para o fator [PLANTA] (L) no teste de atividade antioxidante frente ao radical ABTS.

Tabela 10: Coeficiente de regressão para atividade antioxidante (ABTS).

Variáveis	Coeficiente da regressão	Erro padrão	Valor de p
[PLANTA] (L)	12,6818	1,0617	0,000001

Legenda: (L): fator linear

O modelo ajustado fornece uma representação da relação entre a concentração das folhas de *L. thymoides* e a resposta de inibição de ABTS, com uma alta capacidade explicativa ($R^2 = 0,94065$). Isto destaca a importância da concentração de planta como um fator determinante na variação de ABTS, enquanto a concentração inicial de inóculo não apresenta impacto significativo. Como o modelo é linear não tem ponto ótimo:

$$\text{ABTS} = 36,46 + 12,68 * [\text{PLANTA}] \quad (R^2 = 0,94065)$$

Onde:

ABTS = atividade antioxidante medida pelo método ABTS

[PLANTA] = concentração da planta (*L. thymoides*)

R^2 = coeficiente de determinação

A regressão, como observada na Tabela 11, apresentou um valor F calculado de 142,63, muito superior ao valor crítico da tabela ($F_{\text{tab}} = 5,12$), confirmando a significância estatística do modelo ($p < 0,000269$). A soma dos quadrados da regressão (QM) foi de 1286,403, explicando a maior parte da variabilidade total (SQ Total = 1367,57). Apesar disso, a análise de falta de ajuste (SQ = 80,48; $F = 33,258$; $p =$

0,029496) indicou alguma variabilidade não capturada pelo modelo, sugerindo a presença de fatores adicionais que podem influenciar a resposta. O erro puro foi mínimo ($SQ = 0,691$), evidenciando a boa repetibilidade dos experimentos. Em suma, a quantidade de *L. thymoides* é um determinante crucial para a resposta ABTS, embora a significância da falta de ajuste indique a necessidade de considerar outros fatores em futuras investigações.

Tabela 11: Análise de Variância (ANOVA) da variável ABTS para Modelo de Regressão: Significância Global e Avaliação de Ajuste

FV	GL	SQ	QM	Fcal
Regressão	1	1286,40	1286,4	142,63*
Resíduo	9	81,17	9,02	
FAJ	7	80,48		
Erro puro	2	0,691		
Total	10	1367,57		

Legenda: GL (Graus de Liberdade); SQ (Soma dos Quadrados); QM (Quadrado Médio) Fcal (Valor F calculado). $F_{tab}(1,9) = 5,12$: Como $F_{cal} > F_{tab}$ o modelo é significativo.

A análise gráfica da superfície de resposta ajustada para a variável ABTS (Figura 4), com base em um experimento com dois fatores e 11 execuções, fornece uma visualização clara da influência conjunta da concentração de folhas de *L. thymoides* ([PLANTA]) e da concentração inicial de inóculo ([MICRO]) na resposta ABTS. A superfície de resposta revela uma tendência linear marcante onde o aumento na quantidade de ([PLANTA]) resulta em um aumento significativo nos valores de ABTS, corroborando com os resultados estatísticos anteriores que destacaram a alta significância deste fator.

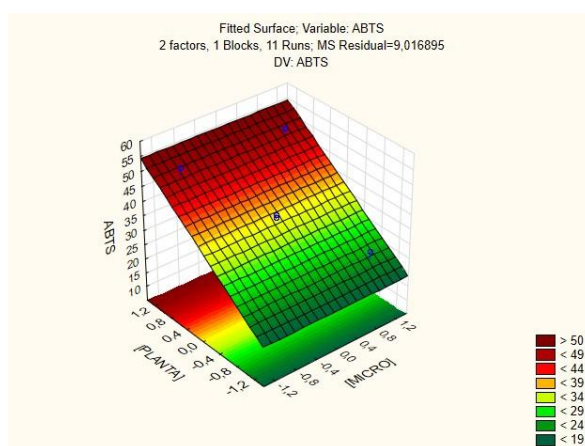


Figura 4: A análise gráfica da superfície de resposta ajustada para a variável ABTS.

Legenda: **Eixo X (PLANTA):** Representa a variável associada à planta utilizada no experimento; Os valores variam de aproximadamente -1,5 a 2,0; **Eixo Y (MICRO):** Representa a variável associada ao método de preparação ou uma outra variável operacional. Os valores variam de aproximadamente -1,4 a 1,4. **Eixo Z (DV: ABTS):** Representa a variável de resposta medida (% I DPPH), que indica a porcentagem de inibição do radical livre ABTS, uma medida da atividade antioxidante. Os valores variam de aproximadamente 10 a 60.

O gráfico mostra uma clara tendência ascendente na variável ABTS com o aumento da quantidade de folhas de *L. thymoides*. Isso está alinhado com o modelo ajustado, que sugere uma relação linear positiva e significativa entre a [PLANTA] e a resposta ABTS. A superfície de resposta é plana ao longo do eixo de [MICRO], indicando que variações na concentração inicial de inóculo não têm um impacto significativo na resposta ABTS. Isso está de acordo com os resultados estatísticos que não encontraram uma influência significativa desta variável. Não há evidências visuais de interação significativa entre [PLANTA] e [MICRO], visto que o efeito de [PLANTA] parece ser consistente independentemente do nível de [MICRO]. A superfície de resposta não apresenta curvaturas ou mudanças de inclinação que indicariam uma interação entre esses dois fatores.

O gráfico da superfície de resposta reforça a conclusão de que a concentração das folhas de *L. thymoides* é o fator determinante na variação da resposta ABTS. A alta significância estatística deste fator é visualmente confirmada pela tendência ascendente da superfície. Por outro lado, a concentração inicial de inóculo não mostra impacto significativo na resposta ABTS no intervalo experimental estudado, o que é consistente com as análises estatísticas. Estes achados sugerem que futuros estudos e aplicações práticas podem se concentrar predominantemente na otimização da concentração de *L. thymoides* para maximizar a resposta ABTS, enquanto a variação na concentração de inóculo pode ser considerada de menor importância.

Os resultados obtidos neste estudo com *Lippia thymoides* podem ser discutidos com base em pesquisas realizadas com chá de Kombuchá, especialmente no que se refere à atividade antioxidante. O estudo com Kombuchá revelou que, após 14 dias de fermentação, os valores de IC_{50} para os testes DPPH• e ABTS•⁺ foram de 14,57 µg/mL e 21,47 µg/mL, respectivamente, indicando uma forte capacidade antioxidante associada ao aumento de compostos fenólicos durante a fermentação (Mfopa et al., 2024). Esse comportamento é comparável ao observado com o extrato fermentado de *L. thymoides*, no qual a concentração da planta demonstrou ser o principal fator de influência sobre a resposta antioxidante no ensaio ABTS. No caso de *L. thymoides*, a maior concentração da planta resultou em um aumento significativo na atividade antioxidante, o que corrobora com o padrão observado no Kombuchá: quanto maior a disponibilidade de compostos fenólicos liberados durante a fermentação, maior a capacidade antioxidante do produto final.

3.2.1 Variável atividade antimicrobiana avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Como evidenciado na Tabela 12, a média de interação entre os fatores [PLANTA] e [MICRO] foi significativamente diferente de zero ($p < 0,05$), indicando que a influência conjunta dessas variáveis sobre a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* é relevante. Em termos de regressão, o coeficiente de interação representa como o efeito de um fator é modificado pelo nível do outro. Ou seja, o efeito da concentração de planta sobre a resposta não é constante, mas depende da quantidade de microrganismo presente, e vice-versa. Essa significância sugere que os fatores não atuam de maneira isolada: há uma potencialização ou modulação mútua que altera a atividade antimicrobiana observada. Portanto, a interpretação dos resultados deve considerar não apenas os efeitos principais de cada fator, mas também a interação, que evidencia a complexidade da resposta biológica e a necessidade de otimizar simultaneamente ambos os fatores para maximizar a eficácia antimicrobiana.

Tabela 12: Coeficiente de regressão para atividade antimicrobiana (CIM).

Variáveis	Coeficiente da regressão	Erro padrão	Valor de p
[PLANTA] (L)	-3,2191	0,5420	0,000576
[MICRO] (L)	1,1049	0,5420	0,080892
[MICRO] (Q)	1,4705	0,6167	0,048555

Legenda: (L): fator linear, (Q): fator quadrático

Como o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é inversamente proporcional à atividade antimicrobiana, ou seja, quanto menor o CIM, maior a potência do efeito, observou-se que o aumento na quantidade de folhas de *Lippia thymoides* resulta em uma redução significativa do valor de CIM ($p < 0,05$), indicando uma maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

A concentração linear de [MICRO] tem um efeito positivo no valor de CIM, mas não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$). O valor de p sugere que não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula de que esse efeito é não significativo. Como a concentração quadrática de [MICRO] tem um efeito positivo significativo no valor de CIM ($p < 0,05$), sugere que o efeito da [MICRO] não é linear e pode atingir um máximo em um determinado ponto.

Assim, os dados descritos na tabela 15 indicam que a interação entre a quantidade das folhas de *L. thymoides* ([PLANTA]) e a concentração de *L. rhamnosus* ([MICRO]) tem um efeito significativo na atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Além disso, a concentração quadrática de *L. rhamnosus* também influencia significativamente essa atividade, enquanto a concentração linear de *L. rhamnosus* não mostrou um efeito claro. Essas informações são cruciais para entender como as variáveis estudadas interagem e como podem ser otimizadas para maximizar a atividade antimicrobiana desejada.

O modelo de regressão utilizado para estimar a concentração de *L. rhamnosus* (CIM) em função da concentração das folhas de *L. thymoides* ([PLANTA]) é dado por:

$$\begin{aligned} \text{CIM} &= 7,17 - 3,21 * [\text{PLANTA}] + 1,10 * [\text{MICRO}] + 1,47 * [\text{MICRO}]^2 (R^2 \\ &= 0,86578) \end{aligned}$$

Onde:

CIM = atividade antimicrobiana (Concentração Inibitória Mínima)

[PLANTA] = concentração da planta (*L. thymoides*)

[MICRO] = Concentração de inoculo inicial (*L. rhamnosus*)

R^2 = coeficiente de determinação

O coeficiente associado à variável [PLANTA] é -3,21, indicando que o aumento na concentração das folhas de *L. thymoides* está associado a uma redução nos valores de CIM, ou seja, maior atividade antimicrobiana. Por outro lado, o coeficiente linear positivo de 1,10 para [MICRO] indica que o aumento na concentração de *L. rhamnosus* tende a elevar os valores de CIM, o que representa uma diminuição da atividade antimicrobiana. O coeficiente de determinação (R^2): 0,86578 indica que o modelo explica aproximadamente 86,58% da variabilidade observada na concentração de *L. rhamnosus*. Sendo assim, para encontrar o ponto ótimo, calculou-se a primeira derivada da equação em relação a [MICRO] e igualamos a zero:

$$\frac{d([\text{MICRO}])}{d(\text{CIM})} = 1,10 + 2 \times 1,47 \times [\text{MICRO}] = 0$$

Onde:

$d([\text{MICRO}])/d(\text{CIM})$ = derivada da concentração de [MICRO] em relação à concentração de CIM.

CIM = Concentração Inibitória Mínima

[planta] = concentração da planta (*L. thymoides*)

[MICRO] = Concentração de inoculo inicial (*L. rhamnosus*)

Esse valor de [MICRO] = -0,3761 é o Ponto Ótimo codificado e o valor [MICRO] decodificado foi de 3,46, ou seja, $10^{3,46}$ UFC/mL.

Como o erro puro = 0 não foi possível testar a falta de ajuste. Assim foi analisado com erro residual. Os resultados estão dispostos na Tabela 13 abaixo:

Tabela 13: ANOVA, análise da variância para a variável dependente CIM.

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)[PLANTA](L)	82,94	1	82,94	35,31	0,000575
(2)[MICRO](Q)	9,77	1	9,77	4,16	0,080842
[MICRO](Q)	13,37	1	13,37	5,69	0,048480
Error	16,44	7	2,35		
Total SS	122,51	10			

Legenda: [PLANTA]- concentração das folhas de *L.thymoides*; SS (Soma dos Quadrados); df (Graus de Liberdade); MS (Quadrado Médio); F (Razão F); p-valor.

A análise da Tabela 14 ANOVA revela que a concentração das folhas de *L. thymoides* ([PLANTA]) e a concentração quadrática de *L. rhamnosus* ([MICRO]) têm efeitos distintos na atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. A concentração das folhas de *L. thymoides* demonstrou um efeito altamente significativo, com um F de 35,31 e um p-valor muito baixo ($p = 0,000575$), indicando uma influência robusta na resposta estudada. Por outro lado, a concentração quadrática de *L. rhamnosus* apresentou dois componentes: um efeito significativo com um F de 5,69 e um p-valor de 0,048480, e outro componente com um efeito menos pronunciado ($F = 4,16$, $p = 0,080842$), sugerindo uma influência menos consistente. O erro residual foi baixo ($MS = 2,35$), o que indica que o modelo estatístico utilizado ajusta bem aos dados experimentais, capturando a maior parte da variabilidade observada. Em conjunto, esses resultados reforçam a importância da concentração das folhas de *L. thymoides* como um determinante significativo da atividade antimicrobiana, enquanto também destacam o papel variável da concentração de *L. rhamnosus*, dependendo de sua forma de apresentação.

A análise de variância (ANOVA) descrita na Tabela 17 revela que a regressão, que combina os efeitos dos fatores [PLANTA], [MICRO] e suas interações, é altamente significativa na explicação da variabilidade na atividade antimicrobiana. Com 3 graus de liberdade e um quadrado médio (QM) de 35,37, evidenciado por um valor F calculado ($F_{cal} = 15,05$) que indica uma forte relação entre as variáveis independentes e a resposta estudada, sendo estatisticamente significativo. O erro residual, representando a variabilidade não explicada pelo modelo, é relativamente baixo com um MS de 2,35, sugerindo que o modelo estatístico utilizado ajusta bem aos dados experimentais. A

presença de falta de ajuste (FAJ) e a ausência de erro puro (com uma SQ de 0) indicam áreas para refinamento do modelo, possivelmente requerendo ajustes adicionais para melhor capturar a variação nos dados.

Tabela 14: Análise de Variância (ANOVA) da variável CIM para Modelo de Regressão: Significância Global e Avaliação de Ajuste.

FV	GL	SQ	QM	Fcal
Regressão	3	106,07	35,36	15,05*
Resíduo	7	16,44	2,349	
FAJ	5	16,44		
Erro puro	2	0		
Total	10	122,51		

Legenda: FAJ (Falta de Ajuste); GL (Graus de Liberdade); SQ (Soma dos Quadrados); QM (Quadrado Médio) Fcal (Valor F calculado). $F_{tab}(3,7) = 4,35$: Como $F_{cal} > F_{tab}$ o modelo é significativo.

Em conjunto, esses resultados fornecem uma base robusta para entender como as concentrações de [PLANTA] e [MICRO] influenciam a atividade antimicrobiana estudada, destacando a importância da análise estatística na interpretação dos resultados experimentais.

A Figura 5 mostra uma superfície ajustada para a variável CIM (Concentração Inibitória Mínima), representando os efeitos combinados de duas variáveis independentes: [PLANTA] e [MICRO]. A análise considera 2 fatores, 1 bloco, 11 execuções, com um resíduo médio quadrático (MS Residual) de 2,35.

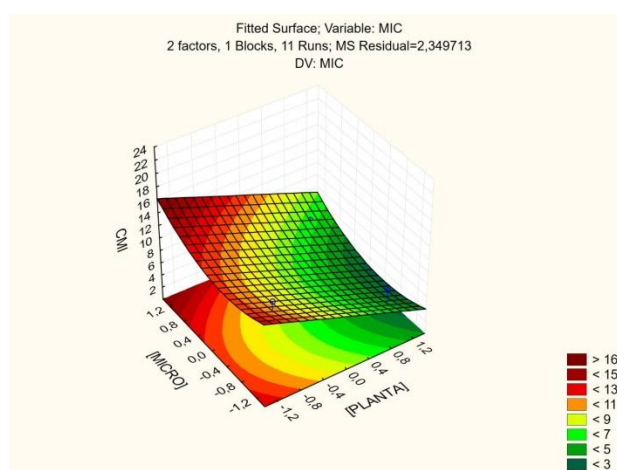


Figura 5: Análise da Superfície Ajustada CIM.

Legenda: Eixo X [PLANTA]: Representa a variável associada à concentração de planta utilizada no experimento; os valores variam de aproximadamente -1,5 a 2,0; Eixo Y [MICRO]: Representa a variável associada à concentração inicial de inóculo *L. rhamnosus*; os valores variam de aproximadamente -1,4 a 1,4; Eixo Z (DV: CIM): Representa a Concentração Inibitória Mínima (CIM), uma medida da atividade antimicrobiana. Os valores variam de aproximadamente 4 a 20. Superfície Ajustada: Mostra a interação entre as variáveis [PLANTA] e [MICRO] na resposta CIM. As áreas verdes indicam regiões de menor CIM, sugerindo maior eficácia antimicrobiana, enquanto as áreas vermelhas indicam regiões de maior

CIM. O modelo considera 2 fatores em 1 bloco, com 11 execuções, e um resíduo médio quadrático (MS Residual) de 2,35.

A CIM tende a diminuir com o aumento da [PLANTA] e esta tendência é especialmente notável no gráfico, onde as regiões de menor CIM (áreas verdes) estão associadas a valores mais altos de [PLANTA]. A CIM também é influenciada pela concentração inicial de inóculo ([MICRO]). A superfície mostra que, em concentrações mais baixas de [MICRO], a CIM é menor (regiões verdes), enquanto em concentrações mais altas de [MICRO], a CIM aumenta (áreas vermelhas e amarelas). A interação entre [PLANTA] e [MICRO] é evidente no gráfico. A combinação de altas concentrações de [PLANTA] com baixas concentrações de [MICRO] resulta na menor CIM, sugerindo que esta combinação é a mais eficaz para a atividade antimicrobiana. A superfície ajustada mostra uma curvatura significativa, indicando que a relação entre as variáveis e a resposta não é linear e que existe uma interação complexa entre [PLANTA] e [MICRO].

Esse padrão sugere que concentrações mais elevadas do extrato vegetal são mais eficazes na redução da atividade microbiana, o que está em concordância com os efeitos conhecidos dos compostos fenólicos presentes na planta. Esses compostos, como destacado por Trindade et al. (2021), têm a capacidade de romper as paredes celulares bacterianas e interferir nos processos metabólicos essenciais, levando à redução da viabilidade microbiana.

Outros estudos reforçam esse achado, Amenu (2014) e Sharma e Kalita (2024) observaram que a presença de probióticos em concentrações controladas pode potencializar os efeitos antimicrobianos de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos. Isso sugere que o controle da densidade microbiana inicial é essencial para otimizar o efeito dos extratos.

Além disso, essa relação sinérgica já foi identificada em outras plantas medicinais como *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, cujos extratos mostraram maior eficácia contra *Staphylococcus aureus* (Sharma; Kalita, 2024). De forma semelhante, *Equisetum arvense* e *Urtica dioica* também demonstraram dependência da concentração do inóculo para maximizar sua eficácia antimicrobiana (Kačániová et al., 2020).

Portanto, os resultados aqui apresentados estão em conformidade com a literatura científica, reforçando que a otimização da concentração de extratos vegetais e o controle da densidade microbiana são estratégias chave para potencializar a atividade antimicrobiana. A utilização de modelos preditivos como a superfície de resposta se

mostra, assim, uma ferramenta eficaz para guiar decisões em contextos laboratoriais e aplicados.

3.3 FERMENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS

Os resultados do DCCR definiram que a condição experimental a ser testada foi com a concentração de planta ([PLANTA]) (concentração das folhas de *L. thymoides*) ajustada para 3,0% e a concentração de microrganismo ([MICRO]) (concentração de *L. rhamnosus*) ajustada para $10^{3,5}$ UFC/mL. Esses valores foram escolhidos com base na otimização dos parâmetros para maximizar a eficácia das respostas medidas, incluindo a atividade antioxidante e antimicrobiana. A condição definida tem o objetivo de verificar a eficácia prevista pelo modelo estatístico nas atividades antioxidantes (DPPH e ABTS) e na atividade antimicrobiana (CIM). Este experimento adicional permitiu validar os resultados do modelo e confirmar se esses níveis de concentração proporcionam a resposta desejada nas condições reais do experimento. Os resultados dos experimentos em condição otimizada de fermentação estão descritos na tabela 18 abaixo:

Tabela 18: Ensaio do Ponto Ótimo.

Ensaio	[PLANTA] codificada	[MICRO]	[PLANTA]	[MICRO]	I%DPPH predito	I%DPPH exp	I%ABTS predito	I%ABTS exp	CIM Predito (%)	CIM Exp. (%)
Ponto ótimo	1,22	-0,38	2,86 (ajuste 3,0)	3,46 (ajuste 3,5)	85,16	85,15± 0,6	51,93	52,56± 0,6	3,04	3,125± 0

[PLANTA] – concentração de folhas secas de *Lippia thymoides*; [MICRO] – concentração de microrganismos *Lactocaseibacillus rhamnosus* (UFC/mL); I% – Percentual de inibição dos radicais (DPPH e ABTS); CIM – Concentração Inibitória Mínima, expressa em % (% do fermentado); DPPH diluição de 0,5% do fermentado (174 µg/mL de extrato seco) ABTS diluição de 5% do fermentado (1740 µg/mL de extrato seco); CIM 3,125% do fermentado (1087,5 µg /mL de extrato seco).

Desta maneira, a partir da análise e otimização dos dados experimentais, foram identificados os seguintes Pontos Ótimos para as variáveis de interesse: a inibição de DPPH apresentou um valor ótimo experimental de 85,15%, igual ao valor predito de 85,16%, enquanto a inibição de ABTS experimental alcançou 52,56%, também próximo a inibição predita de 51,93%. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentou um

Ponto Ótimo experimental de 3,125 % do fermentado, igualmente em concordância com o valor predito de 3,04 % do fermentado. Os valores preditos foram calculados a partir do modelo de regressão desenvolvido, que demonstrou elevada precisão na estimativa das respostas. Esses resultados indicam que a otimização dos parâmetros experimentais levou a um desempenho altamente satisfatório das respostas avaliadas, demonstrando a robustez e a confiabilidade do modelo. A elevada inibição de DPPH e ABTS confirma a expressiva capacidade antioxidante sob as condições experimentais estudadas, enquanto a proximidade entre os valores preditos e observados da CIM reforça a eficácia potencial antimicrobiana da combinação de variáveis testadas. Assim, os resultados validam a aplicação do modelo de regressão como uma ferramenta eficiente para a otimização de formulações com propriedades bioativas, embora, como discutido anteriormente, seja importante considerar a necessidade de ajustes em cenários mais extremos.

No ponto ótimo foram também TEAC (atividade antioxidante por equivalência a Trolox) nos dois ensaios de atividade antioxidante frente a DPPH e ABTS (Tabela 19), bem como a toxicidade foi determinada frente a *Artemia salina* Leach.

Tabela 19: Comparação da Atividade Antioxidante de *L. thymoides* em Ensaios DPPH e ABTS

Atividade Antioxidante	TEAC após fermentação ($\mu\text{mol/g}$)	TEAC sem fermentação ($\mu\text{mol/g}$)
DPPH	421 $\pm$ 7,2 ^a	406,2 $\pm$ 2,2 ^b
ABTS	154 $\pm$ 5,7 ^a	139,9 $\pm$ 1,46 ^b

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem na mesma linha. (ANOVA $p < 0,05$)

Quando se analisa a capacidade antioxidante expressa como equivalentes de Trolox (TEAC), observa-se um incremento após a fermentação em ambos os métodos. No teste DPPH, o valor de TEAC passou de 406,2 $\pm$ 2,2 $\mu\text{mol/g}$ (sem fermentação) para 421 $\pm$ 2,9 $\mu\text{mol/g}$ (com fermentação), evidenciando uma melhora na capacidade de neutralizar radicais livres em comparação ao padrão Trolox. Esse aumento, ainda que modesto, indica uma intensificação na atividade antioxidante promovida pelo processo fermentativo. De forma mais expressiva, no método ABTS, o valor de TEAC aumentou de 139,9 $\pm$ 1,46 $\mu\text{mol/g}$ (sem fermentação) para 154 $\pm$ 5,7 $\mu\text{mol/g}$ (com fermentação), reforçando o potencial da fermentação em ampliar a capacidade antioxidante dos extratos de *L. thymoides*.

As diferenças de desempenho entre os métodos DPPH e ABTS podem ser atribuídas às especificidades químicas dos radicais utilizados em cada ensaio e à

polaridade dos compostos antioxidantes extraídos. O DPPH tende a interagir preferencialmente com compostos polares, enquanto o ABTS permite a detecção de antioxidantes tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (Venskutonis et al., 2005; Sanna et al., 2012). Assim, a elevação nos valores de TEAC nos dois métodos indica que a fermentação atuou positivamente na composição do extrato, favorecendo tanto compostos polares quanto mais apolares com potencial antioxidante.

O ensaio DPPH é mais específico para compostos hidrofílicos, como os fenólicos presentes em extratos aquosos (Flieger; Flieger, 2020; Sanna et al., 2012), o que justifica seu melhor desempenho neste estudo. Por outro lado, o método ABTS é mais abrangente, sendo capaz de detectar tanto antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos (Gaber et al., 2021; Ilyasov et al., 2020). No entanto, um aspecto que pode influenciar a resposta do método ABTS é a formação de adutos, que são produtos resultantes da ligação química entre o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ e certos compostos fenólicos. Esses adutos podem alterar a intensidade da mudança de cor medida no ensaio, levando à subestimação ou superestimação da atividade antioxidante real (Ilyasov et al., 2020).

Além disso, outros fatores como o tipo e a quantidade dos compostos antioxidantes presentes, o método e as condições de extração (como o uso de água como solvente) e possíveis reações secundárias ou interferentes também impactam os resultados (El Riachy et al., 2011; Ou et al., 2012; Koşar et al., 2003). Portanto, apesar do melhor desempenho observado no DPPH (esperado pela natureza hidrofílica do extrato), a utilização dos dois métodos fornece uma visão mais completa da capacidade antioxidante do extrato de *Lippia thymoides*, especialmente em formulações fermentadas, onde diferentes tipos de compostos antioxidantes podem estar presentes.

Outros estudos também demonstraram valores de CE_{50} (0,33 mg/mL) para DPPH menores em comparação aos obtidos frente a ABTS (CE_{50} 2,35 mg/mL), como na fermentação de *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) (Kuo et al., 2021).

A diferença nos resultados entre os métodos DPPH e ABTS também ressalta a necessidade de realizar ensaios antioxidantes complementares para avaliar o potencial completo de um extrato vegetal. Sabe-se que ambos os métodos podem ser influenciados pelos coeficientes de extinção de compostos coloridos presentes no extrato, que podem afetar a precisão das medições espectrofotométricas (Olszowy; Dawidowicz, 2018). Apesar dessas limitações, os ensaios são ferramentas valiosas na

pesquisa de antioxidantes, com sua escolha dependendo dos requisitos específicos do estudo e da natureza da amostra que está sendo analisada.

Ao comparar com outros estudos de plantas fermentadas, verificou-se também que a fermentação pode aumentar a atividade antioxidante. A fermentação com *Lactobacillus plantarum* aumentou significativamente a atividade antioxidante das folhas de graviola e noni. O valor CE_{50} diminuiu substancialmente após a fermentação. Para o pó de folha de graviola, o valor de CE_{50} caiu de 6,41 mg/mL para 0,034 mg/mL, indicando uma atividade antioxidante muito forte após a fermentação (Putri et al., 2022).

Quando comparado a outras espécies de *Lippia* com a *L. alba* pode-se observar relevância ao analisar as propriedades específicas de cada espécie vegetal, considerando tanto os métodos de avaliação quanto os compostos bioativos presentes. No método DPPH, *L. thymoides* apresentou uma atividade antioxidante significativamente superior ($421 \pm 2,9 \mu\text{mol TEAC/g}$) em relação ao extrato de *L. alba* obtido por micro-ondas ($144,16 \mu\text{mol ET/g}$). Este resultado indica uma maior capacidade de neutralização dos radicais DPPH por *L. thymoides*, possivelmente associada a uma concentração mais elevada de compostos fenólicos ou a compostos específicos mais eficientes na interação com os radicais DPPH. Por outro lado, no método ABTS, os valores obtidos foram mais próximos, com *L. alba* apresentando um nível de superioridade ($161,68 \mu\text{mol TEAC/g}$) em relação a *L. thymoides* ($154 \pm 5,7 \mu\text{mol TEAC/g}$). Este dado sugere que os compostos antioxidantes presentes em *L. alba* apresentam maior eficácia em condições simuladas pelo método DPPH, ou que o método utilizado foi mais eficaz na extração de compostos lipofílicos (Jesus, 2022).

A estrutura molecular desempenha um papel central no potencial antioxidante. Compostos ricos em grupos hidroxila (OH), como os polifenóis, apresentam maior capacidade de transferência de elétrons durante a neutralização de radicais livres. A presença de múltiplos grupos OH, bem como a capacidade de formação de quinonas após a oxidação, intensifica a atividade. O alto valor da atividade antioxidante no DPPH sugere que os compostos presentes no extrato de *L. thymoides* possuem características estruturais projetadas para doação de elétrons em sistemas polares. Por outro lado, o menor desempenho no ensaio ABTS pode estar associado à polaridade dos compostos antioxidantes e às condições do meio reacional. A solubilidade dos compostos no solvente utilizado, bem como o pH, afeta diretamente a taxa de oxidação e a extensão de reações secundárias (Abramović et al., 2018).

A utilização do Trolox como padrão nos ensaios reforça a confiabilidade dos dados obtidos, permitindo comparações diretas entre diferentes sistemas antioxidantes. Contudo, as diferenças observadas entre os ensaios DPPH e ABTS para *L. thymoides* demonstram que o potencial antioxidante é altamente dependente das condições do experimento e da natureza química dos compostos envolvidos.

Os resultados do teste de toxicidade utilizando *Artemia* indicam que tanto o chá quanto o fermentado apresentaram efeitos tóxicos, com valores de concentração letal média (CL₅₀) de 76,67 µg/mL para o chá e 229,26 µg/mL para o fermentado. A CL₅₀ representa a concentração necessária para causar a morte de 50% dos organismos expostos, sendo um parâmetro crucial para a avaliação da toxicidade da substância.

O chá apresentou um valor de CL₅₀ relativamente baixo, o que sugere uma toxicidade mais intensa para os organismos testados. Esse valor indica que o chá pode exercer efeitos letais em concentrações mais baixas, possivelmente devido à presença de compostos ativos que afetarão rapidamente a previsão da *Artemia*. Esses resultados sugerem que, em concentrações elevadas, o chá pode representar um risco significativo para os organismos aquáticos, implicando a necessidade de realizar outros testes de citotoxicidade.

Em contraste, o fermentado declarou um valor de CL₅₀ mais elevado, proporcionando menor toxicidade para *Artemia* em comparação com o chá. A maior CL₅₀ sugere que o efeito tóxico foi reduzido após a fermentação, pois concentrações mais altas foram necessárias para alcançar uma taxa de mortalidade semelhante à observada para o chá. Esse comportamento pode ser atribuído a alterações na composição química da substância durante o processo de fermentação, que podem ter diminuído a toxicidade de seus compostos. Foi demonstrado que os processos de fermentação alteram a composição química dos extratos vegetais, reduzindo potencialmente sua toxicidade. Isso é conseguido por meio da biotransformação de compostos ativos em metabólitos menos nocivos. Por exemplo, a fermentação da *Inula britannica* com *Lactobacillus plantarum* SY12 resultou em maior concentração de galato de epigallocatequina e redução de compostos tóxicos como o ácido 1-O-cafeoilquínico, aumentando a viabilidade celular e reduzindo a toxicidade em linhagens HepG2 (Bae et al., 2023).

De forma semelhante, o chá fermentado conhecido como kombuchá apresentou baixos valores de CL₅₀ em ensaios com *Artemia salina*, sugerindo sua segurança para o consumo (Quiao-Won; Teves, 2018). Esses exemplos reforçam a hipótese de que a

fermentação pode ser uma abordagem eficaz para produzir extratos vegetais com menor toxicidade.

Alterações nos constituintes químicos são comuns durante a fermentação. No caso de chás fermentados, observa-se frequentemente uma redução de compostos como taninos, catequinas e clorofila, ao mesmo tempo em que há aumento de compostos como epicatequina e epigallocatequina, que podem apresentar menor toxicidade ou maior atividade antioxidante (Han et al., 2010). A fermentação de *Withania somnifera*, por exemplo, resultou em maior concentração de compostos bioativos e em maior atividade antioxidante, demonstrando o potencial da fermentação em enriquecer extratos vegetais com compostos benéficos (Yu et al., 2022).

Além disso, produtos fermentados como o *cheonggukjang* (soja fermentada com *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus sakei*) não apresentaram toxicidade significativa em modelos animais, reforçando a segurança de produtos submetidos à fermentação controlada (Lee et al., 2014). De forma semelhante, o arroz não polido fermentado com bactérias do ácido lático demonstrou alto valor nutricional e ausência de toxicidade, apontando para a eficácia da fermentação na melhoria da qualidade funcional dos alimentos (Kumagai et al., 2005).

Embora a fermentação geralmente reduza a toxicidade, é importante destacar que, em alguns casos, pode ocorrer o oposto, com a produção de metabólitos indesejáveis por micro-organismos. No entanto, nos estudos revisados, os processos fermentativos foram cuidadosamente controlados, não resultando em aumento da toxicidade. Isso reforça a importância do controle das condições de fermentação para garantir a segurança e eficácia dos produtos obtidos.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que *Lippia thymoides* apresenta alto potencial antioxidante e antimicrobiano, sendo promissora para formulações cosméticas. A cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* foi identificada como a mais eficaz para a fermentação, com destaque para sua performance nos testes de atividade antioxidante, especialmente pelo método DPPH. A concentração inicial ideal foi determinada em 10^4 UFC, e o tempo ótimo de fermentação foi de 24 horas, promovendo a maior taxa de inibição de radicais livres.

A aplicação do modelo de otimização desenvolvido para a formulação fermentada foi bem-sucedida e altamente eficaz. A condição experimental ideal, 3,0% de extrato vegetal e $10^{3,5}$ UFC/mL do microrganismo, permitiu alcançar respostas experimentais muito próximas às previstas pelo modelo estatístico, demonstrando sua confiabilidade.

A atividade antioxidante da formulação otimizada foi elevada, com destaque para o ensaio DPPH, que atingiu 85,15% de inibição (valor predito: 85,16%). No ensaio ABTS, a inibição também foi significativa (52,56% experimental vs. 51,93% predito). Os valores de TEAC confirmaram que a fermentação favoreceu a liberação ou formação de compostos fenólicos hidrossolúveis com maior potencial antioxidante.

A atividade antimicrobiana, avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), também foi consistente com o modelo, com o valor experimental de 3,125% próximo ao previsto (3,04%), reforçando a eficácia da formulação em contextos onde a ação microbicida é desejável, como nos setores cosmético, alimentício e agrícola.

Na análise toxicológica com *Artemia salina*, tanto o chá quanto o extrato fermentado apresentaram toxicidade, porém com CL_{50} mais elevada para o fermentado (229,26 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo atenuação da toxicidade pelo processo fermentativo. Esses achados indicam que a fermentação pode ser uma estratégia eficaz não apenas para ampliar a atividade antioxidante, mas também para reduzir efeitos adversos associados a compostos naturais.

Os achados reforçam a viabilidade do uso de *L. rhamnosus* como agente fermentador e evidenciam o papel da biotransformação na geração de extratos vegetais mais seguros e funcionalmente ativos. Mais importante ainda, os resultados demonstram o potencial dos fermentados como ingredientes inovadores para a indústria cosmética,

abrindo caminho para o desenvolvimento de ativos naturais com dupla funcionalidade: antioxidante e antimicrobiana.

Como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de estudos adicionais para: caracterizar os compostos bioativos específicos liberados durante a fermentação; otimizar formulações cosméticas incorporando os fermentados de forma estável e eficaz, e avaliar a eficácia e segurança em modelos cutâneos ou testes clínicos preliminares. Esses próximos passos permitirão transformar o conhecimento gerado nesta tese em ativos cosméticos inovadores e aplicáveis, conectando a pesquisa fundamental ao desenvolvimento de produtos de alto valor agregado para o mercado.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVIČ, HELENA; GROBIN, BLAŽ; POKLAR ULRIH, NATAŠA; CIGIĆ, BLAŽ. **Relevance and standardization of *in vitro* antioxidant assays: ABTS, DPPH, and FOLIN–CIOCALTEU.** *Journal of chemistry*, V. 2018, P. 1–9, 2018. DOI: 10.1155/2018/4608405.

AJI, A. P.; WIKANDARI, P. R. **Antioxidant Potential of Jicama (*Pachyrhizus erosus*) Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* B1765.** *Jurnal Pijar Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.29303/jpm.v19i1.6218>. Acesso em: 18 ago. 2025.

AMENU, D. **Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens.** *American Journal of Ethnomedicine*, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 18-29, 2014. Disponível em: <http://ajethno.com/index.php/AJETHNO/article/view/5>. Acesso em: 1 maio 2025.

BAE, W.; LEE, D.-U.; YU, H.-S.; LEE, N.-K.; PAIK, H.-D. **Fermentation of *Inula britannica* using *Lactobacillus plantarum* SY12 increases epigallocatechin gallate and attenuates toxicity.** *Social Science Research Network*, v. 429, p. 136844, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4349045>. Acesso em: 28 abr. 2025.

BAUTISTA-HERNÁNDEZ, I.; GÓMEZ-GARCÍA, R.; AGUILAR, C. N.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G.; TORRES-LEÓN, C.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L. **Solid-state fermentation for phenolic compounds recovery from Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) residual leaves applying a lactic acid bacteria (*Leuconostoc mesenteroides*).** *Agriculture*, v. 14, n. 8, p. 1342, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture14081342>. Acesso em: 20 abr. 2025.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building.** *New York: John Wiley & Sons*, 1978.

CEDILLO-OLIVOS, A. E.; JUÁREZ-CHAÍREZ, M. F.; CID-GALLEGOS, M. S.; SÁNCHEZ-CHINO, X. M.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C. **Natural preservatives used in foods: a review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1-17, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2403000>. Acesso em: 21 maio 2025.

CHENG, C.; LI, X.; SONG, H.; FANG, W. **Can natural preservatives serve as a new line of protective technology against bacterial pathogens in meat and meat products?** *Food Quality and Safety*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyad049>. Acesso em: 21 maio 2025.

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B. de; BRITO, E. H. S. de; FONTENELLE, R. O. dos S. **Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae).** v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>. Acesso em: 21 maio 2025.

CLSI. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A10, 10 ed., Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute;** 2015.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute;** 2016.

DELESA, D. A. **Traditional medicinal plants for industrial application as natural food preservatives.** *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.26655/IJABBR.2018.1.1>. Acesso em: 21 maio 2025.

DEY, T. B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K. KR.; SHARMA, A.; KUHAD, R. C. **Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review.** *Trends in Food Science and Technology*, v. 53, p. 60–74, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.007>. Acesso em: 28 abr. 2025.

DHANANA, KARLINA AYU PUTRI; NOCIANITRI, KOMANG AYU; DUNIAJI, AGUS SELAMET. **Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Karakteristik Soyghurt Drink com Penambahan Lactobacillus rhamnosus SKG 34 . ITEPA: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan** , 2021. DOI: 10.24843/itepa.2021.v10.i04.p10.

DING, L.; GUO, H.; YANG, W.-q.; LUO, X.-b.; ZANG, C.-g.; LIU, Y. C.; ZHANG, J.; GUAN, H. **Isolation for antioxidant activity of metabolites of Lactobacillus sp. A-2.** *Preprint*, Qiqihar Medical University, 2023. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2303368/v1.

DONG-MEI, LIU; HUI, WU; LI, LI; SHI-ZHONG, LIANG. **Antimicrobial Activity of Lactobacillus casei rhamnosus and Optimization of Its Fermentation Conditions for Optimal Inhibitory Effects.** *Food Science*, v. 29, n. 6, p. 237-, 2008.

DOU, JIAXIN; FENG, N.; GUO, FANGYU; CHEN, ZOUQUAN; LIANG, JIE; WANG, TING; GUO, XUEPING; XU, ZHENSHANG. **Applications of probiotic constituents in cosmetics.** *Molecules*, 2023. DOI: 10.3390/molecules28196765.

DUARTE, M.; CARVALHO, M. J.; CARVALHO, N. M.; AZEVEDO-SILVA, J.; MENDES, A.; RIBEIRO, I. P.; FERNANDES, J. C.; OLIVEIRA, A. L. S.; OLIVEIRA, C.; PINTADO, M.; AMARO, A.; MADUREIRA, A. R. **Skincare potential of a sustainable postbiotic extract produced through sugarcane straw fermentation by Saccharomyces cerevisiae.** *BioFactors*, v. 49, n. 5, p. 1038–1060, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.1975>. Acesso em: 28 abr. 2025.

EL RIACHY, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LEÓN, L.; RALLO, L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 6, p. 678–691, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000400>. Acesso em: 2 maio 2025.

FADLILLAH, HENDRY NOER; NURAIDA, LILIS; SITANGGANG, AZIS BOING; PALUPI, NURHENI SRI. **Production of antioxidants through lactic acid**

fermentation: current developments and outlook. *The Annals of the University Dunarea De Jos of Galati. Fascicle VI - Food Technology*, v. 45, n. 2, p. 203-228, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2021.2.13>. Acesso em: 13 ago. 2025.

FLIEGER, J.; FLIEGER, M. **The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD method on tracking the antioxidant activity of pure antioxidants and goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) hydroalcoholic extracts.** *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 6005, 2020.

FU, M.; ZHOU, B.; ZHU, X. **Method for preparing green preservative by bamboo fungus liquid fermentation.** 2014.

GABER, N. B.; EL-DAHY, S. I.; SHALABY, E. A. **Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues.** *Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01386-0>. Acesso em: 2 maio 2025.

GALIA, M. A.; GUNADI, R.; FITRIANI, A.; SUPRIYADI, S. **The improvement of phenolic contents, antioxidant activity, and the appearance of black tea extract by combination viscozyme and tyrosinase addition.** *Trends in Sciences*, v. 22, n. 2, p. 8656, 2025. DOI: <https://doi.org/10.48048/tis.2025.8656>.

GEBREEL, YOUSSEF ALIA. **Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Physicochemical Properties, Functional Compounds and Antioxidant Activity of Edible Grass.** *Fermentation*, 2022. doi: 10.3390/fermentation8110647.

GEETHA, V. **Natural preservation development in the pharmaceutical industry.** *International Journal for Multidisciplinary Research*, v. 7, n. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2025.v07i01.35347>. Acesso em: 28 abr. 2025.

HAN, S.-K.; SONG, Y.-S.; LEE, J.-S.; BANG, J.-K.; SUH, S.-J.; CHO, J.-Y.; MOON, J.-H.; PARK, K.-H. **Changes of the chemical constituents and antioxidant activity during microbial-fermented tea (*Camellia sinensis* L.) processing.** *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 42, n. 1, p. 21–26, 2010. Disponível em: http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=SPGHB5_2010_v42n1_21. Acesso em: 28 abr. 2025.

HU, Y.; ZHAO, Y.; JIA, X.; LIU, D.; HUANG, X.; WANG, C.; ZHU, Y.; YUE, C.; DENG, S.; LYU, Y. **Lactic acid bacteria with strong antioxidant function isolated from Jiangshu, pickles, and feces.** *Frontiers in Microbiology, Food Microbiology Section*, v. 14, p. 1163662, May 23, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1163662.

HUYNH, N. T.; CAMP, J. V.; SMAGGHE, G.; RAES, K. **Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: A review.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 11, p. 19369–19388, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms151119369>. Acesso em: 02 abr. 2025.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. P. **ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways.**

International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 3, p. 1131, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>. Acesso em: 2 maio 2025.

JAFARPOUR, DORNOUSH; HASHEMI, SEYED, MOHAMMAD, BAGHER. **Pure and Co-Fermentation of Quinoa Seeds by *Limosilactobacillus fermentum* and *Lactocaseibacillus rhamnosus*: Bioactive Content, Antidiabetic and Antioxidant Activities.** *Fermentation*, v. 9, n. 2, p. 80-80, 2023. doi: 10.3390/fermentation9020080.

JESUS, RAPHAEL AMANCIO DE. **Otimização de extração por ultrassom e micro-ondas de compostos fenólicos das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Lantana camara* Linn.** 2022. 213 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2022.

KAČÁNIOVÁ, M.; ŽIAROVSKÁ, J.; KUNOVÁ, S.; ROVNÁ, K.; SAVITSKAYA, T.; HRINSHPAN, D.; VALKOVÁ, V.; GALOVIČOVÁ, L.; BOROTOVÁ, P.; IVANIŠOVÁ, E. **Antimicrobial potential of different medicinal plants against food industry pathogens.** v. 14, p. 494-500, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5219/1387>. Acesso em: 15 jul. 2024.

KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P. **Lactic acid bacteria: The bugs of the new millennium.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 565-570, 2007. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.009.

KOŠAR, M. et al. **An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of Lamiaceae plants.** *Chemistry of Natural Compounds*, v. 39, n. 2, p. 161–166, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1024853628326>. Acesso em: 2 maio 2025.

KUMAGAI, TAKEHISA; SENO, Kimiko. **Produto fermentado de arroz integral, método para produzi-lo, bebida e alimento contendo o mesmo, método para produzir arroz integral fermentado e germinado e o arroz integral fermentado e germinado.** Patente japonesa JP 2006-325576, 2005. Disponível em: <https://europepmc.org/patents/PAT/JP2006325576>. Acesso em: 28 abr. 2025.

KUO, HSING-CHUN; KWONG, HO KI; CHEN, HUNG-YUEH; HSU, HSIEN-YI; YU, SHU-HAN; HSIEH, CHANG-WEI; LIN, HUI-WEN; CHU, YUNG LIN; CHENG, KUAN-CHEN. **Enhanced antioxidant activity of *Chenopodium formosanum* Koidz. by lactic acid bacteria: Optimization of fermentation conditions.** *PLOS ONE*, v. 16, n. 5, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0249250.

LEE, Y. J.; KIM, J. E.; KWAK, M.-H.; GO, J.; SON, H.-J.; KIM, D.-S.; KANG, B.-C.; LEE, H.; HWANG, D. Y. **Toxicity of fermented soybean product (cheonggukjang) manufactured by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 on liver and kidney of ICR mice.** *Laboratory Animal Research*, v. 30, n. 2, p. 54-63, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.2.54>. Acesso em: 28 abr. 2025.

LIANG, Z.; HUANG, Y.; ZHANG, P.; FANG, Z. **Impact of fermentation on the structure and antioxidant activity of selective phenolic compounds.** *Food Bioscience*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103147>. Acesso em: 28 abr. 2025.

MAJCHRZAK, W.; MOTYL, I.; ŚMIGIELSKI, K. **Biological and cosmetical importance of fermented raw materials: an overview.** *Molecules*, v. 27, n. 15, p. 4845, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27154845>. Acesso em: 21 maio 2025.

MAKHAMRUEANG, N.; RAIWA, A.; JIARANA KULWANITCH, J.; KAEWARSAR, E.; BUTRUNGROD, W.; SIRILUN, S. **Beneficial bio-extract of *Camellia sinensis* var. assamica fermented with a combination of probiotics as a potential ingredient for skin care.** *Cosmetics*, v. 10, n. 3, p. 85, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10030085>. Acesso em: 28 abr. 2025.

MEYER B. N, Ferrigni N. R, Putnam J. E, Jacobsen L. B, Nichols D. E, McLaughlin J.L. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents.** *Planta Medica* v. 45, p. 31-34, 1982.

MFOPA, ALVINE NGOUTANE; KEMZEU, RAOUL; FOKOM, RAYMOND; YAMTHE, LAUVE RACHEL T.; DIZE, DARLINE; BOYOM, FABRICE FEKAM. **Compostos fenólicos, atividades antioxidante e antileishmania da kombucha em função do tempo de fermentação.** *PLOS ONE*, [S. l.], v. 10, n. 22, p, 2024.

OLSZOWY, MAŁGORZATA; DAWIDOWICZ, ANDRZEJ L. **Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds.** *Chemical Papers*, v. 72, n. 2, p. 393-400, 2018. doi: 10.1007/S11696-017-0288-3.

OU, Z.-Q.; SCHMIERER, D. M.; RADES, T.; LARSEN, L.; McDOWELL, A. **Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 2, p. 271–279, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01591.x>. Acesso em: 2 maio 2025.

PIŞKIN, KULAKSIZ, B.; SEYHAN, G. V. **Natural Preservatives.** *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 184-192, 20 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.53811/ijtcmr.987607>. Acesso em: 30 abr. 2025.

PONNAMMA, M. M. **Applications of fermentation technology in biotechnology: from food to pharmaceuticals.** p. 52–69, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.58532/v3bjbt16p1ch3>. Acesso em: 28 abr. 2025.

PUSPITASARI, M.; RIYANTI, S. **Pengaruh metode fermentasi terhadap peningkatan kandungan kimia dan aktivitas farmakologi pada beberapa tanaman: Artikel review.** *Jurnal Buana Farma*, v. 4, n. 3, p. 322-333, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.36805/jbf.v4i3.1138>. Acesso em: 21 maio 2024.

PUTRI, DAYU NIRWANA; WIDYARTI, SRI; JATMIKO, YOGA DWI. **Increasing antioxidant activity of soursop (*Annona muricata* L.) and noni (*Morinda citrifolia* L.) leaves fermented by *Lactobacillus plantarum* BP102.** *Journal of Biological Researches*, v. 27, n. 2, p. 73-77, 2022. doi: 10.23869/bphjbr.27.2.20223.

QUIAO-WON, M. E.; TEVES, F. G. **Characteristics of kombucha fermentation from different substrates and cytotoxicity of tea broth.** *Sustainable Food Production*, v. 4, p. 11–19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/sfp.4.11>. Acesso em: 28 abr. 2025.

RATHEE, P., SEHRAWAT, R., RATHEE, P., KHATKAR, A., AKKOL, E. K., KHATKAR, S., REDHU, N., & TÜRKCANOĞLU, G. (2023). **Polyphenols: Natural Preservatives with Promising Applications in Food, Cosmetics and Pharma Industries; Problems and Toxicity Associated with Synthetic Preservatives; Impact of Misleading Advertisements; Recent Trends in Preservation and Legislation.** *Materials*, 16(13), 4793. <https://doi.org/10.3390/ma16134793>.

SANNA, D.; DELOGU, G.; MULAS, M.; SCHIRRA, M.; FADDA, A. **Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: An EPR and UV–Vis study.** *Food Analytical Methods*, v. 5, n. 4, p. 759–766, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9306-1>. Acesso em: 28 abr. 2025.

SHARMA, V.; KALITA, R. **Antibacterial activity of medicinal plants and the impact of isolated bioactive compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Anti-Infective Agents*, [S. l.], v. 23, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0122113525320352240812073441>. Acesso em: 15 jul. 2024.

SOUSA, I. J.; ARAÚJO, S. de; NEGREIROS, P. dos S.; FRANÇA, A. R. de S.; ROSA, G. da S.; NEGREIROS, F. D. S.; GONÇALVES, R. L. **A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde.** v. 31, n. 1, 2017. Disponível em: <http://ec2-34-233-57-254.compute-1.amazonaws.com/index.php/uningareviews/article/download/2048/1640>. Acesso em: 20 maio 2025.

TIZZANO, J. R. **Food preservatives from microbial origin: industrial perspectives.** p. 81-106, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119901198.ch4>. Acesso em: 21 maio 2025.

TREVISAN, M. T. S.; MARQUES, R. A.; SILVA, M. G. de V.; SCHERER, D.; HAUBNER, R.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. **Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity.** *Records of Natural Products*, v. 10, n. 4, p. 485-496, 2016. Disponível em: <https://www.acgpubs.org/RNP/2016/Volume10/Issue%201/58-RNP-1504-073-SI.pdf>. Acesso em: 21 maio 2025.

TRINDADE, S. C.; PEREIRA-FILHO, J. N.; BARRETO NETO, L. O.; MOURA, T. B. de O.; FARIAS, A. P. F. de; ROCHA FILHO, J. T. R.; SANTOS, R. P. B.; MAGALHÃES, A. O.; SANTOS-LIMA, E. K. N. dos; CARVALHO-FILHO, P. C. de; VALE, V. L. C.; LUCCHESI, A. M. **Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*.** *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.1805>. Acesso em: 28 abr. 2025.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. A.; PORTELA, M. R.; OLIVEIRA, F. F. **Avaliação de faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao Lauril Sulfato de Sódio.** Rio de Janeiro: PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER, 1989. 64 p. il. (Projeto 04.05.27).

VENSKUTONIS, P. R.; TIRZITE, D.; TIRZITIS, G. Assessment of antioxidant activity of plant extracts by different methods. *677*, p. 99–107, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.677.13>. Acesso em: 28 abr. 2025.

WANG, M. et al. **Research on the development and biological activity of an antioxidant compound fruit and vegetable ferment.** In: CONFERÊNCIA, , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/5.0000428>. Acesso em: 30 abr. 2025.

WANG, YU-HUA; GAO, JING; CHEN, PING; WANG, DAN. **Antioxidant activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains' constituents.** *Food Science and Technology*, n. 09, 2011. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2011.09.038. Disponível em: <https://doi.org/10.13684/j.cnki.spkj.2011.09.038>. Acesso em: 13 ago. 2025.

XAVIER, L. D. et al. **Extraction of phenolic compounds from apple pomace, process modeling and antioxidant potential evaluation of extracts.** *International Journal of Food Engineering*, v. 18, n. 7, p. 547–558, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2022-0012>.

YADAV, B.; PANDIT, D.; BANJADE, D.; MEHATA, D. K.; BHATTARAI, S.; BHANDARI, S.; GHIMIRE, N. P.; YADAV, P.; PAUDEL, P. **Insights into the germplasm conservation and utilization: Implications for sustainable agriculture and future crop improvement.** *Archives of Agriculture and Environmental Science*, v. 9, n. 1, p. 180-193, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.26832/24566632.2024.0901026>. Acesso em: 30 maio 2025.

YARMOLINSKY, L.; NAKONECHNY, F.; HADDIS, T.; KHALFIN, B.; DAHAN, A.; BEN-SHABAT, S. **Natural antimicrobial compounds as promising preservatives: a look at an old problem from new perspectives.** *Molecules*, v. 29, n. 24, p. 5830, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29245830>. Acesso em: 21 maio 2025.

YU, J.; GENG, Y.-F.; XIA, H.; MA, D.-Y.; LIU, C.; WU, R.; WU, J.; YOU, S.; BI, Y. **LAB fermentation improves production of bioactive compounds and antioxidant activity of *Withania somnifera* extract and its metabolic signatures as revealed by LC-MS/MS.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 4, p. 473-483, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.2111.11018>. Acesso em: 28 abr. 2025.

ZHANG, J.; HUANG, X.; CHENG, J. H.; WANG, C. **Effect of fermentation by *Lactobacillus* (L. acidophilus NCIB1899, L. casei CRL 431, L. paracasei LP33) on free and bound polyphenolic activities and antioxidant properties in three cultivars of *Chenopodium quinoa*.** *Food Science Review*, v. 88, n. 6, p. 2679-2692, June 2023. DOI: 10.1111/1750-3841.16604.

ZHANG, XIAOLING; QIN, MIAO; PAN, CHENGXUE; YIN, JIA; WANG, LE-LE; QU, LIN; YIN, YULONG; WEI, YONGJUN. **Research advances in probiotic fermentation of Chinese herbal medicines.** *iMeta*, 2023. DOI: 10.1002/imt2.93.

ZHANG, P.; ZHANG, J.; LI, L.; GU, T.; CHEN, S.; WANG, J.; GAO, M. **The Release of Bound Phenolics to Enhance the Antioxidant Activity of Cornmeal by Liquid Fermentation with *Bacillus subtilis*.** *Foods* 2025, 14, 499. <https://doi.org/10.3390/foods14030499>

ZHOU, Y. et al. **Probiotic evaluation and antioxidant characterization of *Lactobacillus plantarum* GXL94 isolated from fermented pepper.** *Frontiers in Microbiology*, Food Microbiology Section, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.997940.

CAPÍTULO 2- EXTRAÇÃO VERDE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER UTILIZANDO SOLVENTES SUPRAMOLECULARES: INOVAÇÃO SUSTENTÁVEL PARA COSMÉTICOS

Acsa Oliveira Magalhães^{1*}, Táris Maria Macedo de Santana¹, Marcus Vinicius Santos da Silva² e Angélica Maria Lucchese¹

RESUMO

Lippia thymoides Mart. & Schauer é uma planta nativa da Caatinga, com reconhecidas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo uma candidata promissora para aplicações cosméticas sustentáveis. Este estudo teve como objetivo desenvolver um processo verde e sustentável para a extração de compostos bioativos dessa espécie, utilizando solventes supramoleculares (SUPRAS), visando otimizar seu potencial para formulações cosméticas. A metodologia incluiu a otimização da síntese dos SUPRAS e a avaliação das atividades fotoprotetora (UVA e UVB), antimicrobiana e antioxidante, além da quantificação de fenólicos totais. Para caracterização físico-química, foram utilizados espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão. A segurança da formulação foi avaliada por meio de testes de toxicidade com *Artemia salina*. Os principais resultados indicaram que o solvente com 24% de etanol apresentou a maior eficiência na extração de fenólicos totais (856 ± 36 mg EAG/g), elevado potencial antioxidante (TEAC-ABTS: 1.432 ± 22 μ mol Trolox/g de folha seca; DPPH: $223,34 \pm 2,83$ μ mol Trolox/g de folha seca), além do maior fator de proteção solar (FPS: $15,30 \pm 0,35$). Ainda, os extratos supramoleculares demonstraram atividade antimicrobiana eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.. Conclui-se que o processo desenvolvido foi eficiente, seguro e ambientalmente responsável, com potencial significativo para aplicação em cosméticos inovadores, agregando valor à biodiversidade da Caatinga e promovendo práticas sustentáveis na indústria cosmética.

Palavras-chave: Antimicrobiano, Antioxidante, Fitocosméticos, Fitoquímica, Fotoproteção

¹ Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil. ² Departamento Física Estado Sólido, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador. *E-mail: acsaomagalhaes@hotmail.com

ABSTRACT

Lippia thymoides Mart. & Schauer is a plant native to the Caatinga biome, with recognized antioxidant and antimicrobial properties, making it a promising candidate for sustainable cosmetic applications. This study aimed to develop a green and sustainable process for extracting bioactive compounds from this species using supramolecular solvents (SUPRAS), with the goal of optimizing its potential for cosmetic formulations. The methodology included optimizing SUPRAS synthesis and evaluating photoprotective (UVA and UVB), antimicrobial, and antioxidant activities, in addition to quantifying total phenolics. For physicochemical characterization, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) were employed. The safety of the formulation was assessed through toxicity tests using *Artemia salina*. The main results indicated that the solvent with 24% ethanol exhibited the highest efficiency for total phenolic extraction (856 ± 36 mg GAE/g), high antioxidant potential (TEAC-ABTS: 1.432 ± 22 μ mol Trolox/g dry leaf; DPPH: 223.34 ± 2.83 μ mol Trolox/g dry leaf), as well as the highest sun protection factor (SPF: 15.30 ± 0.35). Furthermore, the supramolecular extracts demonstrated effective antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp. It is concluded that the developed process was efficient, safe, and environmentally responsible, with significant potential for application in innovative cosmetics, adding value to the Caatinga biodiversity and promoting sustainable practices in the cosmetic industry.

Keywords: Antimicrobial, Antioxidant, Photoprotection, Phytochemistry, Phytocosmetics

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos grandes desafios enfrentados pela sociedade é a necessidade de encontrar alternativas que reduzam os impactos ambientais causados pela geração de resíduos de difícil degradação. Nesse cenário, os conceitos de sustentabilidade e inovação vêm ganhando força como pilares essenciais na reformulação de processos industriais, especialmente nos segmentos cosmético e farmacêutico. O aumento da exigência por parte de consumidores mais atentos às questões ambientais, aliado ao fortalecimento de normas regulatórias, tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias mais “limpas” e o uso de matérias-primas naturais na formulação de novos produtos (Gonzalez; Costa; Signor, 2020).

A crescente preocupação com a composição dos produtos consumidos tem provocado uma transformação no perfil do consumidor, que passou a preferir cosméticos com formulações mais seguras e éticas, livres de componentes como parabenos, derivados de petróleo, ingredientes de origem animal e que não envolvam testes em animais (Goswami, 2024). Diante desse novo cenário, a indústria tem buscado substituir os métodos convencionais de extração de ativos naturais, que tradicionalmente dependem de solventes orgânicos tóxicos, por alternativas mais sustentáveis (Canton et al., 2021).

Entre essas alternativas, destacam-se os solventes supramoleculares (SUPRAS), sistemas auto-organizados compostos por agregados moleculares anfifílicos, que se mantêm unidos por interações não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações π - π . Esses solventes têm se mostrado eficientes na extração seletiva de metabólitos, com menor impacto ambiental, menor consumo energético e sem geração de resíduos perigosos (Huang; Anslyn, 2015; Siller-Sánchez et al., 2024). Além disso, apresentam alta compatibilidade com formulações voltadas para cosméticos veganos e sustentáveis, o que amplia ainda mais seu potencial de aplicação (Xia et al., 2024; Valisakkagari et al., 2024).

Um exemplo promissor é o uso da espécie *Lippia thymoides*, endêmica do bioma Caatinga, que apresenta elevado potencial farmacológico e pode ser valorizada por meio de tecnologias sustentáveis, contribuindo para a preservação da biodiversidade e o desenvolvimento de produtos inovadores e de alto valor agregado (Paiva; Lucena, 2020; Santos-Neves et al., 2024). Alguns estudos demonstram suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, com extratos brutos e frações de diclorometano mostrando

significativa eliminação de radicais livres e eficácia contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida parapsilosis*, validando usos tradicionais no tratamento de infecções (Silva et al., 2015a). Além disso, efeitos antipiréticos foram observados em modelos *in vivo*, com redução de febre comparável a medicamentos como dipirona e paracetamol, e perfil de segurança adequado, uma vez que os testes de toxicidade aguda não indicaram efeitos adversos (Silva et al., 2015a).

Do ponto de vista econômico e ecológico, a exploração sustentável de *L. thymoides* pode fortalecer estratégias de conservação da Caatinga, um ecossistema de elevada diversidade e endemismo (Sousa et al., 2024). A espécie integra o conjunto de recursos naturais brasileiros com potencial para impulsionar a bioeconomia (Gariglio et al., 2010). Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um processo de extração verde de compostos bioativos de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, utilizando solventes supramoleculares, com foco na inovação sustentável para aplicação em formulações cosméticas.

2 METODOLOGIA

2.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS

Os equipamentos listados a seguir foram utilizados na execução e análise dos experimentos:

- Balança analítica (ALC-210.4 Acculab[®])
- Balança analítica (Shimadzu[®] Modelo AY220)
- Cuba de ultrassom (Cristófoli[®])
- Espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu[®])
- Espectrofotômetro (Thermo Scientific[™] Multiskan[™] GO Microplate Spectrophotometer)
- Estufa com circulação de ar (Marconi[®] Modelo MA 035)
- Lavadora ultrassônica (Ultronique[®] Modelo Q13/37A)
- Lavadora ultrassônica (Unique[®] Modelo USC-3300)
- Moinho de facas (Marconi[®] Modelo 340)
- Softwares Windaq 32[®] (DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA)
- Software *UV PROB* 2.43
- Vortex (Biomixer[®] QL-901)

2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie *Lippia thymoides* foram coletadas em setembro de 2021, na região semiárida do povoado Buraco do Vento, localizado no município de Tucano, Bahia, cujas coordenadas geográficas são 10°57'15.2" de latitude Sul e 38°43'53.7" de longitude Oeste.

O material botânico, em fase reprodutiva, foi devidamente herborizado para a elaboração da exsicata e posteriormente incorporado ao acervo do Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), sob o número de registro 241404. Cadastro no Sisgen nº AB57225.

2.3 SÍNTESE DE SOLVENTES SUPRAMOLECULARES (SUPRAS)

As sínteses de SUPRAS foram realizadas conforme Keddar e colaboradores (2020), com adaptações. Assim, os SUPRAS de diferentes composições foram produzidos dissolvendo-se ácido octanóico em etanol seguido pela adição de água ($\text{pH} \approx 3$) como agente indutor de coacervação. Os solventes formaram-se espontaneamente na mistura e separando-se em duas fases, a inferior denominada EQS (solução de equilíbrio) e na superior o solvente supramolecular. A concentração de ácido octanóico foi de 5% v/v, e o etanol e a água variaram nas faixas de 9,5-36% v/v e 59-85,59% v/v, respectivamente. As misturas foram agitadas em Vortex (Biomixer[®] QL-901) por 30 segundos e depois foram adicionadas folhas secas de *L. thymoides* (na proporção de 3%), previamente trituradas em moinho de facas. Após 5 min no ultrassom, a mistura foi centrifugada (Mixtasel BLT, Selecta, Cham, Suíça) por 5 min a 3500 rpm. As fases SUPRAS e EQS foram coletadas separadamente e armazenadas em recipientes fechados em temperatura ambiente até o uso.

2.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Para a obtenção do extrato etanólico de *L. thymoides*, as folhas foram secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, para estabilização do material, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas. A concentração do extrato foi nas mesmas proporções de água/etanol utilizadas na síntese de SUPRAS (item 3.8), porém no lugar de ácido octanoico foi adicionado água. Após misturar etanol e água foi adicionado 3% de folhas de *L. thymoides*, mantido em ultrassom por 5 min, seguido por centrifugação (Mixtasel BLT, Selecta, Cham, Suíça) a 3500 rpm também por 5 min.

2.5 TESTE DE FOTOPROTEÇÃO

A análise da atividade fotoprotetora foi realizada com base na determinação do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), seguida pelo cálculo do fator de proteção solar (FPS), conforme metodologia adaptada de Oliveira Júnior et al. (2013). As amostras dos extratos EQS, SUPRA e etanólico foram preparadas em diluição de 0,5% em etanol absoluto, correspondendo a uma concentração final de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ de

folha seca de *Lippia thymoides*. As soluções foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. A leitura espectrofotométrica foi realizada no equipamento UV-1800 (Shimadzu®), abrangendo a faixa de 260 a 400 nm, com varreduras a cada 5 nm, em triplicata, para identificar os picos de absorção nas regiões UVA, UVB e UVC. O etanol puro foi utilizado como branco. O cálculo do FPS foi realizado com base na fórmula proposta por Mansur et al. (1986).

$$\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot 2 \cdot (\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (igual a 10)

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ)

Os valores de EE (λ) $\times$ I (λ) são constantes e foram determinados por Sayre e colaboradores (1979) e estão representados na Tabela 1:

Tabela 1: Valores de EE (λ) $\times$ I (λ) previamente determinados para o cálculo do FPS.

Comprimento de onda (nm)	EE x I (constantes)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Total	1.0000

Fonte: SAYRE et al., 1979

Para avaliar a capacidade de proteção das amostras na região UVA do espectro solar, aplicou-se o método *in vitro* determinado pela razão UVA/UVB que envolve a medida de absorção das amostras no intervalo de 290 a 400 nm. O método descrito baseia-se na razão entre as áreas sob as curvas de absorbância das faixas de radiação UVA (320–400 nm) e UVB (290–320 nm). Este cálculo fornece uma estimativa

quantitativa da proteção oferecida pela amostra contra os raios UVA em comparação aos UVB, sendo um parâmetro relevante para avaliar a eficácia de fotoprotetores.

$$\text{Razão } \frac{\text{UVA}}{\text{UVB}} = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} A\lambda. d\lambda}{\int_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} A\lambda. d\lambda}$$

Onde:

$A\lambda$ = Absorbância em um comprimento de onda específico.

$D\lambda$ = Incremento no comprimento de onda (no caso, 5 nm).

A razão entre a curva UVA/UVB é determinada e associada com a proteção frente à radiação UVA. Aos resultados podem ser atribuídos estrelas, sendo que o maior número destas corresponde a uma maior proteção anti-UVA estimada, como apresentado no Tabela 2 (Velasco *et al.*, 2011).

Tabela 2: Sistema Boot's Star Rating relacionado com a razão UVA/UVB conforme Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA (2004) Boots the Chemists, 2004).

Proteção Anti-UVA		
UVA/UVB	Estrelas	Descrição
0,0 até < 0,2	-	Muito baixa
0,2 até < 0,4	*	Moderada
0,4 até < 0,6	**	Boa
0,6 até < 0,8	***	Superior
0,8 até < 0,9	****	Máxima
$\geq 0,9$	*****	Ultra

Fonte: Velasco *et al.* (2011)

Determinação do Comprimento de Onda Crítico (λ_c) em Fotoprotetores

A eficácia dos extratos quanto à proteção contra radiação UVA também foi avaliada por meio de análise espectrofotométrica, conforme os critérios estabelecidos pela RDC Nº 629/2022 da ANVISA. O parâmetro utilizado foi o comprimento de onda crítico (λ_c), definido como o ponto em que 90% da área sob a curva de absorção, no intervalo de 290 a 400 nm, é alcançada. Este valor é obtido pela integração da densidade óptica da amostra a partir de 290 nm. Valores de λ_c superiores a 370 nm indicam que o produto oferece proteção eficaz contra os raios UVA, conforme os requisitos regulatórios para fotoprotetores.

2.6 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos etanólico, EQS e SUPRA das folhas de *Lippia thymoides* foi realizada por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico (Sigma®) como padrão. As amostras foram inicialmente preparadas na concentração de 0,015 g de folha seca por 100 mL de solvente, sendo todas analisadas em triplicata. Para o ensaio, alíquotas contendo 20 µg de cada amostra foram transferidas para poços de microplacas de 96 cavidades. Em seguida, adicionaram-se 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu, com homogeneização por 30 segundos. Após um breve repouso, foi incorporado à mistura 200 µL de solução de carbonato de sódio a 7%, seguida de nova agitação em velocidade moderada por mais 30 segundos.

A mistura foi deixada em repouso por 90 minutos, após quais as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 750 nm. Os valores obtidos para as concentrações das amostras foram comparados com os padrões de ácido gálico (Sigma®) dissolvidos em metanol de grau espectroscópico. A curva de proteção foi construída utilizando oito diluições de ácido gálico (10 a 200 µg/mL), também em triplicata. A solução da curva foi determinada por regressão linear, e os conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de folha (EAG/g).

2.7 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOL NA SÍNTESE SUPRAMOLECULAR

Foram avaliados três métodos de extração (ETANÓLICO, EQS e SUPRA), utilizando concentrações de etanol variando entre 9,5% e 36%. O teor de compostos fenólicos foi quantificado, e o FPS foi determinado experimentalmente para cada combinação de método e concentração. A correlação entre fenólicos e FPS foi calculada utilizando o coeficiente de Pearson. A correlação estatística foi calculada utilizando o Python, com as bibliotecas pandas e NumPy.

2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.8.1 Método de sequestro de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante por meio do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi determinada utilizando espectrofotometria na região do UV-Vis, monitorando-se a redução da absorbância a 517 nm. Para garantir a comparabilidade entre as amostras, estas foram padronizadas em concentração de 0,5%. Nas microplacas de 96 poços, adicionaram-se os extratos fermentados e a solução de DPPH (40,0 µg/mL), na razão de 1:2 (amostra:DPPH), sendo a mistura agitada e mantida em repouso, protegida da luz, por 30 minutos.

Após esse período, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. O controle foi composto por uma mistura de água e solução metanólica de DPPH na mesma proporção 1:2, enquanto o branco consistiu apenas em metanol puro.

As amostras foram avaliadas por porcentagem de Sequestro do Radical Livre DPPH• (% I) mediante a Equação:

$$\% I = \frac{ADPPH - (AA - AC)}{ADPPH} \times 100$$

Onde:

ADPPH = absorbância do controle da solução do DPPH•

AA = absorbância da amostra

AC = absorbância do controle da amostra

Adicionalmente, foi aplicado o ensaio TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox) com o objetivo de quantificar a atividade antioxidante das amostras em relação ao antioxidante de referência, o Trolox. Esse método avalia a eficiência das amostras em neutralizar o radical livre DPPH•, comparando-a diretamente com a ação do padrão. As amostras (etanólicas, EQS e Supras) foram avaliadas em diferentes concentrações, sendo os resultados expressos em equivalentes de Trolox. O padrão foi testado em concentrações que variaram de 3,61 a 100 µM. A atividade antioxidante foi então expressa em µM de Trolox por grama de folha seca.

A concentração de antioxidantes presentes em cada poço de reação ([CP]) foi determinada em termos de concentração equivalente ao Trolox (µM), utilizando-se a equação obtida a partir da curva de calibração construída com os valores do padrão.

$$CP = \frac{(Abs - b)}{a}$$

Onde:

Abs = absorvância da amostra.

a = coeficiente angular obtido para a curva de calibração.

b = coeficiente linear obtido para a curva de calibração.

[CP]= concentração de antioxidantes no poço de reação

Levando em consideração a quantidade em gramas de folha utilizada (0,015 g em 100 mL de água), tem-se a atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol/ grama de folha}$) (TEAC), Equação:

$$TEAC = [CP] \frac{(0,1L)}{(0,015g)}$$

2.8.2 Método de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico (ABTS)

Outro ensaio utilizado para avaliar a atividade antioxidante das amostras foi o método de sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de ABTS a 7 mM, dissolvendo-se 192 mg do reagente em água destilada em balão volumétrico de 50 mL, sendo a solução armazenada em frasco âmbar devidamente rotulado. Simultaneamente, foi preparada uma solução de persulfato de potássio a 140 mM pela dissolução de 378,4 mg do sal em 10 mL de água destilada, também acondicionada em frasco âmbar.

A formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi obtida por meio da reação de 5 mL da solução de ABTS com 88 μL da solução de persulfato, mantendo-se a mistura protegida da luz, à temperatura ambiente, por 16 horas. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi diluído em etanol até que a absorvância atingisse $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Nos testes de ABTS para as amostras etanólicas, EQS e Supra foram realizadas no Espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) na concentração de 0,15 g/L. Para cada 20 μL de amostra para 380 μL de solução radical ABTS, repouso de 20 minutos, sob abrigo de luz, com leitura a 734 nm.

A capacidade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (I%), calculada com base na equação descrita a seguir:

$$\% I = \text{AABTS} - (\text{AA} - \text{AC}) / \text{AABTS} \times 100$$

Onde:

ABTS = absorbância do controle da solução do ABTS⁺⁺

AA = absorbância da amostra

AC = absorbância do controle da amostra

. Além disso, foi realizado o teste TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) para avaliar a capacidade antioxidante das amostras em relação ao padrão Trolox.

2.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIO MÍNIMA (CIM)

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por meio do método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; 2016). Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) frente às cepas *Staphylococcus aureus* 38 (MRSA), *Escherichia coli* CCMB261 e *Salmonella* spp ATCC 14028, previamente armazenadas no setor de microbiologia do Laboratório Lapron para utilização nos testes.

As culturas bacterianas foram reativadas 24 horas antes do experimento, sendo semeadas em placas de Petri contendo Müeller–Hinton Agar (MHA) e incubadas a 37 °C por tempo adequado. Para preparação dos inóculos, entre 3 a 5 colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85%, utilizando alça de platina estéril. A seguir, as suspensões foram homogeneizadas em agitador tipo vortex (Biomixer® QL-901), e a densidade óptica foi ajustada com auxílio de colorímetro (Biochrom®) a 580 nm. A absorbância foi calibrada para aproximadamente 0,10, correspondendo a uma concentração de $1-5 \times 10^8$ UFC/mL, compatível com o padrão 0,5 da escala de McFarland.

Posteriormente, procedeu-se à diluição do inóculo, adicionando-se 20 µL da suspensão a 29,98 mL de meio Müeller–Hinton, de modo a garantir uma carga final de aproximadamente 5×10^4 UFC/mL por poço nas microplacas. Para o controle positivo, utilizou-se cloranfenicol (CLO, Sigma-Aldrich), mantido em solução estoque na concentração de 10 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços. As amostras etanólica, EQS e SUPRA, previamente obtidas a partir de folhas secas de *Lippia thymoides* (conforme metodologia previamente descrita), foram preparadas na

concentração inicial de 30 mg/mL, expressa em relação ao peso seco da folha. A amostra SUPRA foi previamente dissolvida e diluída em Tween 80 a 0,5%, a fim de garantir adequada dispersão da formulação supramolecular. Controle de Tween 80 a 0,5% foi avaliado para observar se o tensoativo não inibia o crescimento microbiano. As amostras da formulação SUPRA foram testadas em oito concentrações sucessivas, com diluição em fator 2, variando de 1,28% no primeiro poço até 0,01% no oitavo (1,28; 0,64; 0,32; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01%). Para as amostras etanólica e EQS, as concentrações testadas variaram de 25,00% no primeiro poço até 0,20% no oitavo (25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,20%).

Foram incluídos controles de viabilidade dos microrganismos e controles de esterilidade para o meio de cultura, solução salina, água destilada e extratos testados, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados. Após a montagem das microplacas, estas foram acondicionadas em sacos plásticos selados e incubadas em estufa a 36 °C por um período de 21 horas. Decorrido esse tempo, procedeu-se à revelação utilizando o corante resazurina. Para isso, foram adicionados 30 µL de uma solução de resazurina a 0,01% em cada poço.

As placas foram novamente seladas em sacos plásticos e incubadas por mais 3 horas. A leitura dos resultados foi realizada por observação da mudança de cor nos poços: aqueles que apresentaram coloração rosa indicaram crescimento bacteriano, enquanto os que permaneceram com coloração azul revelaram inibição. A menor concentração do extrato que manteve a coloração azul foi considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi expressa como a menor concentração do agente antimicrobiano, em miligramas de equivalente em folha seca por mililitro de solução (mg folha seca/mL), capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano, indicado pela manutenção da coloração azul da resazurina.

2.10 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico, em inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS) visa medir o tamanho e a distribuição do tamanho de nanopartículas em suspensão. No presente experimento foi utilizado o equipamento Malvern Advance Pro Blue Label para medir e o software SpectraManage para leitura e análise. As amostras foram diluídas com etanol a 12,5% (v/v). O método de análise foi medida do tamanho, a cubeta utilizada foi a cubeta plástica DTS0012, água como dispersante, o tamanho foi

selecionado pelo número de medida. O experimento foi feito em triplicata, com pausa de 30 segundos entre as medidas. Os dados obtidos foram analisados pelo software SpectraManage, que utilizou a relação Stokes-Einstein para calcular o tamanho das partículas a partir das oscilações de intensidade da luz dispersada. A distribuição do tamanho das partículas foi avaliada com base nos dados de DLS, gerando um histograma representativo da distribuição do tamanho, tamanho médio e índice de polidispersividade.

2.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada na Universidade Federal da Bahia pelo utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 2800 de 200kV, que oferece capacidades multifuncionais para a análise de materiais diversos e semicondutores. O preparo das amostras foi feito com as amostras diluídas em água destilada e uma gota da suspensão foi depositada sobre grade de cobre revestida com filme de carbono. As grades foram secas ao ar ambiente para assegurar a aderência dos extratos ao filme de carbono. As grades preparadas foram cuidadosamente inseridas no porta-amostras do JEOL JEM 2800. O porta-amostras foi então inserido na câmara de análise do microscópio, e a câmara foi evacuada para remover qualquer contaminante gasoso. Para análise, inicialmente, a amostra foi alinhada e focalizada utilizando baixa magnificação para localizar as regiões de interesse. Após a localização das regiões de interesse, a magnificação foi aumentada gradualmente até atingir as desejadas para a análise detalhada. As imagens foram adquiridas utilizando os modos TEM e STEM conforme necessário. No modo TEM, foram capturadas imagens com resolução de 0,1 nm para avaliar a estrutura cristalina dos extratos. No modo STEM, imagens de alta resolução com resolução de 0,2 nm foram obtidas para mapeamento elementar e análise estrutural detalhada. O EDS foi utilizado para realizar mapeamento elementar ultrasensível das amostras, identificando a distribuição dos elementos constituintes dos extratos.

2.12 TESTE DE TOXICIDADE

O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado conforme o protocolo estabelecido por Meyer et al. (1982). Para a preparação da água do mar artificial, dissolveram-se 19 g de sal marinho em 5 litros de água mineral sem cloro, assegurando-se a completa dissolução. Após o preparo, a solução foi aerada com o auxílio de uma bomba para garantir a oxigenação adequada. Os ovos de *Artemia salina* foram colocados na parte escura de um aquário, e após 24 horas de incubação, observou-se a eclosão. Os *nauplii* recém-eclodidos migraram espontaneamente para a área iluminada, de onde foram cuidadosamente coletados com pipeta de Pasteur. As amostras dos Supras foram previamente secas em estufas a 40°C para a obtenção dos extratos secos. Posteriormente, foram solubilizados em água do mar artificial, em diferentes concentrações variando de 50 a 1000 µg/mL, para a realização dos ensaios.

Para o bioensaio, foram transferidos dez *nauplii* para cada tubo contendo 5 mL das amostras a serem testadas, permanecendo em exposição por 24 horas. O grupo controle recebeu apenas água do mar artificial. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os frascos foram mantidos sob iluminação constante de uma lâmpada incandescente de 60 W. Após o período de incubação, realizou-se a contagem dos *nauplii* sobreviventes com o auxílio de uma lupa de aumento. Foram considerados mortos os indivíduos que não apresentaram qualquer movimento durante 10 segundos consecutivos. A taxa de mortalidade foi calculada pela média aritmética das triplicatas, e, nos casos em que houve mortalidade no controle, aplicou-se a correção conforme a fórmula de Abbot:

$$\% \text{mortos} = \left[\frac{\text{teste} - \text{controle}}{\text{controle}} \right] \times 100$$

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Microsoft Excel 2010, que permitiu o cálculo da concentração letal média (CL50) das amostras, com um nível de confiança de 95%. A definição da faixa de concentração a ser avaliada baseou-se no gráfico de resposta citotóxica, priorizando a maior concentração que não causou mortalidade (0%) e a menor concentração que resultou em 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas entre esses dois

extremos, possibilitando a determinação da CL50, correspondente à dose capaz de provocar a morte de 50% dos organismos expostos (Veiga et al., 1989).

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para detecção de diferenças significativas entre tratamentos, e, quando identificada significância pelo teste F, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais médias diferiram entre si. As análises foram realizadas no Excel 2010, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, acompanhados de valores de p e intervalos de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FOTOPROTEÇÃO

3.1.1 Comparação da atividade fotoprotetora em função das diferentes concentrações de etanol nos extratos e diferentes solventes extrativos (SUPRAS, EQS e ETANÓLICO)

Na avaliação do fator de proteção solar (FPS) com foco na radiação UVB (Tabela 3), observou-se que a eficácia fotoprotetora dos extratos variou significativamente de acordo com a concentração de etanol utilizada no processo extrativo, bem como com o tipo de solvente aplicado. O extrato etanólico apresentou seu melhor desempenho com a concentração de 33% de etanol, registrando FPS de $6,40 \pm 0,48$, valor que atende ao critério mínimo estabelecido pela RDC nº 30/2012 da ANVISA, que define o FPS 6 como limiar mínimo para que um produto possa ser considerado fotoprotetor (Brasil, 2012). Dessa forma, esse extrato se enquadra na categoria de baixa proteção.

No caso do extrato produzido com a solução de equilíbrio (EQS), a concentração de 36% foi a que resultou no maior FPS, com valor de $5,58 \pm 0,60$. No entanto, este resultado está abaixo do valor mínimo exigido pela legislação vigente, não sendo suficiente para que tal extrato seja classificado como eficaz em proteção solar. Tal limitação restringe seu uso isolado em formulações com alegação de fotoproteção.

Por outro lado, o extrato SUPRA, obtido com ácido octanóico como co-solvente, demonstrou desempenho significativamente superior em comparação aos demais. A concentração de 24% de etanol foi a que proporcionou o maior FPS, alcançando $15,30 \pm 0,35$, o que o qualifica como um produto de média proteção solar, segundo os critérios da ANVISA. Este dado é particularmente relevante, pois demonstra que a presença do ácido octanóico no sistema extrativo foi determinante para a maior eficiência do extrato em bloquear a radiação UVB. A sinergia entre o teor moderado de etanol e o uso do ácido graxo de cadeia média potencializou a extração de compostos ativos fotoprotetores, refletindo em um FPS elevado e estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Dessa forma, os resultados evidenciam que a escolha da concentração de etanol deve considerar não apenas a polaridade do solvente, mas também sua interação com outros co-solventes, como o ácido octanóico, que demonstrou papel fundamental na otimização da atividade fotoprotetora. A extração com 24% de etanol no sistema

SUPRA mostrou-se a mais promissora, tanto em termos de eficácia quanto em conformidade com os parâmetros regulatórios, sendo indicada como base para desenvolvimento de formulações fotoprotetoras de origem natural.

Tabela 3: Fotoproteção UVB de *L. thymoides*.

[% etanol]	FPS UVB $\pm$ Desvio Padrão		
	ETANOLICO	EQS	SUPRA
9,5	5,32 $\pm$ 0,91 ^{a;c;1}	5,10 $\pm$ 0,47 ^{d;1}	13,48 $\pm$ 0,23 ^{e;f;2}
19	5,72 $\pm$ 0,14 ^{a;b;3}	4,79 $\pm$ 0,88 ^{d;3}	14,04 $\pm$ 2,29 ^{e;g;4}
24	6,03 $\pm$ 0,38 ^{b;5}	5,33 $\pm$ 0,62 ^{d;5}	15,30 $\pm$ 0,35 ^{e;5}
33	6,40 $\pm$ 0,48 ^{b;c;6}	5,14 $\pm$ 0,72 ^{d;6}	12,33 $\pm$ 0,70 ^{e;h;6}
36	6,21 $\pm$ 0,47 ^{b;c;7}	5,58 $\pm$ 0,60 ^{d;7}	10,99 $\pm$ 0,90 ^{h;8}

Legenda: (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na coluna e mesmo número não diferem na mesma linha.

A eficácia da proteção UVA e UVB *in vitro* para diferentes espécies de plantas tem sido explorada por meio de vários estudos, destacando o potencial dos extratos vegetais como agentes fotoprotetores naturais. No estudo de Gawel-Beben et al. (2020), extratos de *Cistus × incanus* e *Cistus ladanifer* apresentaram potencial fotoprotetor e elevada atividade antioxidante, sendo observados valores de fator de proteção solar (FPS) entre 3,42 e 4,37. Os autores atribuíram esses efeitos à alta concentração de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, os quais atuam na absorção da radiação ultravioleta e na neutralização de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a proteção da pele contra os danos induzidos pela exposição solar (Gawel-Beben et al., 2020). Da mesma forma, Monsalve-Bustamante et al. (2023) investigaram extratos de folhas da família *Ericaceae*, incluindo *Bejaria aestuans*, que mostraram absorção de UVA/UVB de amplo espectro e capacidade antioxidante. A investigação da eficácia da fotoproteção *in vitro* de seis extratos vegetais contra a radiação UVA-UVB, entre eles, o extrato de *Baccharis. antioquensis* demonstrou fotoproteção significativa, parecida com a do presente estudo, com um FPS de 15 ± 2 (Mejía-Giraldo et al., 2021).

Uma forma complementar à avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) é a análise da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico (λ_c), parâmetros que fornecem uma estimativa mais abrangente da eficácia fotoprotetora de uma formulação frente à radiação ultravioleta. O sistema de classificação Boot's Star Rating, amplamente utilizado na Europa, considera a razão entre a proteção contra UVA e UVB como indicativo da qualidade da proteção solar. De acordo com esse sistema, uma razão

UVA/UVB superior a 0,9 é considerada como “ultraproteção”, a classificação mais alta disponível, indicando eficácia significativa na proteção contra a radiação UVA, responsável por danos crônicos como envelhecimento precoce e mutações celulares (Rudolph, 2004).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4, todas as formulações testadas atingiram valores de razão UVA/UVB superiores a 0,9, enquadrando-se, portanto, na categoria de ultraproteção segundo os critérios estabelecidos. Apesar dessa classificação comum, observam-se variações entre os extratos. Destaca-se o extrato obtido com o sistema SUPRA, que apresentou os maiores valores de razão UVA/UVB, sugerindo uma maior capacidade de absorção de radiação UVA em comparação aos demais. Esse desempenho reforça a hipótese de que a composição do sistema extrativo, especialmente com a presença de ácido octanóico, contribui para a extração de compostos com maior ação fotoprotetora de amplo espectro. Dessa forma, a avaliação da razão UVA/UVB complementa os dados do FPS e oferece uma visão mais completa da eficácia dos extratos desenvolvidos.

Com base nos resultados obtidos para o comprimento de onda crítico (λ_c), pode-se observar que todos os extratos avaliados – etanólico, EQS e SUPRA – apresentaram valores de λ_c muito próximos e, em sua maioria, inferiores ao limite de 370 nm estabelecido pela RDC Nº 629/2022 da ANVISA como critério mínimo para proteção eficaz contra a radiação UVA.

Os dados mostram que o extrato SUPRA apresentou valores ligeiramente mais elevados de λ_c em todas as concentrações avaliadas, com destaque para as formulações com 24%, 33% e 36% de etanol, onde o λ_c atingiu 365 nm, o maior valor registrado entre os extratos. Já os extratos etanólico e EQS mantiveram-se praticamente constantes, com λ_c em torno de 364 nm, independentemente da concentração de etanol utilizada.

Tabela 4: Razão UVA/UVB e comprimento de onda crítico (λ_c) dos extratos etanólico, EQS e SUPRA de *L. thymoides*

[% etanol]	Razão UVA/UVB			Sistema Boot's Star Rating	Comprimento de onda crítico (λ_c)		
	ETOH	EQS	SUPRA		ETOH	EQS	SUPRA
9,5	1,61±0,02	1,55±0,01	1,95±0,01	*****	364,22±0,44	364±0	364,78±0,44
19	1,61±0,01	1,55±0,01	1,91±0,01	*****	364±0	364±0	364,89±0,33
24	1,60±0,01	1,56±0,01	1,90±0,01	*****	364±0	364±0	365±0
33	1,61±0,01	1,60±0,01	1,86±0,01	*****	364±0	364±0	365±0
36	1,62±0,01	1,62±0,01	1,85±0,01	*****	365±0	364±0	365±0

Legenda: *****= Ultra

A importância da proteção fotoprotetora frente aos raios UVA e UVB é ressaltada pelos significativos riscos à saúde associados à exposição à radiação ultravioleta (UV). Os raios UVA e UVB, que penetram na atmosfera terrestre, têm efeitos distintos, mas sobrepostos, na pele. Os raios UVA, com comprimentos de onda maiores, penetram mais profundamente na pele, contribuindo para o fotoenvelhecimento e a imunossupressão, enquanto os raios UVB, embora menos penetrantes, são os principais responsáveis por queimaduras solares e danos diretos ao DNA, levando à fotocarcinogênese (Antonik et al., 2023; Ayad et al., 2023; Costa et al., 2021).

A fotoproteção eficaz é crucial para mitigar esses riscos, pois ajuda a prevenir danos à pele, incluindo eritema, pigmentação e efeitos de longo prazo, como câncer de pele e fotoenvelhecimento (Fijak; Polańska, 2023; Antonik et al., 2023). Os protetores solares são o principal mecanismo de defesa, oferecendo proteção ao absorver ou refletir a radiação UV. Eles são formulados para fornecer proteção de amplo espectro, cobrindo os raios UVA e UVB, o que é essencial para uma proteção abrangente da pele (Ayad et al., 2023; Monsalve-Bustamante et al., 2023).

As espécies vegetais são uma fonte de compostos com ação fotoprotetora, dentre ela, as espécies de *Lippia*, tais como *Lippia graveolens*, *Lippia insignis* e *Lippia sericea* as quais demonstraram atividades fotoprotetoras contra a radiação UVA e UVB, principalmente devido ao seu rico conteúdo de flavonóides e compostos polifenólicos (García-Bores et al., 2017; Lima et al., 2019; Polonini et al., 2014). Foi demonstrado que *Lippia graveolens*, comumente conhecida como orégano mexicano, possui efeitos fotoquimiopreventivos contra a carcinogênese cutânea induzida por UVB em camundongos, atribuídos à sua capacidade de absorver a radiação UVB e suas

propriedades antioxidantes, que incluem a eliminação de radicais livres como superóxido e radicais hidroxila (García-Bores et al., 2017).

Da mesma forma, *Lippia insignis*, um arbusto aromático nativo do Brasil, foi estudado por seu potencial fotoprotetor, com seus extratos se mostrando promissores em proteger a pele dos danos induzidos pelos raios UV, provavelmente devido ao seu conteúdo de flavonoides. O estudo determinou os fatores de proteção solar (FPS) dos extratos de seus caules, folhas e inflorescências, revelando uma relação dose-dependente. Extratos metanólicos a 100 mg/L apresentaram valores de FPS variando de 0,24 a 7,51, com o extrato de caule atingindo o maior FPS de 7,51, indicando seu potencial como agente fotoprotetor natural. Através da relação UVA/UVB os extratos metanólicos foram classificadas como ultraprotetoras (Lima; Lucchese; Freita, 2019).

Lippia sericea foi também avaliada como um protetor solar natural de amplo espectro, demonstrando proteção *in vitro* e *in vivo* contra a radiação UVB e UVA, com sua eficácia ligada ao conteúdo polifenólico total. Um protetor solar natural de amplo espectro usando o extrato seco de *Lippia sericea* como um único filtro UV foi desenvolvido. Os valores de FPS *in vitro* dos protetores solares naturais variaram de 1,7 a 7,6, com *L. sericea* atingindo o maior FPS de 7,6. O FPS *in vivo* para *L. sericea* foi determinado em 7,5 e seu UVA foi 2,97, indicando seu potencial para uso comercial como ingrediente protetor solar natural (Polonini et al., 2014).

Os óleos essenciais de várias espécies de *Lippia*, incluindo *Lippia graveolens* e *Lippia origanoides*, também foram avaliados por seus efeitos antígeno-tóxicos contra danos ao DNA induzidos por UV, com certos constituintes como timol e carvacrol mostrando efeitos protetores significativos (Ruiz et al., 2017).

O crescente interesse em fotoprotetores naturais é impulsionado pelas limitações dos protetores solares sintéticos, como proteção espectral incompleta e potencial toxicidade, tornando vegetais como as espécies de *Lippia* alternativas atraentes devido à sua absorção de UV de amplo espectro e benefícios adicionais à saúde, incluindo propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Arruda et al., 2021; Rojas et al., 2015). Essas descobertas ressaltam o potencial das espécies de *Lippia* como agentes naturais eficazes para a fotoproteção da pele, oferecendo um caminho promissor para o desenvolvimento de produtos de proteção solar mais seguros e ecológicos.

3.2 FENÓLICOS TOTAIS

3.2.1 Comparação de fenólicos totais das diferentes concentrações em etanol dos extratos de SUPRAS, EQS E ETANÓLICO

A tabela 5 reúne os resultados de fenólicos totais, expressos em mg EAG/g de folha, que variaram entre 588 e 856 mg EAG/g.

Tabela 5: Fenólicos Totais Equivalente a Ácido Gálico (mg EAG/g) de *L. thymoides*.

[% etanol]	mg EAG/g de folhas $\pm$ Desvio Padrão		
	ETANOLICO	EQS	SUPRA
9,5	617 $\pm$ 18 ^{a;1}	610 $\pm$ 30 ^{d;e;g;1}	667 $\pm$ 9 ^{i;2}
19	623 $\pm$ 23 ^{a;3}	625 $\pm$ 32 ^{d;e;3}	730 $\pm$ 24 ^{i;4}
24	635 $\pm$ 24 ^{a;b;5}	624 $\pm$ 33 ^{d;e;5}	856 $\pm$ 36 ^{h;6}
33	651 $\pm$ 19 ^{b;7}	649 $\pm$ 24 ^{e;i;g;7}	854 $\pm$ 25 ^{h;8}
36	588 $\pm$ 14 ^{c;9}	598 $\pm$ 20 ^{f;9}	606 $\pm$ 12 ^{i;9}

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na coluna e mesmo número não diferem na mesma linha. (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$)

Observa-se que os solventes extratores sintetizados com 24% e 33% de etanol foram os mais eficazes para a extração de fenólicos totais nas folhas de *L. thymoides*, apresentando os maiores valores para a extração com SUPRA (856 $\pm$ 36 mg EAG/g e 854 $\pm$ 25 mg EAG/g, respectivamente). Da mesma forma, não houve diferença estatística entre os valores de fenólicos totais para a fase do EQS nas concentrações de 24% (624 $\pm$ 33 mg EAG/g) e 33% (649 $\pm$ 24 mg EAG/g), e para a extração em etanol, (635 $\pm$ 24 mg EAG/g a 24% e 651 $\pm$ 19 mg EAG/g, a 33%). Esses valores se destacam significativamente em comparação com dados de outras espécies do gênero *Lippia* disponíveis na literatura.

Em *Lippia adoensis* var. *koseret*, por exemplo, o teor fenólico foi de 67,61 $\pm$ 9,89 mg EAG/g (Dessalegn et al., 2020), enquanto o intervalo de variação entre espécies como *Lippia pseudo-thea* e *Lippia sericea* foi de 105,5 a 255,4 mg EAG/g (Singulani et al., 2012). Essa comparação evidencia que *L. thymoides* apresenta um teor de compostos fenólicos consideravelmente superior, o que pode estar relacionado a fatores genéticos e ambientais, além do tipo de extração utilizada.

3.2.2 Coeficientes de correlação entre os compostos fenólicos e o FPS (UVB)

Os coeficientes de correlação entre os compostos fenólicos e o FPS para cada método são: ETANÓLICO: 0,20 (correlação fraca e positiva); EQS: -0,47 (correlação

moderada e negativa) e SUPRA: 0,56 (correlação moderada e positiva). Os resultados sugerem que o método de extração e tipo de solvente influencia diretamente a relação entre fenólicos e FPS. Para o extrato ETANÓLICO, a correlação fraca positiva indica uma associação limitada entre o aumento de fenólicos e a elevação do FPS. Na EQS, a correlação negativa moderada sugere que, embora os teores de fenólicos aumentem a capacidade fotoprotetora não aumenta. Todavia, para o SUPRA, a correlação moderada positiva indica que os fenólicos estão mais acessíveis ou estão em uma configuração que maximiza a absorção UV, refletindo na maior eficácia fotoprotetora.

A correlação entre compostos fenólicos e o FPS está bem documentada em vários estudos, destacando o potencial dos fenólicos como agentes fotoprotetores. Os compostos fenólicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, desempenham um papel significativo na proteção da pele dos danos induzidos pelos raios UV, neutralizando os radicais livres e reduzindo o estresse oxidativo (Sagala; Panjaitan, 2023; Saric; Sivamani, 2016).

Pesquisas sobre diferentes extratos vegetais, como os de *Tinospora crispa* e várias plantas medicinais iranianas, demonstraram uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e os valores de FPS. Por exemplo, a fração de acetato de etila das folhas de *Tinospora crispa* mostrou um alto conteúdo fenólico e um valor de FPS de 48,79 em uma concentração de 1000 ppm (Sagala; Panjaitan, 2023). Da mesma forma, estudos sobre plantas medicinais iranianas encontraram correlações significativas entre FPS e conteúdo fenólico, com valores de FPS variando de 0,067 a 0,841, indicando que um maior conteúdo fenólico pode aumentar o FPS (Hashemi et al., 2021).

Além disso, foi demonstrado que o uso de compostos fenólicos do bagaço de uva em formulações de protetor solar aumenta o FPS em 81%, sugerindo um efeito sinérgico quando combinado com filtros UV (Hubner et al., 2019). Esse sinergismo também é observado com o ácido ferúlico, um composto fenólico que, quando combinado com filtros UV, aumentou o FPS em 37% e aumentou a proteção UVA (Peres et al., 2018). Essas descobertas ressaltam coletivamente o potencial dos compostos fenólicos como agentes naturais e multifuncionais em formulações de protetores solares, oferecendo benefícios antioxidantes e fotoprotetores (Ebrahimzadeh et al., 2014; Gomes et al., 2021).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.3.1 Atividade antioxidante dos extratos SUPRAS, EQS e ETANÓLICO

A incorporação de antioxidantes aos protetores solares pode aumentar suas capacidades de proteção ao neutralizar os radicais livres gerados pela exposição aos raios UV (Ayad et al., 2023), gerando um ativo multifuncional. Desta forma as Tabelas 5 e 6 reúnem os resultados da atividade antioxidante dos extratos etanólicos e dos solventes supramoleculares, em diferentes concentrações de etanol, frente aos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS).

Os resultados indicam que concentrações superiores a 9% de etanol são mais vantajosas, especialmente para o extrato do SUPRA, devido aos maiores valores de capacidade antioxidante (TEAC) frente ao radical DPPH, entre $210,88 \pm 3,1$ e $223,34 \pm 2,83$ $\mu\text{mol Trolox/g}$. Esses dados sugerem que a presença de etanol em concentração mais elevada propicia a extração e/ou interação de compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante. Entretanto, por comparação com o EQS, é possível perceber que os compostos de melhor atividade antioxidante foram extraídos pela solução de equilíbrio, o que pode sugerir que os metabolitos de melhor atividade são hidrofílicos, já que a maior quantidade de água está geralmente presente nesta fase (Zulkifli et al., 2012). No que se refere ao extrato etanólico as concentrações de etanol a 19% e 33% do solvente extrator foram as de maior atividade antioxidante, não apresentando diferença estatística. Considerando que os extratos etanólicos foram os de melhor resultado, seriam esses a solução ideal para a extração de compostos antioxidantes, maximizando a eficiência do processo.

Tabela 5: Atividade Antioxidante (TEAC) de diferentes extratos de *L. thymoides* em ensaios de sequestro de DPPH.

[% etanol]	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g de folhas} \pm \text{Desvio Padrão}$)		
	ETANOLICO	EQS	SUPRA
9,5	300,67 $\pm$ 4,45 ^{a;1}	288,74 $\pm$ 3,73 ^{e;2}	183,87 $\pm$ 3,1 ^{g;3}
19	310,33 $\pm$ 5,26 ^{b;4}	301,93 $\pm$ 8,55 ^{d;5}	210,88 $\pm$ 3,1 ^{f;6}
24	298,77 $\pm$ 6,64 ^{a,c;7}	325,15 $\pm$ 5,44 ^{d;8}	223,34 $\pm$ 2,83 ^{f;9}
33	303,47 $\pm$ 4,89 ^{a,b,c;11}	297,87 $\pm$ 4,24 ^{e;11}	223,16 $\pm$ 4,25 ^{f;12}
36	290,55 $\pm$ 5,82 ^{c;13}	307,35 $\pm$ 2,04 ^{d;14}	219,28 $\pm$ 4,77 ^{f;15}

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na coluna e mesmo número não diferem na linha. (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$)

Os resultados encontrados no teste expostos na Tabela 6 do método de sequestro de ABTS indicam que a concentração de etanol a 19% levou a capacidade superior de atividade antioxidante, especialmente para os extratos etanólico e EQS, que apresentaram os maiores valores de TEAC (1.573 ± 8 e 1.593 ± 18 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectivamente). No entanto, para SUPRA as concentrações de 9,5% e 24% de etanol foram as de melhor resultado com 1.432 ± 22 e 1.419 ± 20 $\mu\text{mol Trolox/g}$, valor superior às outras extrações com os distintos solventes supramoleculares preparados. No entanto, se verifica que os maiores valores de TEAC foram dos extratos etanólicos e do EQS, com maiores teores de água, sugerindo também assim a presença destacada de metabólitos antioxidantes mais hidrofílicos.

Tabela 6: Atividade Antioxidante (TEAC) de *L. thymoides* pelo método de sequestro de ABTS.

[% etanol]	TEAC ($\mu\text{mol trolox/g de folhas} \pm \text{Desvio Padrão}$)		
	ETANOLICO	EQS	SUPRA
9,5	1495 $\pm$ 21 ^{a;1}	1538 $\pm$ 29 ^{c;1}	1432 $\pm$ 22 ^{f;1}
19	1573 $\pm$ 8 ^{b;2}	1593 $\pm$ 18 ^{e;2}	1376 $\pm$ 11 ^{g;2}
24	1508 $\pm$ 18 ^{a;3}	1516 $\pm$ 12 ^{c;d;3}	1419 $\pm$ 20 ^{f;4}
33	1528 $\pm$ 40 ^{a;5}	1555 $\pm$ 14 ^{c;5}	1374 $\pm$ 14 ^{g;h;6}
36	1494 $\pm$ 41 ^{a;7}	1513 $\pm$ 14 ^{d;7}	1377 $\pm$ 12 ^{g;h;8}

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na coluna e mesmo número não diferem na mesma linha (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Esses achados evidenciam que a combinação etanol:água nessa proporção é eficiente para a extração de compostos antioxidantes com caráter mais hidrofílico. Isso está alinhado com diversos estudos que apontam a importância da polaridade do solvente na extração de compostos fenólicos bioativos. Segundo Ghaffar e Perveen

(2024), solventes mais polares, como água ou misturas aquosas, são mais eficazes na extração de antioxidantes com baixa lipofilicidade. Da mesma forma, Sopee et al. (2019) observaram que a extração da casca de *Nephelium mutabile* com 80% de etanol resultou em elevado conteúdo fenólico e atividade antioxidante, reforçando que a combinação de etanol com água favorece a extração de antioxidantes. No presente estudo, os resultados mais altos de TEAC para o método ABTS, que é mais sensível a compostos hidrofílicos e lipofílicos, reforçam a ideia de que misturas hidroetanólicas otimizam a obtenção de antioxidantes de perfil mais amplo no que se refere a polaridade.

Esses achados são complementares aos resultados de Singh et al. (2014), que relataram a eficácia de misturas contendo etanol, éter dietílico e água na extração de compostos bioativos da romã. De modo semelhante, Jaafreh (2024) identificou que, em extratos de alecrim, o etanol foi o melhor solvente para extração de fenólicos e flavonoides, embora o metanol tenha se destacado no ensaio DPPH.

3.3.2 Escolha da Concentração de etanol na síntese de Supra

Com base nos resultados apresentados na Figura 1, percebe-se que a escolha da melhor concentração depende das propriedades que se deseja otimizar. Para a capacidade antioxidante medida pelo DPPH, a concentração de 24% de etanol no solvente extrator foi a mais eficaz para EQS (325,15 $\mu\text{mol Trolox/g}$), enquanto para SUPRA a de 33% alcançou o maior valor (223,16 $\mu\text{mol Trolox/g}$). No caso do ABTS, a concentração de 33% mostrou-se melhor para ETANÓLICO (1.528,05 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e EQS (1.554,72 $\mu\text{mol Trolox/g}$), enquanto SUPRA apresentou um desempenho maior na de 24% (1.418,91 $\mu\text{mol Trolox/g}$). Para os fenólicos totais, a concentração de 24% foi a mais eficiente, destacando-se para SUPRA (856 EAG/g) e também apresentando bons resultados para ETANÓLICO (635 mg EAG/g).

Já na análise de fotoproteção (FPS), a concentração de 24% foi a de melhor desempenho para SUPRA (FPS de 15,29), enquanto para ETANÓLICO a de 33% mostrou-se mais eficaz (FPS de 6,4).

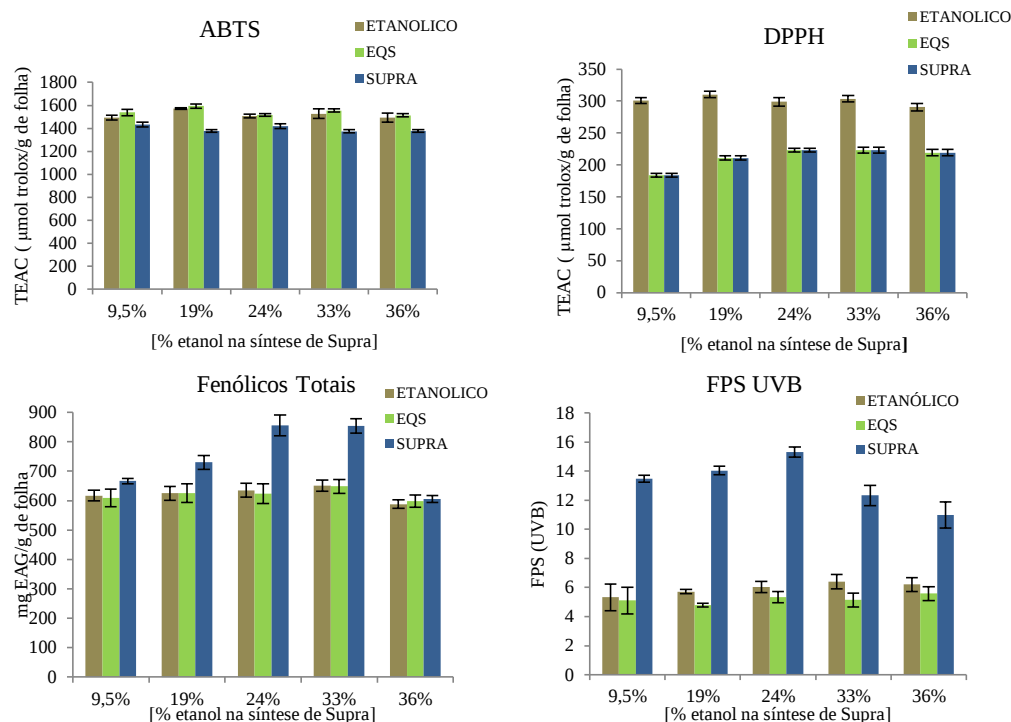


Figura 1: Atividade Antioxidante, Fenólicos Totais e FPS.

De maneira geral, o solvente extrator com 24% de etanol apresentou os resultados mais consistentes para otimização de múltiplas propriedades, especialmente para SUPRA, onde alcançou os melhores valores em fenólicos totais e FPS. Assim a concentração de 24% em etanol para o SUPRA foi eleita para dar continuidade a outros ensaios, pensando na possibilidade de desenvolver futuramente uma formulação fotoprotetora com atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é amplamente definida como um dos principais indicadores do seu potencial bioativo (Dayal et al, 2024). No presente estudo, observa-se que o SUPRA apresentou maior teor de fenólicos totais em relação ao extrato etanólico, porém com menor atividade antioxidante, avaliada pelos métodos ABTS e DPPH. Essa aparente discrepância pode ser explicada por fatores estruturais das moléculas que influenciam diretamente na ação antioxidante, bem como pela disponibilidade dos compostos fenólicos em cada matriz.

O extrato etanólico apresentou uma atividade antioxidante superior, o que pode ser atribuído à maior disponibilidade imediata dos compostos bioativos. Neste extrato, os compostos fenólicos podem estar na forma livre, solúveis e prontos para interagir diretamente com radicais livres. A ausência de barreiras físicas ou químicas no extrato etanólico pode permitir que esses compostos reajam de forma rápida e eficiente,

maximizando os valores de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) obtidos nos ensaios, somado ao fato da presença de metabólitos antioxidantes hidrofílicos com maior afinidade as soluções aquosas. Costa e seus colaboradores (2023) avaliaram diversas misturas de etanol:água para extrair compostos fenólicos de subprodutos vinícolas, tornando-os solúveis e disponíveis para interação com radicais livres. O estudo destacou que os melhores resultados para o conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante foram alcançados com uma proporção de 50:50 etanol: água, sugerindo que os compostos fenólicos desse extrato estão de fato em uma forma livre, prontos para interagir com os radicais livres devido à sua solubilidade.

Em contrapartida, no SUPRA, apesar do maior teor de fenólicos totais, a atividade antioxidante foi inferior. Essas características podem ser explicadas pelo “encapsulamento” dos compostos fenólicos na matriz do sistema, o que limita sua disponibilidade imediata. Os sistemas supramoleculares, como o SUPRA, são projetados para proteger e liberar compostos bioativos de forma controlada, mas essa característica também pode restringir a interação direta dos fenólicos com os radicais livres em ensaios químicos *in vitro*. Além disso, a matriz lipídica ou polimérica do SUPRA pode formar interações químicas ou físicas com os compostos fenólicos, como ligações hidrofóbicas ou de hidrogênio, interferindo na sua reatividade e influenciando, em última instância, sua atividade antioxidante (Casadey et al.2020; Lazar et al., 2024).

Outro aspecto relevante é que, no processo de “encapsulamento” ou formação do sistema SUPRA, alterações estruturais podem ocorrer nos compostos bioativos. Essas mudanças podem mascarar os grupos funcionais responsáveis pela atividade antioxidante, como os grupos hidroxila dos fenólicos, e interferir na sua eficácia em neutralizar radicais livres. Além disso, os compostos “encapsulados” podem apresentar solubilidade reduzida em meios predominantemente aquosos, como os utilizados nos ensaios de DPPH, impactando nos níveis dos resultados de atividade antioxidante (Peixoto et al., 2022).

Uma terceira possibilidade pode ser a extração seletiva de compostos com menor atividade antioxidante, mas embora o sistema SUPRA tenha apresentado menor atividade antioxidante *in vitro*, seu maior teor de fenólicos totais e fator de proteção demonstra o sucesso do solvente extrator na concentração e preservação desses compostos bioativos multifuncionais. É importante ressaltar que, em aplicações práticas, como cosméticos ou produtos alimentícios funcionais, o “encapsulamento” pode oferecer vantagens significativas, incluindo maior estabilidade dos compostos

frente a condições ambientais adversárias e liberação gradual, prolongando sua eficácia. Assim, os resultados reforçam a necessidade de considerar não apenas o teor absoluto de compostos bioativos, mas também a sua disponibilidade funcional e o contexto de aplicação para uma avaliação mais completa do desempenho antioxidante (Xia et al., 2024; Ozkan et al., 2024; Cuomo et al., 2022).

Portanto, os dados encontrados sugerem que a escolha entre o extrato etanólico e o sistema SUPRA deve ser guiada pelo objetivo específico da aplicação. Embora o extrato etanólico seja mais adequado para aplicações que exigem alta atividade antioxidante imediata, o sistema SUPRA pode ser preferido em situações em que a estabilidade e a liberação controlada sejam fatores críticos. Essa abordagem destaca a importância de integrar análises complementares para compreender completamente o comportamento dos compostos bioativos em diferentes matrizes.

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela 7 estão reunidos os resultados de atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de *Lippia thymoides* (Etanólico, EQS e SUPRA) a 24% de etanol contra três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. A atividade antimicrobiana foi avaliada em termos de determinação da concentração inibitória mínima expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$), equivalentes à massa de folha seca utilizada na preparação.

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em $\mu\text{g/mL}$ equivalente à folhas secas de *Lippia thymoides* contra Diferentes Microrganismos

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$ de folhas secas de <i>L. thymoides</i>)		
	ETANOLICO	EQS	SUPRA
<i>Staphylococcus aureus</i>	939	3.750	48
<i>Escherichia coli</i>	939	1.875	48
<i>Salmonella</i> sp	S/A	S/A	93

Legenda: S/A- Sem Atividade

Contra *Staphylococcus aureus*, o extrato ETANÓLICO apresentou CIM de 939 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o EQS foi menos eficaz, com um valor de 3.750 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, o SUPRA destacou-se com uma CIM de 48 $\mu\text{g/mL}$, indicando uma atividade antimicrobiana significativamente superior. Essa diferença pode ser atribuída à maior

biodisponibilidade e à potencialização da ação do princípio ativo conferida pelo SUPRA, que favorece o direcionamento e a interação com o microrganismo.

Em relação a *Escherichia coli*, o extrato etanólico manteve a mesma eficácia observada para *S. aureus* (CIM de 938 µg/mL), enquanto o EQS apresentou melhor desempenho (1.875 µg/mL). No entanto, assim como no caso anterior, o SUPRA demonstrou a menor CIM (48 µg/mL), reforçando sua eficiência superior. Esses resultados sugerem que o SUPRA possui uma alta eficácia tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, evidenciando sua versatilidade como agente antimicrobiano.

No caso de *Salmonella* sp, os extratos ETANÓLICO e EQS não apresentaram atividade antimicrobiana, conforme indicado pela ausência de valores de CIM. Em contraste, a o SUPRA mostrou-se eficaz, com uma CIM de 93 µg/mL. Esse resultado é especialmente relevante, uma vez que *Salmonella* representa um patógeno de importância em saúde pública, frequentemente associado a surtos de infecção alimentar. A eficácia do SUPRA onde os extratos convencionais falharam destaca seu diferencial.

De forma geral, os dados apontam para a superioridade do SUPRA em relação aos demais, demonstrando maior eficiência e amplitude de ação. Essa performance pode ser atribuída às propriedades do SUPRA, que favorecem a estabilidade, a penetração celular e a liberação controlada dos compostos ativos. Assim, os resultados reforçam o potencial de SUPRA como uma alternativa inovadora e promissora no controle de microrganismos patogênicos, oferecendo vantagens significativas para aplicações antimicrobianas em diferentes contextos.

Os resultados obtidos neste estudo, ao avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes preparações de *Lippia thymoides*, destacam-se em relação aos resultados relatados para outras espécies do gênero *Lippia*, que também apresentam atividades antimicrobianas notáveis, especialmente devido à composição de seus óleos essenciais. Estudos anteriores demonstraram que espécies como *Lippia javanica*, *Lippia origanoides*, *Lippia berlandieri* e *Lippia sidoides* exibem atividades antimicrobianas relacionadas à presença de compostos bioativos como timol, carvacrol e outros terpenos. (Asowata-Ayodele; Olowolaju, 2024; Zacarias et al., 2024; Gracia-Valenzuela et al., 2022).

No entanto, outro estudo sobre o óleo essencial de *Lippia origanoides* não encontrou atividade antibacteriana significativa contra bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, sugerindo variabilidade

na eficácia dependendo das cepas bacterianas e possivelmente da composição do óleo (Zacarias et al., 2024). Os óleos essenciais de *Lippia berlandieri*, com alto teor de timol e carvacrol, também exibiram atividade antimicrobiana significativa contra várias bactérias, superando vários antibióticos em alguns casos (Gracia-Valenzuela et al., 2022). Além disso, o óleo essencial de *Lippia sidoides* tem sido eficaz contra o *Mycobacterium tuberculosis*, indicando seu potencial como agente bactericida contra esse patógeno (Mota et al., 2018). As propriedades antimicrobianas das espécies de *Lippia* são atribuídas à sua rica composição de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos como timol e carvacrol, que interrompem as membranas celulares microbianas e inibem o crescimento (Gracia-Valenzuela et al., 2022; Trindade et al., 2021). Essas descobertas ressaltam o potencial dos óleos essenciais de *Lippia* como agentes antimicrobianos alternativos, embora sua eficácia possa variar com base nas cepas microbianas específicas e na composição química dos óleos.

Portanto, os dados do presente estudo corroboram e expandem o conhecimento existente sobre o gênero *Lippia*, enfatizando o impacto das metodologias inovadoras, como a nanoencapsulação, no aumento da eficácia antimicrobiana. Essas descobertas reforçam o potencial de *Lippia thymoides* e de suas preparações nanoestruturadas como agentes promissores para o controle de microrganismos em diferentes contextos clínicos e industriais.

3.5 DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

Os resultados obtidos a partir da análise DLS (Dynamic Light Scattering) (Tabela 8) das amostras de síntese do solvente supramolecular, antes (controle) e após a extração em diferentes concentrações de etanol (9,5; 19; 24; 33 e 36%), bem como suas distintas fases estão reunidas na tabela 32. Os solventes de equilíbrio após a extração (EQS) e antes da extração (EQS C), bem como os respectivos solventes supramoleculares SUPRA e o controle SUPRA C (sem folha) apresentaram diferenças no comportamento em relação ao tamanho médio das partículas e ao índice de polidispersidade (PI), permitindo inferir sobre a distribuição e uniformidade do tamanho das partículas em cada amostra.

Tabela 8: Análise de Tamanho de Partículas e Polidispersividade por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

[% etanol]	AMOSTRAS	MEDIA (nm)	PI
9,5	EQS	2568,13	0,21
	EQSC	314,70	0,59
	SUPRA	3783,71	1
	SUPRA C	565,06	0,28
19	EQSC	2285,70	0,17
	EQS	4000	0,79
	SUPRA	479,60	0,39
	SUPRA C	181,49	1
24	EQSC	806,62	0,24
	EQS	2540,89	0,34
	SUPRA	218,06	0,4
	SUPRA C	180,29	0,31
33	EQS	2430,51	0,23
	EQSC	998,52	0,76
	SUPRA	5591,48	0,84
	SUPRA C	13,94	0,48
36	EQS	2781,08	0,25
	EQSC	829,40	0,71
	SUPRA	6191,59	0,61
	SUPRA C	293,97	0,67

Legenda: Solvente de Equilíbrio após a extração (EQS), Solvente de Equilíbrio Controle, antes da extração (EQS C), Solvente Supramolecular após a extração (SUPRA) e Supramolecular Controle (SUPRA C). Os valores de tamanho hidrodinâmico médio (nm) foram obtidos por DLS (Dynamic Light Scattering), com base na distribuição de intensidade da luz espalhada (Intensity-weighted Z-Average). O índice de polidispersidade (PI) indica a dispersão dos tamanhos das partículas na amostra.

Como pode ser observado na Tabela 8, a concentração de etanol na síntese do solvente supramolecular SUPRA C influencia significativamente o tamanho das gotículas formadas. O tamanho médio diminuiu à medida que a concentração de etanol aumentou, variando de 565,06 nm em 9,5% para 13,94 nm em 33%, voltando a aumentar em concentrações mais elevadas. Esse comportamento pode ser explicado por dois mecanismos principais: a redução da tensão interfacial entre as fases aquosa e lipofílica e o aumento da solubilidade dos componentes lipofílicos, como o ácido octanóico. A diminuição da tensão interfacial facilita a formação de gotículas menores, pois menos energia é necessária para criar novas interfaces (Ferreira et al., 2019). Além disso, o aumento da solubilidade do ácido octanóico na fase aquosa reduz sua tendência de autoagregação, promovendo partículas menores e mais estáveis (Htet et al., 2015).

O índice de polidispersão (PI), que indica a heterogeneidade do tamanho das partículas, foi inferior a 0,67 para SUPRA C, sugerindo uma certa uniformidade do sistema. Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO), valores de PI menores que 0,05 correspondem a amostras monodispersas, enquanto valores superiores a 0,7 indicam distribuição heterogênea de tamanho de partículas (ISO, 2008). Uma tendência semelhante em relação ao tamanho médio foi observada para a outra fase, a solução de equilíbrio EQS C, embora com índices de polidispersão mais elevados, indicando menor uniformidade nas dimensões das gotículas.

Por outro lado, embora a adição de etanol contribua para a redução do tamanho das gotículas, concentrações excessivamente altas podem comprometer a eficácia do surfactante e desestabilizar o sistema (Htet et al., 2015). Dessa forma, é necessário encontrar um equilíbrio na concentração de etanol que maximize a formação de gotículas pequenas e estáveis sem comprometer a integridade do sistema supramolecular.

Após a extração das folhas de *L. thymoides* houve um aumento no tamanho das gotículas em todas as concentrações de etanol e em ambas as fases SUPRA e EQS (Figura 10). Essa diferença pode ser atribuída a possível distribuição dos metabolitos de *L. thymoides* entre as duas fases e na interação dos metabólitos extraídos com o solvente extrator. O SUPRA oriundo de sínteses com 19 e 24% de etanol apresentaram índices de polidispersividade inferiores a 0,4 indicando que estes solventes, apresentam maior uniformidade nos tamanhos médios de suas gotículas, após a extração. Como mostrado na Figura 2, a análise dos resultados obtidos na caracterização do solvente supramolecular produzido com 24% de etanol e contendo metabólitos de *L. thymoides*.

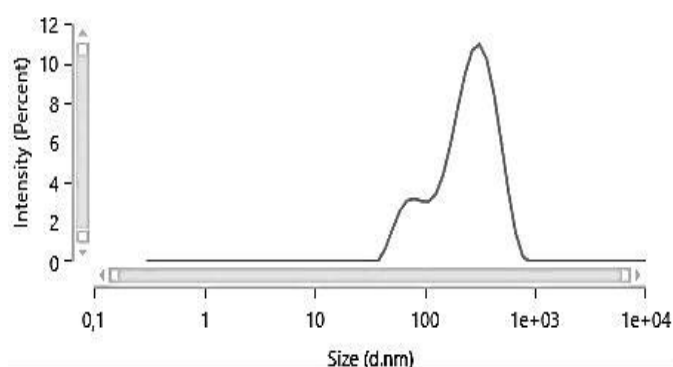


Figura 4: Distribuição de Tamanho de Partículas do SUPRA sintetizado com 24 % de etanol, após extração de folhas de *L. thymoides* por DLS.

Legenda: Distribuição de tamanho de partículas em termos de intensidade (%) (Intensity), obtida por espalhamento dinâmico de luz (DLS). O gráfico de intensidade reflete a contribuição relativa das partículas para o sinal medido.

No gráfico de intensidade, observou-se um pico alto centrado em ~ 218 nm, e um ombro em ~ 150 nm, indicando que algumas partículas maiores (agregados) contribuem significativamente para o espalhamento de luz. na amostra. A ausência de múltiplos picos ou caudas largas reforça a baixa presença de agregados ou partículas maiores, aspectos fundamentais para aplicações em sistemas de liberação controlada e fotoproteção.

Moradi e seus colaboradores (2013) investigaram agregados nanométricos formados por micelas e vesículas de microextração em fase líquida assistida por ultrassom com base em um solvente supramolecular nanoestruturado. Nesse estudo as distribuições de intensidade apresentaram picos em torno de 1–2 nm, associados a micelas, e aproximadamente 100 nm, atribuídos a vesículas. Apesar das vesículas representarem uma proporção numérica quase insignificante, sua contribuição para o espalhamento de luz foi significativa, alcançando 30% da intensidade medida. Esse comportamento destaca a sensibilidade da análise de intensidade a partículas maiores, mesmo quando estas estão em menor quantidade, fenômeno também observado no presente estudo.

A correlação entre o Fator de Proteção Solar (FPS) e o tamanho médio das partículas obtido por DLS revelou tendências para ambas as amostras estudadas (EQS e SUPRA). Para as partículas EQS, o coeficiente de correlação de Pearson foi de -0,638, indicando uma correlação moderada e negativa. Já para as partículas SUPRA, o coeficiente de correlação foi de -0,928, apontando para uma correlação forte e negativa. Esses resultados sugerem que, em ambos os sistemas, o aumento do FPS está associado à redução no tamanho médio das partículas.

Esse comportamento pode ser explicado pelas características físico-químicas das partículas formadas. O FPS reflete a capacidade das partículas de absorver ou bloquear a radiação UVB, que é diretamente influenciada pela composição química, pela uniformidade da superfície e pelo tamanho das partículas. Em sistemas menores, a maior área superficial específica pode favorecer a interação com moléculas fotoprotetoras, aumentando o FPS. No caso das partículas SUPRA, a correlação mais acentuada (-0,928) reforça a hipótese de que as condições de síntese, moduladas pelo teor de etanol, desempenham um papel fundamental na definição do tamanho e, consequentemente, na eficácia fotoprotetora.

Foi demonstrado que nanopartículas menores, como nanopartículas de prata (AgNPs) na faixa de tamanho de 10-40 nm, protegem efetivamente os queratinócitos

humanos contra danos ao DNA induzidos por UVB e apoptose, destacando o papel crítico do tamanho no aumento da eficácia fotoprotetora (Palanki et al., 2015). Isso ocorre porque partículas menores têm uma área superficial específica maior, o que facilita uma melhor interação com moléculas fotoprotetoras, aumentando assim o FPS (Sun et al., 2011). Por exemplo, os átomos superficiais de pequenas nanopartículas de metal podem formar ligações químicas com moléculas de cobertura, alterando a densidade eletrônica e influenciando suas capacidades de proteção UVB (Popov et al., 2005; Popov et al., 2006).

Em suma, os resultados destacam a influência das condições de síntese dos solventes supramoleculares no tamanho médio das partículas e na eficácia fotoprotetora. A forte correlação negativa no SUPRA sugere que ajustes nos parâmetros de síntese, como o teor de etanol de 24%, leva a uma otimização no desempenho fotoprotetor desses materiais.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o equipamento JEOL JEM 2800 operando a 200 kV, revelam variações morfológicas significativas entre os sistemas supramoleculares analisados, com e sem adição de extrato de *Lippia thymoides*, refletindo a influência direta dos metabólitos extraídos na auto-organização e comportamento das nanopartículas.

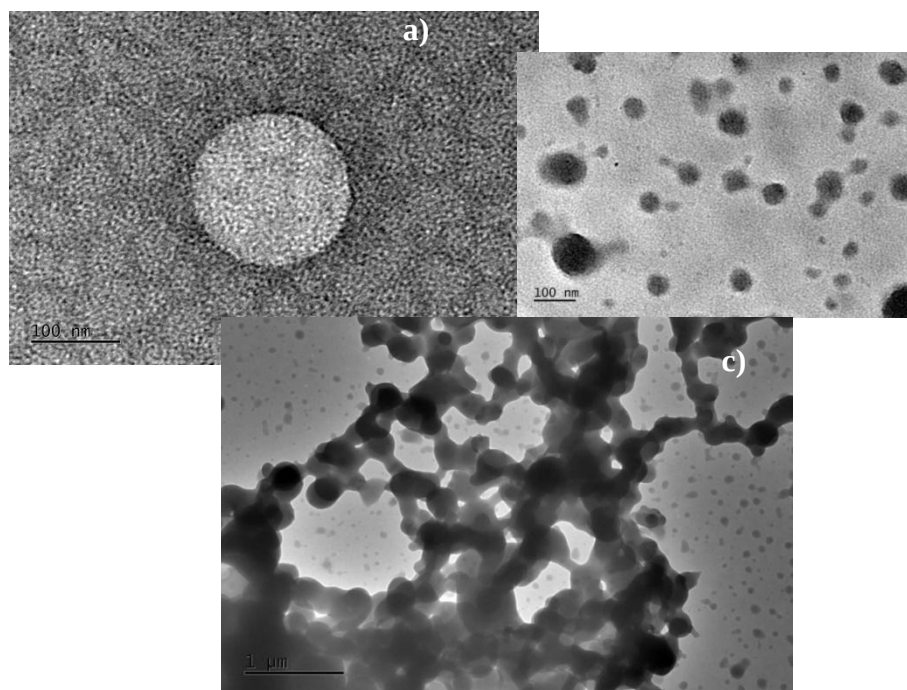


Figura 3: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o equipamento JEOL JEM 2800 operando a 200 kV. **Legenda:** a) Supra sem extrato; b) e c) Supra com extrato de *L.thymoides*

O SUPRA sem extrato (imagem superior esquerda **(a)**) (Figura 3) a imagem MET revelam nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 100 nm e distribuição bastante uniforme no campo visual. As estruturas apresentam morfologia esférica bem definida, com núcleo central denso e bordas regulares, compatíveis com micelas esféricas ou vesículas unilamelares formadas pela autoassociação de ácido octanoico em meio hidroalcoólico sob pH ácido (Jin et al., 2019).

A dispersão homogênea das partículas e a baixa evidência de agregação indicam a presença de repulsão eletrostática eficaz, provavelmente mediada por cargas superficiais ou por barreira estérica adequada, favorecendo a coerência estrutural e estabilidade coloidal (Ji et al., 2024; Jin et al., 2019). Essa estabilidade é essencial para que a formulação funcione como extratora seletiva de metabólitos anfifílicos, como flavonoides e compostos fenólicos, os quais possuem reconhecida atividade fotoprotetora (Chaurasiya; Kulhari, 2024).

Nas imagens **b** superior direita e inferior (Figura 3) representam o MET do SUPRA com extrato de *Lippia thymoides*. Após a extração, a formulação apresenta alterações significativas em sua organização supramolecular. A imagem superior direita mostra nanopartículas com variabilidade de tamanhos entre 50–150 nm, com distribuição menos homogênea. Já a imagem inferior revela a presença de estruturas maiores e irregulares, algumas ultrapassando 1 µm de diâmetro, indicando a formação de agregados supramoleculares complexos.

A morfologia se altera com a perda da esfericidade típica, substituída por estruturas ramificadas, redes ou clusters micelares com bordas menos definidas, o que sugere interferência na montagem supramolecular causada pelos metabólitos vegetais. A dispersão torna-se heterogênea, com aglomerações visíveis, especialmente na imagem inferior **(c)**. Esses achados apontam para uma repulsão eletrostática reduzida, possivelmente devido à neutralização parcial de cargas ou interações específicas entre compostos polares do extrato e a superfície das nanopartículas.

Ainda assim, as imagens indicam uma coesão estrutural interna significativa, com formação de redes contínuas e domínios escuros interconectados, que podem corresponder a vesículas multilamelares, agregados micelares densos ou estruturas gelificadas. Tais características são compatíveis com uma reorganização supramolecular

em presença de co-estruturantes, neste caso, os compostos bioativos de *L. thymoides* atuando como moduladores de montagem supramolecular (Bai et al., 2023).

A despeito de uma aparente perda de estabilidade coloidal, a formulação contendo extrato vegetal demonstrou atividade fotoprotetora significativamente superior nos testes *in vitro*, sugerindo que a eficácia pode ser atribuída à formação de barreiras físicas densas à radiação UV por meio dos aglomerados supramoleculares, além da ação antioxidante e fotoprotetora intrínseca dos metabólitos. Tal comportamento é coerente com o que foi relatado por Wei et al. (2024), ao descrever a formação de vesículas multilamelares densas a partir da co-montagem de zwitterions e polioxometalatos, que atuam como escudos físicos frente à radiação ultravioleta.

Além disso, estudos como os de Granata et al. (2016) e Reilly et al. (2024) apontam que flavonoides e outros compostos fenólicos, amplamente encontrados em extratos vegetais, formam redes supramoleculares ordenadas, capazes de encapsular, estabilizar e modular bioativos, aumentando sua biodisponibilidade e funcionalidade em sistemas aquosos. Essa arquitetura permite à formulação desempenhar uma dupla função: carreamento e estabilização de metabólitos antioxidantes e fotoprotetores e formação de uma barreira física superficial sobre os tecidos vegetais, atenuando os efeitos deletérios da radiação solar (Moyer et al., 2014; Voorhaar; Hoogenboom, 2016).

Por fim, embora a dinamicidade das interações não covalentes que sustentam as estruturas supramoleculares possa representar um desafio em termos de estabilidade, ela também confere à formulação versatilidade adaptativa, essencial para o desempenho em diferentes microambientes biológicos (Ghosh et al., 2023; Tellini et al., 2007). Tais propriedades reafirmam o potencial das estruturas supramoleculares como uma estratégia eficiente e funcional na fotoproteção vegetal.

3.7 TESTE DE TOXICIDADE

Os resultados obtidos no teste de toxicidade utilizando *Artemia salina* Leach indicaram que o SUPRA não apresentou efeitos tóxicos em nenhuma das concentrações testadas, que variaram de 50 µg/mL a 1000 µg/mL. Em todas as concentrações, a mortalidade da *A. salina* foi de 0%, indicando que o SUPRA não exerce efeito letal sobre o organismo nas concentrações avaliadas. Esses resultados indicam que o SUPRA possui um alto grau de segurança para espécies aquáticas, como *A. salina*, no intervalo de concentrações treinadas. A ausência de mortalidade nas concentrações mais altas sugere que, em termos de toxicidade para organismos aquáticos, SUPRA pode ser

considerado seguro. Contudo, é fundamental que esses resultados sejam complementados por estudos adicionais, que envolvam diferentes organismos e condições ambientais, para garantir que a composição não apresente efeitos adversos em ecossistemas mais complexos. Em suma, os dados preliminares sugerem que o SUPRA tem baixa toxicidade, o que a torna promissora para aplicações em áreas que excluem segurança ambiental.

4 CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho evidenciam o alto potencial da *Lippia thymoides* quanto às suas propriedades antioxidantes, fotoprotetoras e antimicrobianas, destacando-a como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de formulações com aplicações cosméticas e terapêuticas. Entre as formulações testadas, a preparada com 24% de etanol demonstrou desempenho superior em diversas propriedades funcionais, com destaque no sistema supramolecular (SUPRA), principalmente pela concentração elevada de compostos fenólicos e pelo elevado fator de proteção solar (FPS).

As correlações estatísticas obtidas demonstraram que o método de preparação impacta diretamente a performance final da formulação. No SUPRA, foi observada uma relação positiva entre os níveis de fenólicos e o FPS, bem como uma forte correlação inversa entre o tamanho médio das partículas e o FPS UVB, indicando que partículas menores contribuem significativamente para o aprimoramento da ação fotoprotetora.

Nos ensaios de atividade antimicrobiana, o sistema SUPRA mostrou resultados expressivos, com as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, quando comparado aos extratos obtidos por métodos convencionais. Esse desempenho pode estar relacionado à maior solubilidade e eficácia dos compostos ativos disponibilizados pela estrutura supramolecular.

Adicionalmente, os testes de toxicidade utilizando *Artemia salina* confirmaram a segurança da formulação SUPRA, uma vez que não foram observados efeitos tóxicos mesmo nas maiores concentrações avaliadas. Tal resultado reforça a viabilidade de seu uso em formulações voltadas tanto para o cuidado humano quanto para aplicações ambientalmente seguras.

Assim, o sistema SUPRA se consolida como uma formulação versátil e eficaz, aliando segurança toxicológica, alta atividade biológica e potencial de aplicação em diversas áreas. Estudos complementares devem explorar sua estabilidade em formulações comerciais e realizar análises químicas avançadas, como HPLC e LC-MS, para identificação precisa dos compostos bioativos. Investigar sua compatibilidade com outros componentes também será fundamental para ampliar seu campo de uso e confirmar sua aplicabilidade em escala industrial e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ANTONIK, D. et al. **Impact of Ultraviolet Radiation on the Skin and the Role of Photoprotection – The Review of the Literature.** *Journal of Education, Health and Sport*, 2023. doi: 10.12775/jehs.2023.37.01.007.
- ARRUDA, R. L. et al. **Natural Photoprotectors: A Literature Review.** *Research, Society and Development*, 2021. doi: 10.33448/RSD-V10I5.14603.
- ASOWATA-AYODELE, A. M., OLOWOLAJU, E. **Antimicrobial activities of *Lippia javanica* from Eastern Cape Province of South Africa.** 2024. doi: 10.21203/rs.3.rs-4467391/v1
- AYAD, R; LEFAHAL, M; MAKHLOUFI, E.; AKKAL, S. **Photoprotection strategies with antioxidant extracts: a new vision.** *Physical Sciences Reviews*, 2023. doi: 10.1515/psr-2022-0313.
- BAI, D. et al. **High stability and low irritation of retinol propionate and hydroxypinacolone retinoate supramolecular nanoparticles with effective anti-wrinkle efficacy.** *Pharmaceutics*, v. 15, n. 3, p. 731, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030731>. Acesso em: 12 maio 2025.
- BOOTS. **The Revised Guideliness to the Practical Measurement of UVA:UVB Ratios According to The Boots Star Rating System.** Nottingham: The Boots CO PLC, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 30, de 1º de junho de 2012.** Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 04 jun. 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html. Acesso em: 5 maio 2025.
- CANTON, M. et al. **Dereplication of natural extracts diluted in propylene glycol, 1,3-propanediol, and glycerin: comparison of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) extracts as a case study.** *Cosmetics*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2021. DOI: 10.3390/cosmetics8010010.
- CASADEY, R. G. et al. **Controlled Release Systems of Natural Phenolic Antioxidants Encapsulated Inside Biocompatible Hydrogels.** *Reactive & Functional Polymers*, 2020, 156:104729-. doi: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2020.104729.
- CHAURASIYA, S.; KULHARI, H. **Supramolecule-mediated delivery of phytochemicals.** In: _____ (Ed.). *[S.l.]*, 2024. p. 169-191. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-99-5314-1_6. Acesso em: 12 maio 2025.

CLSI. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A10**, 10 ed., Wayne, PA, USA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2015.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast**. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA, USA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2016.

COSTA, MATHEUS MATOS DA; FARIAS, ANA PAULA ANDRADE; OLIVEIRA, CÉSAR AUGUSTO BATASINI DE. **A importância dos fotoprotetores na minimização de danos à pele causados pela radiação solar / The importance of photoprotectors in minimizing skin damage caused by solar radiation**. *BJDSM*, 2021. doi: 10.34117/BJDV7N11-011.

COSTA, R. D. et al. **Exploring the Antioxidant Potential of Phenolic Compounds from Winery By-Products by Hydroethanolic Extraction**. *Molecules*, 2023. doi: 10.3390/molecules28186660.

CUOMO, F. et al. **Progress in colloid delivery systems for protection and delivery of phenolic bioactive compounds: Two study cases—hydroxytyrosol and curcumin**. *Molecules*, 2022, **27**(3):921. doi: 10.3390/molecules27030921.

DAYAL, B. et al. **Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds**. 2024. DOI: 10.14233/ajomc.2023.ajomc-p28926.

DESSALEGN, E. **Effect of extraction solvents on total phenolic contents and *in vitro* antioxidant activity of the leaves of *Lippia adoensis* var. *Koseret* Sebsebe**. *Food Science and Quality Management*, v. 94, p. 29-37, 2020. Disponível em: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/FSQM/article/view/51410/53130>. Acesso em: 7 maio 2025.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. **Correlation Between Sun Protection Factor and Antioxidant Activity, Phenol, and Flavonoid Contents of Some Medicinal Plants**. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2014. doi: 10.22037/IJPR.2014.1554.

FIJAK, E; POLAŃSKA, A. **Current principles of photoprotection**. *Journal of Face Aesthetics*, 2023. doi: 10.20883/jofa.61.

GARCÍA-BORES, A. M. et al.. ***Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, **167**:72-81. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.12.014.

GARIGLIO, M. A. et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/5140?show=full>.

GAWEL-BĘBEN, K. et al. **Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics**. *Antioxidants*, v. 9, n. 3, p. 202, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9030202>.

GHAFFAR, N.; PERVEEN, A. **Solvent polarity effects on extraction yield, phenolic content, and antioxidant properties of *Malvaceae* family seeds: a comparative study.** *New Zealand Journal of Botany*, p. 1–11, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2024.2392705>. Acesso em: 7 maio 2025.

GHOSH, D. et al. **Fine-tuning supramolecular assemblies by controlling micellar aggregates.** *Macromolecular Materials and Engineering*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mame.202300082>. Acesso em: 7 maio 2025.

GOMES, J. M. et al. **Seasonal Variations of Polyphenols Content, Sun Protection Factor, and Antioxidant Activity of Two Lamiaceae Species.** *Pharmaceutics*, 2021. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13010110.

GONZALEZ, A.; COSTA, M.; SIGNOR, A. **Desenvolvimento sustentável: perspectivas e desafios para a sociedade moderna.** *International Journal of Environmental Resilience Research and Science*, v. 2, n. 2, dez. 2020. DOI: 10.48075/ijerrs.v2i2.26260.

GOSWAMI, N. **Sustainability: the green cosmetic brands for eco-friendly transformation.** *Research Review International Journal of Multidisciplinary*, v. 9, n. 3, 2024. DOI: 10.31305/rrijm.2024.v09.n03.025.

GRACIA-VALENZUELA, M. H. et al.. **Avaliação *in vitro* do Antimicro O essencial de orégano (*Lipia berlandieri*)** *Revista Bio Ciências*, 2022. doi: 10.15741/revbio.09.e1344.

GRANATA, G. et al. **Supramolecular assembly of a succinyl-calix[4]arene derivative in multilamellar vesicles.** *Supramolecular Chemistry*, v. 28, p. 377–383, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10610278.2015.1098639>. Acesso em: 7 maio 2025.

HASHEMI, Z., EBRAHIMZADEH, M. A., KHALILI, M. **Sun protection factor, total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of medicinal plants from Iran.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2021. doi: 10.4314/TJPR.V18I7.11

HTET, A. N. et al. **Surface activity of octanoic acid in ethanol-water solutions from molecular simulation and experiment.** *Journal of Chemical Physics*, v. 142, n. 8, p. 084702, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4908539>. Acesso em: 18 ago. 2025.

HUANG, F.; ANSLYN, E. V. **Introduction: supramolecular chemistry.** *Chemical Reviews*, v. 115, n. 15, p. 6999–7000, 2015. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00352.

HUBNER, A. et al. **The Synergistic Behavior of Antioxidant Phenolic Compounds Obtained from Winemaking Waste's Valorization Increased the Efficacy of a Sunscreen System.** *Antioxidants*, 2019. doi: 10.3390/ANTIOX8110530

ISO. **INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 22412:2008 - Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS).** Geneva: International Organization for Standardization, 2008.

JAAFREH, AL. A. M. **Evaluation of antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and different types of solvent extractions.** *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.13005/bpj/2860>. Acesso em: 7 maio 2025.

Jl, X. et al. **Tuning the morphology of supramolecular aggregates for nanocarrier-based drug delivery.** *AIChE Journal*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aic.18717>. Acesso em: 7 maio 2025.

JIN, X. et al. **Supramolecular nanoscale drug-delivery system with ordered structure.** *National Science Review*, v. 6, n. 6, p. 1128–1137, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz018>. Acesso em: 7 maio 2025.

KEDDAR, M. N. et al. **Efficient extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from microalgae with supramolecular solvents.** *Separation and Purification Technology*, v. 251, 2020, p. 117327. ISSN 1383-5866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117327>.

LAZAR, A. et al. **Bioactive Compounds Delivery and Bioavailability in Structured Edible Oils Systems.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2024. doi: 10.1111/1541-4337.70020.

LIMA, H. S; LUCCHESI, A. M; DE FREITA, M, M. **Atividade fotoprotetora de extratos e frações de *Lippia insignis*.** *Seminário Integrado de Iniciação Científica*, 2019. doi: 10.13102/SEMIC.V0I22.4010.

MANSUR, J. S. et al. **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.** *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 61, p. 121-124, 1986.

MEJÍA-GIRALDO, J. C., . et al. **Selected Extracts from High Mountain Plants as Potential Sunscreens with Antioxidant Capacity.** *Photochemistry and Photobiology*, 2021. doi: 10.1111/PHP.13490

MEYER B. N. et al. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents.** *Planta Medica* v. 45, p. 31-34, 1982.

MONSALVE-BUSTAMANTE, Y. et al. **Holistic Photoprotection, Broad Spectrum (UVA-UVB), and Biological Effective Protection Factors (BEPFs) from *Baccharis antioquiensis* Hydrolysates Polyphenols.** *Plants*, 2023. doi: 10.3390/plants12050979.

MORADI, M. et al. **Ultrasound-assisted liquid-phase microextraction based on a nanostructured supramolecular solvent.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. doi: 10.1007/S00216-013-6810-8.

MOTA, A. P. P. et al. **Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* Against *Mycobacterium tuberculosis*.** **CCiencia Rural*, 2018. doi: 10.1590/0103-8478CR20170697

MOYER, T. J. et al. **pH and amphiphilic structure direct supramolecular behavior in biofunctional assemblies.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 136, n. 42, p. 14746–14752, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja5042429>. Acesso em: 7 maio 2025.

OLIVEIRA JUNIOR, R. G. et al. **In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae).** *Journal of Applied Pharmaceutical Science* v. 3, p. 122-127, 2013.

OZKAN, G. et al. **Encapsulated phenolic compounds: clinical efficacy of a novel delivery method.** *Phytochemistry Reviews*, 2024. doi: 10.1007/s11101-023-09909-5.

PAIVA, M. S.; LUCENA, R. F. P. **Espécies nativas com potencial de uso farmacêutico da Caatinga para o Semiárido Brasileiro: uma revisão sistemática.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 22, n. 1, p. 51–64, 2020. DOI: 10.1590/1983-084X.

PALANKI, R. et al. **Size is an essential parameter in governing the UVB-protective efficacy of silver nanoparticles in human keratinocytes.** *BMC Cancer*, 2015. doi: 10.1186/S12885-015-1644-8

PEIXOTO, F. B. et al.. **Extraction and Encapsulation of Bioactive Compounds: A Review.** *Journal of Food Process Engineering*, 2022. doi: 10.1111/jfpe.14167.

PERES, D. D'. et al. **Ferulic Acid Photoprotective Properties in Association with UV Filters: Multifunctional Sunscreen with Improved SPF and UVA-PF.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.05.026

POLONINI, H. C. et al. **A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter.** *RSC Advances*, 4(107):62566-62575, 2014. doi: 10.1039/C4RA11577E.

POPOV, A. et al. **TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens.** *Journal of Physics D*, 2005. doi: 10.1088/0022-3727/38/15/006

POPOV, A. et al. **The effect of nanometer particles of titanium oxide on the protective properties of skin in the UV region.** *Journal of Optical Technology*, 2006. doi: 10.1364/JOT.73.000208

REILLY, C. B. et al. **Control of molecular biochemistry and cell injury responses through highly ordered supramolecular assembly of flavonoids.** *bioRxiv*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2024.04.03.587976>. Acesso em: 7 maio 2025.

ROJAS, J. et al. **The Health Benefits of Natural Skin UVA Photoprotective Compounds Found in Botanical Sources: Review Article.** *Journal Name*, 2015.

RUDOLPH, T. **UVA protection assessment of sunscreens: A critical review on the UVA-to-UVB absorbance ratio.** v. 130, n. 9, p. 28–35, 2004.

RUIZ, N. et al. **Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species.** *Photochemistry and Photobiology*, 2017. doi: 10.1111/PHP.12735.

SAGALA, Z.; PANJAITAN, R. S. **Determination of Total Phenolic Compounds and SPF (Sun Protection Factor) Value of Methanol Extract & Fraction Brotowali Leaves (*Tinospora crispa* L.).** *Indonesian Journal of Pharmaceutical Research*, 2023. doi: 10.31869/ijpr.v3i1.4589

SANTOS-NEVES, J. et al. **Green extraction of bioactive compounds from *Lippia thymoides* and its potential in cosmeceutical formulations.** *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 10, 2024.

SARIC, S., SIVAMANI, R. K. **Polyphenols and Sunburn.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. doi: 10.3390/IJMS17091521.

SAYRE, R. M. et al. **Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 29, p. 559-565, 1979.

SILLER-SÁNCHEZ, A. et al. **Solid-state fermentation-assisted extraction of flavonoids from grape pomace using co-cultures.** *Processes*, v. 12, n. 9, 2024. DOI: 10.3390/pr12092027. Acesso em: 7 maio 2025.

SILVA, F. S. et al. **Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*.** *Pharmaceutical Biology*, p. 4-6, 2015b.

SILVA, F.S. et al. **Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-10, 2015a.

SINGH, M. et al. **Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 9, p. 2070–2077, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1267-0>. Acesso em: 7 maio 2025.

SINGULANI, J. de L. et al. **Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species.** *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 6, n. 27, p. 4416–4422, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/JMPR12.533>. Acesso em: 7 maio 2025.

SOPEE, M. S. M.; AZLAN, A.; KHOO, H. E. **Comparison of antioxidants content and activity of *Nephelium mutabile* rind extracted using ethanol and water.** *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 13, n. 3, p. 1958-1963, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00114-7>.

SOUSA, B. et al. **Use of essential oils extracted from the Caatinga as an alternative for the treatment of infectious diseases and inflammation.** Seven Editora, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.56238/sevened2024.016-007>.

- SUN, Y. et al. **Surface chemistry: a non-negligible parameter in determining optical properties of small colloidal metal nanoparticles.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011. doi: 10.1039/C1CP20265K
- TELLINI, V. S. et al. **Supramolecular structures generated by a *p*-tert-butylphenyl-amide derivative of cholic acid: from vesicles to molecular tubes.** *Advanced Materials*, v. 19, n. 13, p. 1752–1756, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.200602581>. Acesso em: 7 maio 2025.
- TRINDADE, S. C. et al. **Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I9.18051.
- VALISAKKAGARI, H.; CHATURVEDI, C.; RUPASINGHE, H. V. **Green extraction of phytochemicals from fresh vegetable waste and their potential application as cosmeceuticals for skin health.** *Processes*, v. 12, n. 4, 2024. DOI: 10.3390/pr12040742. Acesso em: 7 maio 2025.
- VEIGA, L. F. et al. **Avaliação de faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao Lauril Sulfato de Sódio.** Rio de Janeiro: PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER, 1989. 64 p. il. (Projeto 04.05.27).
- VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) - revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.
- VOORHAAR, L.; HOOGENBOOM, R. **Supramolecular polymer networks: hydrogels and bulk materials.** *Chemical Society Reviews*, v. 45, n. 14, p. 4013–4031, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6cs00130k>. Acesso em: 7 maio 2025.
- WEI, P.; WANG, C.; SUN, N. **Co-assembled supramolecular organohydrogels of amphiphilic zwitterion and polyoxometalate with controlled microstructures.** *Molecules*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29102286>. Acesso em: 7 maio 2025.
- XIA, B.-H. et al. **Green and Efficient Extraction of Phenolic Components from Plants with Supramolecular Solvents: Experimental and Theoretical Studies.** *Molecules*, 2024, v. 29, p. 2067. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29092067>.
- ZACARIAS, R. M.A. et al. **Triagem antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* em bactérias Gram-negativas.** *Arquivos de Farmácia e Ciências Farmacêuticas*, 2024. doi:10.29328/journal.apps.1001053
- ZULKIFLI, K. S. et al. **Phytochemical screening and activities of hydrophilic and lipophilic antioxidant of some fruit peels (*Kajian Fito-kimia dan Aktiviti Hidrofilik dan Lipofilik Antioksidasi untuk Beberapa Kulit Buah*),** 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a extração verde de *Lippia thymoides* por fermentação e pelo uso de solvente supramolecular tem um grande potencial para a obtenção de insumos antioxidantes, fotoprotetores e antimicrobianos, sendo assim promissor para uso em formulações cosméticas.

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a escolha do *Lacticaseibacillus rhamnosus* como a cepa mais adequada para os experimentos de fermentação, devido ao seu excelente desempenho nos testes de atividade antioxidante, especialmente no método de sequestro do DPPH, e à consistência observada no método de captura de ABTS. A concentração inicial de *L. rhamnosus* mais eficaz foi determinada em 10^4 UFC/mL, com base na sua superioridade no teste de sequestro de DPPH. Além disso, o tempo de 24 horas foi considerado ideal para os experimentos subsequentes, uma vez que resultou no maior percentual de inibição de DPPH, evidenciando a importância da otimização dos parâmetros experimentais para alcançar resultados mais robustos e representativos. De modo geral, a fermentação demonstrou ser uma estratégia eficaz para potencializar a atividade antioxidante dos extratos de *L. thymoides*. Além disso, a aplicação do Delineamento Composto Central (DCCr) se mostrou uma ferramenta valiosa no planejamento experimental, permitindo a identificação das condições ótimas e a obtenção de resultados mais robustos e confiáveis.

No que diz respeito à análise toxicológica, os resultados do teste de toxicidade com *Artemia* indicaram que tanto o chá quanto o fermentado de *L. thymoides* apresentaram efeitos tóxicos, embora o fermentado tenha mostrado uma menor toxicidade em comparação ao chá, com uma CL₅₀ de 229,26 µg/mL. Esse dado sugere que, embora ambos os extratos apresentem algum grau de toxicidade, o processo de fermentação pode atenuar esse efeito. Portanto, os dados obtidos ao longo do estudo não só reforçam a viabilidade de *L. rhamnosus* como um candidato promissor para estudos futuros, mas também demonstram a importância da otimização das condições de extração e fermentação para maximizar os benefícios antioxidantes de *L. thymoides*. O próximo passo será a exploração de estratégias para minimizar a toxicidade dos extratos, tornando-os ainda mais adequados para aplicações em cosméticos e outras áreas de saúde.

No que se refere a extração com solvente supramolecular, os resultados deste estudo demonstraram que a formulação com teor de etanol a 24% apresentou os

resultados mais consistentes para a otimização de múltiplas propriedades, destacando-se os valores em fenólicos totais e fator de proteção solar (FPS) mais elevados. A análise de correlação revelou que o método de síntese influencia diretamente a relação entre fenólicos totais e FPS. No SUPRA, a correlação moderada e positiva (0,56) sugere uma associação significativa entre o aumento de fenólicos totais e a elevação do FPS. Além disso, a forte correlação negativa entre o FPS UVB e o tamanho médio das partículas no sistema SUPRA (-0,928) destaca a relevância da redução do tamanho das partículas para o aprimoramento da eficácia fotoprotetora. Esse achado reforça a importância de ajustes precisos nos parâmetros de síntese para otimização do desempenho.

Nos testes antimicrobianos, o SUPRA demonstrou uma atividade significativamente superior em comparação aos outros métodos. Apresentou as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) tanto contra *Staphylococcus aureus* (48 µ/mL) quanto contra *Escherichia coli* (48 µ/mL), superando o extrato etanólico e o EQS. No caso de *Salmonella* sp, os extratos etanólico e EQS não apresentaram atividade antimicrobiana. Em contraste, o SUPRA mostrou-se eficaz, com uma CIM de 93 µg/mL. A eficácia do SUPRA onde os extratos convencionais falharam destaca seu potencial diferencial.

Essa eficácia pode ser atribuída à maior biodisponibilidade e à potencialização da ação do princípio ativo conferida pelo SUPRA, que favorece a interação com os microrganismos. A versatilidade do SUPRA como agente antimicrobiano foi evidenciada por sua alta eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Por fim, o teste de toxicidade utilizando *Artemia* confirmou que o SUPRA não apresentou efeitos tóxicos em nenhuma das concentrações testadas, com mortalidade de 0% em todas as condições avaliadas. Esse resultado ressalta a segurança do composto SUPRA para organismos aquáticos e a viabilidade de sua aplicação em concentrações elevadas sem risco de toxicidade.

Em suma, o SUPRA demonstrou-se uma formulação promissora, reunindo eficácia fotoprotetora, alta atividade antimicrobiana e segurança toxicológica. Esses resultados abrem caminho para a exploração de aplicações multifuncionais, com potencial para atender a demandas em setores como saúde, cosméticos e meio ambiente, contribuindo para o desenvolvimento de produtos inovadores e sustentáveis.

Estudos futuros serão fundamentais para aprofundar a compreensão e expandir as aplicações do SUPRA, validando sua eficácia e segurança em diferentes contextos. Pesquisas em condições reais de uso poderão confirmar a estabilidade e o desempenho

do composto em aplicados em formulações cosméticas. A caracterização química detalhada será necessária para identificar e quantificar compostos bioativos, como fenólicos e flavonoides, por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), para determinar a estrutura e interação molecular dos compostos. Adicionalmente, a compatibilidade do SUPRA com outros sistemas e componentes também deverá ser explorada, ampliando seu potencial de aplicação e consolidando sua versatilidade e impacto positivo em diversas áreas industriais e ambientais.