



Avaliação da atividade antimicrobiana e potencial conservante do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Evaluation of the antimicrobial activity and conservative potential of oregano essential oil
(*Origanum vulgare*)

P. A. Pimenta^{1*}; A. P. S. Silva¹; G. B. Andrade²; R. B. Souto²; M. D. Mota^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado da Bahia (UNEB),
41150-000, Salvador-Bahia, Brasil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40170-115, Salvador-Bahia, Brasil

*farmpriscilapimenta@gmail.com

(Recebido em 28 de agosto de 2023; aceito em 05 de fevereiro de 2024)

Conservantes antimicrobianos são aditivos que retardam ou inibem o desenvolvimento de microrganismos que podem ser prejudiciais à saúde humana; há uma grande diversidade de conservantes utilizados no mercado, mas percebe-se uma tendência mundial crescente do uso de produtos e conservantes naturais. Óleos essenciais (OE) são potenciais agentes conservantes naturais, pois são metabólitos secundários sintetizados por plantas aromáticas e medicinais. Entre a espécie mais utilizadas de forma convencional para fins antissépticos, está o orégano. Apesar da grande quantidade de dados sobre a composição química do OE de orégano, verificou-se que a composição e as propriedades biológicas ainda não foram totalmente exploradas, visto que dados da literatura relatam composição diferenciada de acordo com a região cultivada. Este estudo teve como objetivo testar o potencial antimicrobiano do OE de orégano em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A investigação da atividade antimicrobiana *in vitro* do OE foi testada em relação a quatro microrganismos clinicamente relevantes, utilizando o método de microdiluição. Observou-se que o OE conseguiu inibir *C. albicans* a partir de uma concentração de 0,312%; *E. coli* a partir de 0,625%, *S. aureus* a partir de 1,25% e *P. aeruginosa* < 0,156%. A partir dos resultados encontrados, concluiu-se que o OE de orégano apresentou atividade antimicrobiana sobre os microrganismos estudados. Contudo, são necessárias pesquisas adicionais a fim de determinar as concentrações ideais do orégano como agente conservante, levando em consideração os fatores que afetam sua composição, assim como a quantidade dos compostos ativos presentes.

Palavras-chave: óleos essenciais, *Origanum vulgare*, conservante natural.

Antimicrobial preservatives are additives that delay or inhibit the development of microorganisms that can be harmful to human health; There is a great diversity of preservatives used in the market, but there is a growing worldwide trend towards the use of natural products and preservatives. Essential oils (EO) are potential natural preservative agents, as they are secondary metabolites synthesized by aromatic and medicinal plants. Among the most conventionally used species for antiseptic purposes is oregano. Despite the large amount of data on the chemical composition of oregano EO, it was found that the composition and biological properties have not yet been fully explored, as literature data report different composition according to the cultivated region. This study aimed to test the antimicrobial potential of oregano essential oil on strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The investigation of the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil was tested against four clinically relevant microorganisms, using the microdilution method. It was observed that the essential oil was able to inhibit *C. albicans* from a concentration of 0.312%; *E. coli* from 0.625%, *S. aureus* from 1.25% and *P. aeruginosa* < 0.156%. Based on the results found, it was concluded that the oregano EO showed antimicrobial activity on the studied microorganisms. However, further research is needed in order to determine the ideal concentrations of oregano as a preservative agent, taking into account the factors that affect its composition, as well as the quantity of the active compounds present.

Keywords: essential oils, *Origanum vulgare*, natural preservative.

1. INTRODUÇÃO

Conservantes antimicrobianos são aditivos que retardam ou inibem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes em produtos farmacêutico, cosmético e alimentícios, que podem

ser prejudiciais à saúde humana. A inclusão de conservantes às formulações é indispensável para minimizar ou inibir o crescimento de microrganismos, tendo como objetivo manter a estabilidade do produto durante sua vida útil, em condições adequadas de armazenamento [1-3]. Dentre os conservantes utilizados no mercado, que em sua maioria são sintéticos, podem ser citados como exemplo o ácido benzoico, o ácido sórbico, o imidazolidiniluréia, o clorocresol, o triclosan e os parabens. Estes conservantes por sua vez podem apresentar algum grau de irritação/toxicidade e serem danosos a saúde humana. Destaca-se a utilização em grande escala dos parabens como conservantes, compostos que possuem propriedades estrogênicas, o que pode gerar o aumento da linhagem celular cancerígena do tecido mamário. Como resultado desse cenário, percebe-se uma tendência a uma busca crescente pela substituição e uso de conservantes naturais, visando maior segurança [2, 4, 5]. Alternativas promissoras incluem extratos de plantas, óleos essenciais e micocinas. Usar substâncias bioativas naturais com baixa toxicidade e resistência microbiana é uma abordagem inovadora e sustentável, substituindo componentes sintéticos por alternativas naturais no desenvolvimento de novos produtos [6].

Óleos essenciais (OE) são potenciais agentes conservantes naturais, constituídos de metabólitos secundários sintetizados por plantas aromáticas e medicinais, que correspondem a menos do que 5% da matéria seca vegetal, no entanto com altas concentração de ativos. São produtos voláteis, geralmente líquidos e incolores à temperatura ambiente. Quimicamente, OE são uma mistura de vários componentes químicos bioativos, como terpenos, terpenóides e fenólicos, que comumente apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, antimicóticas, antiparasitárias e inseticidas [4]. A produção mundial de óleos essenciais está estimada em 253 mil toneladas em 2021, avaliadas em US\$ 10,3 bilhões e estima-se que essa produção deve ultrapassar as 340 mil toneladas em 2026 [7].

O orégano, *Origanum vulgare* L. (família Lamiaceae), é uma planta facilmente encontrada em âmbito mundial, e muito usada convencionalmente para fins antissépticos [8]; é uma herbácea perene, aromática, ereta, de hastes algumas vezes arroxeadas, medindo até 90 cm de altura, com folhas simples, esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. Apresenta determinadas exigências climáticas, produzindo melhor qualidade da planta em invernos secos e ensolarados. Seus principais países produtores abrangem Grécia, Turquia e Itália. No Brasil, a maior parte do orégano comercializado é importado, porém, há cultivo da espécie principalmente nas regiões sul e sudeste do país [9].

A composição química do orégano é uma mistura de vários componentes bioativos, como: carvacrol, terpinoleno, timol, γ -terpineno e ortocimeno [10, 11]. Apesar da grande quantidade de dados sobre a composição química do OE de orégano, verificou-se que a sua composição, bem como suas propriedades biológicas, ainda não foram totalmente exploradas, visto que dados da literatura relatam composição diferenciada de acordo com a região cultivada; o OE destilado de orégano turco, tem como componentes principais, timol (58,3%) e carvacrol (16,1 - 63,97%), da Grécia - carvacrol (88,7 %), da China - gama-citronelol (85,3 %), da Jordânia - hidrato de *trans*-sabineno (27,2 %), da Bulgária - espatulenol (20,7%), do Brasil - tripineno (30,5%) [12].

Este estudo teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana do OE de orégano em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas da metodologia deste trabalho foram sequenciadas em ordem cronológica, conforme ilustrado na Figura 1.

2.1. Substância de teste

O OE comercial de orégano (*Origanum vulgare*), CAS n°84012-24-8, produzido pela fabricante Amantikir, 10 mL, lote: 05.3036, informado que foi obtido por destilação a vapor das folhas, em Minas Gerais, foi adquirido em uma loja própria da marca. Ademais, essa pesquisa foi

cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) pelo nº: A931587.

2.2. Microrganismos

Para os testes antimicrobianos, foram utilizadas cepas padrão ATCC 25922 (*E. coli*), ATCC 25923 (*S. aureus*), ATCC 27853 (*P. aeruginosa*) e ATCC 10231 (*C. albicans*). As amostras bacterianas foram semeadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e a fúngica foi semeada em caldo tioglicolato.

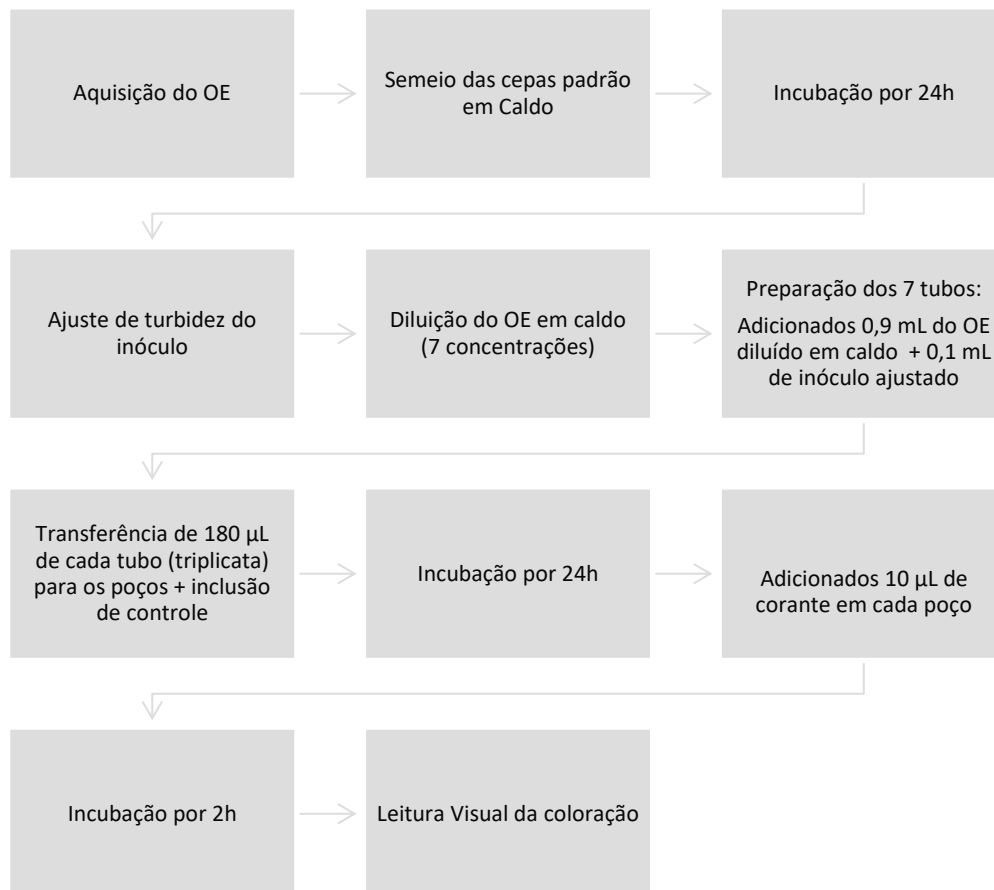


Figura 1: Fluxograma das etapas da metodologia utilizada.

2.3. Padronização dos inóculos

O inóculo foi preparado adicionando-se uma colônia isolada do microrganismo diretamente em meio de cultura e este foi incubado a 37 °C por 24 horas. Os inóculos foram ajustados por turbidez para 1 e 3 x 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (determinado espectrofotometricamente no comprimento de onda 660nm com absorvância entre 0,08 e 0,11, utilizando o equipamento Specord 200 Plus Analytik Jena) [13].

2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando a técnica de microdiluição [14] em caldo em placas de 48 poços com fundo em forma de U.

2.4.1. Preparação das placas

O meio de cultura utilizado nos testes para bactérias foi preparado com caldo BHI contendo 1% de polissorbato 80 (Tween 80), e o OE de orégano foi diluído em série nas concentrações de: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,152 e 1,562 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3152% e 0,1562%), conforme Tabela 1. Para cada microrganismo foi utilizada uma placa de 48 poços. Em microtubos, foram adicionados 0,9 mL do meio de cultura com diferentes concentrações do OE de orégano e 0,1 mL de inóculo ajustado das amostras (com concentração de $1 \text{ a } 3 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, alíquotas de 180 μL de cada tubo foram transferidas em triplicata para os poços da placa de 48 poços, juntamente com os controles positivo e negativo. A placa foi incubada estaticamente a 37°C por 24 horas. A mesma metodologia foi aplicada para o inóculo fúngico, diferenciando apenas a substituição do caldo BHI pelo caldo tioglicolato.

Tabela 1: Diluições realizadas em tubos.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Concentração (%)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
OE orégano (μL)	100	50	25	12,5	6,25	3,152	1,562
Caldo (mL)	0,9	0,95	0,975	0,9875	0,9937	0,9968	0,9984

2.4.2. Controles

Três controles foram inseridos no experimento. O controle positivo envolveu o meio de cultura adicionado de Tween 80 e um inóculo do microrganismo, enquanto o controle negativo compreendeu apenas o meio de cultura com Tween 80. Adicionalmente, o meio de cultura puro (caldo) sem Tween 80 foi empregado na placa para avaliar se o Tween exercia algum efeito de inibição sobre os microrganismos [14].

2.4.3. Análise da atividade antimicrobiana

Após o período de incubação, foi utilizado um método colorimétrico com solução do corante de viabilidade celular cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1%. Foram adicionados 10 μL dessa solução em cada poço e após duas horas foi realizada a leitura de forma visual, observando a ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela mudança de cor da solução, para o vermelho, indicando o crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor quantidade do produto capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo avaliado, evidenciada pela ausência de qualquer mudança na coloração [15, 16].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados quantitativos da atividade antimicrobiana dos OE de orégano foram obtidos por meio da determinação do CIM. Os testes foram realizados com sete concentrações decrescentes (diluição seriada), variando de 10% a 0,156% v/v.

3.1 Atividade antimicrobiana

A investigação da atividade antimicrobiana *in vitro* do OE foi testada em relação a quatro microrganismos clinicamente relevantes, utilizando o método de microdiluição. Observou-se que o OE de orégano utilizado conseguiu inibir *C. albicans* a partir de uma concentração de 0,312% (Figura 2); *E. coli* a partir de 0,625% (Figura 3) e *S. aureus* a partir de 1,25% (Figura 4). É relevante mencionar que, na concentração mais baixa testada, não houve crescimento de *P.*

aeruginosa (Figura 5). Portanto, a concentração inibitória mínima foi definida como sendo inferior a $1,562 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($< 0,156\%$).

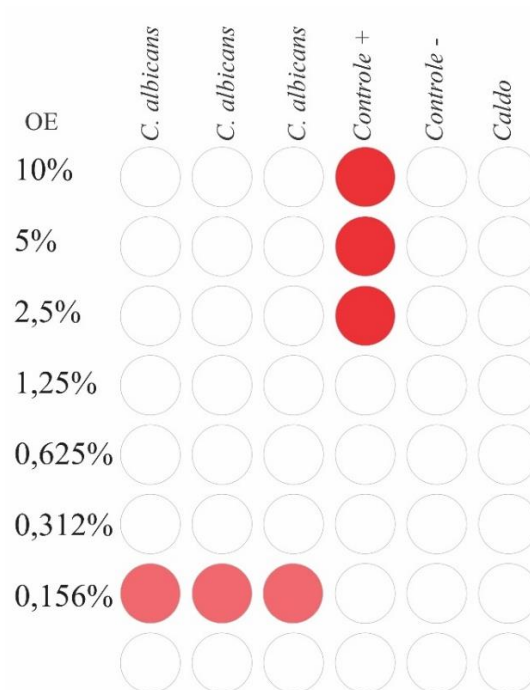


Figura 2: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Candida albicans*.

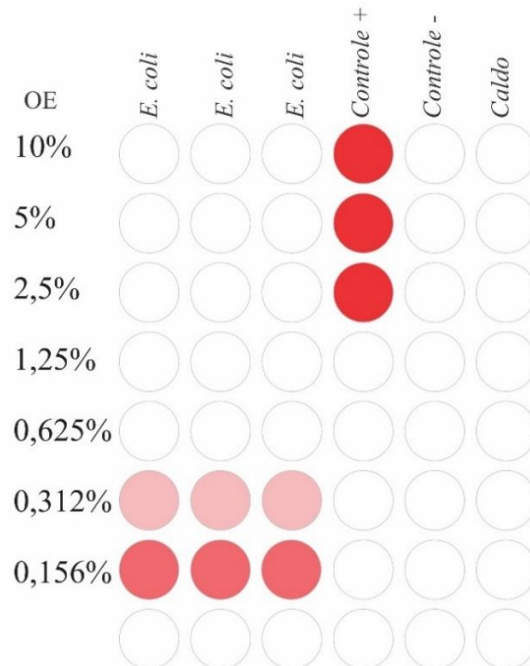


Figura 3: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Escherichia coli*.

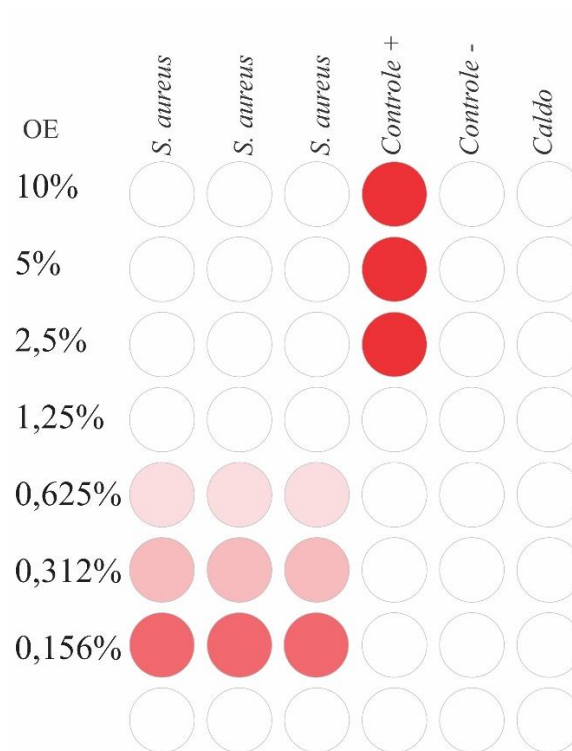


Figura 4: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Staphylococcus aureus*.

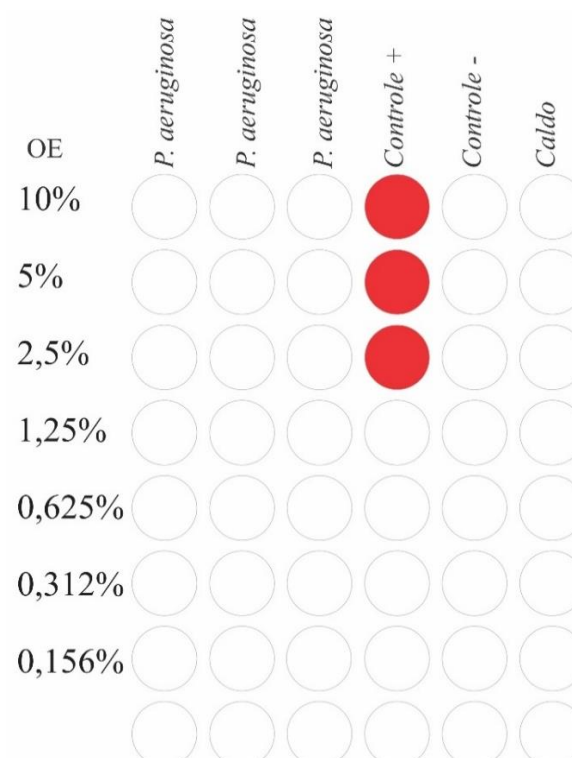


Figura 5: Esquema representativo da placa de microdiluição de *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados revelaram variações nas concentrações de inibição conforme o microrganismo (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade do OE de Orégano sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Microrganismos	Concentrações do OE de Orégano (%)						
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+

Legenda: (-)inibição; (+)crescimento.

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão em consonância com estudos anteriores [8, 10, 14, 17] conduzidos com o OE de orégano.

De Araújo e Longo (2016) [14] avaliaram a capacidade de inibição do crescimento e viabilidade para *E. coli* e *S. aureus*. Eles observaram que o OE de *Origanum vulgare* demonstrou poder de inibição de crescimento e viabilidade para *E. coli* com concentração inibitória mínima (CIM) de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0,625%) e para *S. aureus* com CIM de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1,25%); dados semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Em sua pesquisa, Janani et al. (2019) [8] demonstraram na avaliação microbiológica atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* com CIM de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2,5%) e a concentração bacteriana mínima (CBM) de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; sendo o OE utilizado composto por carvacrol (41,2%), γ -terpineno (12,68%), p-cimeno (9,47%), α -terpineno (1,19%) como os compostos principais e β -cariofileno (0,83%), β -linalol (0,67%), β -bisaboleno (0,601%), α -pineno (0,6%), β -pineno (0,5%), terpinen-4-ol (0,41%), borneol (0,4%), 3-tujeno (0,4%), espatulenol (0,4%), miristicina (0,25%) e apiol (0,14%).

Quanto a concentração, o OE de orégano a 4% demonstrou a maior atividade antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, entretanto as concentrações mais baixas usadas (0,0975%) resultaram em redução de crescimento microbiológico apenas para *L. monocytogenes* [17].

A variação na atividade antimicrobiana observada em estudos distintos pode ser atribuída às mutações nas linhagens bacterianas empregadas, uma vez que cepas pertencentes à mesma espécie podem apresentar distintos níveis de resistência. Adicionalmente, é crucial considerar a diversidade de óleos essenciais utilizados, dado que as concentrações dos componentes ativos podem diferir. Essas variações podem ser resultado das flutuações sazonais na colheita do orégano, bem como de fatores geográficos que influenciam a composição, qualidade e quantidade do OE.

As propriedades biológicas dos OE estão correlacionadas diretamente com a composição química, os efeitos antimicrobianos estão relacionados a compostos fenólicos, hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos totais e sesquiterpênicos. Tanto bactérias gram-positivas, quanto as bactérias gram-negativas demonstraram sensibilidade ao OE de orégano. O timol atua como um transportador transmembrana de cátions monovalentes, deixando seu próton hidroxila por outro íon. O cimeno atua sinergicamente, expandindo a membrana. O terpineol possui um grupo hidroxila, mas não possui alta atividade antimicrobiana, possivelmente devido à carência de sistema eletrônico deslocado de ligações duplas. Os componentes de um OE têm maior atividade antimicrobiana atuando sinergicamente, do que os componentes principais agindo isoladamente [10], a atividade antimicrobiana do óleo de orégano está associada à presença dos compostos: carvacrol, cânfora, linalol, R (+) limoneno, 1,4-cineol e γ - terpineno [18].

3.2 Potencial Conservante

A consistência entre os resultados fortalece a evidência de que o OE de orégano possui propriedades antimicrobianas efetivas e pode ser considerado uma opção promissora de conservante, atuando no combate a microrganismos potencialmente patogênicos.

A legislação brasileira estabelece a ausência de microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e fungos do gênero *Aspergillus* em produtos de origem vegetal para uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular) e para bases galênicas; assim como, determina limites máximos de outros microrganismos [19]. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária exerce sua regulamentação dos conservantes por meio da RDC Nº 528/2021. Essa Resolução aborda a relação das substâncias com propriedades conservantes que são autorizadas para uso em produtos destinados à higiene pessoal, cosméticos e perfumes, e estabelece os limites máximos permitidos para concentração dessas substâncias. Outros componentes presentes nas formulações podem apresentar propriedades antimicrobianas, desempenhando um papel relevante na preservação desses itens, como óleos essenciais específicos e alcoóis selecionados. Contudo, tais substâncias não são abrangidas pelo âmbito desta Resolução [20].

Entre os conservantes frequentemente utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas, os parabenos são os mais designados, utilizados em grande escala na manipulação, mesmo com efeitos tóxicos conhecidos [5]. São ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzoico e apresentam características, como um amplo espectro de ação e alta solubilidade em água. Entre os parabenos mais utilizados como conservantes, estão o metilparabeno e o propilparabeno. O metilparabeno apresenta CIM de 0,200% para *Pseudomonas aeruginosa*, 0,100% para *Escherichia coli*, 0,150% para *Staphylococcus aureus* e 0,100% para *Candida albicans*. Por sua vez, o propilparabeno demonstra CIM de 0,080%, 0,040%, 0,040% e 0,013%, respectivamente, para esses mesmos microrganismos [21].

A concentração máxima autorizada de parabenos nas formulações é de 0,4% para cada substância individualmente e 0,8% para combinações de sais ou ésteres. No entanto, devido à sua alta eficácia, na prática, suas concentrações frequentemente não excedem 0,3% [20-22].

Avaliando os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que as concentrações iniciais empregadas de OE de orégano com objetivo conservante sejam de aproximadamente 0,7%. Entretanto, são requeridas investigações adicionais acerca dos fatores que influenciam a ação conservante, a estabilidade físico-química do produto no qual será incorporado, testes desafio, bem como a quantificação e a qualidade dos compostos ativos do OE que será utilizado. A realização desses estudos adicionais desempenhará um papel fundamental para viabilizar o uso comercial do OE de orégano como conservante.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi constatado que o OE de orégano demonstrou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Isso confere ao óleo potencialidade conservante, tornando-o adequado para aplicação em diversos produtos das indústrias cosmética, farmacêutica e em farmácias de manipulação. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para estabelecer as concentrações ideais de orégano como agente antimicrobiano natural e análise de toxicidade. Estes estudos devem levar em consideração os elementos que afetam a composição do óleo, o produto no qual será incorporado, bem como a quantidade e qualidade dos compostos ativos que estão presentes.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Farmacêuticas da UNEB e ao Grupo de Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos, Correlatos e Cosméticos da Faculdade de Farmácia da UFBA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Matos JC, Cruz NRS. Atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca alternifolia* comparada a conservantes químicos usados em bases cosméticas. Rev Remecs. 2018;3(4):21-30.

2. Silva FVF, Santos MC, Neiva LDB, Oliveira MAC, Leal BS, Moreira FAS, et al. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaifera officinalis* L. (copaíba). REAS. 2019 Ago;30:1-10. doi: 10.25248/reas.e974.2019
3. da Silva SB, dos Santos AN, Siqueira LP. Ação antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e da alicina, sua utilização em formas farmacêuticas e possível associação para o tratamento de infecções dérmicas. Braz J Develop. 2020 Jun;6(6):34555-6. doi: 10.34117/bjdv6n6-120
4. Falleh H, Ben Jemaa M, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. Food Chem. 2020 Nov;330:127268. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127268
5. Alves Galo AA, Outa CY, dos Santos LR, Bertoluci RS, Barsotti NS. Conservantes farmacotécnicos utilizados em produtos dermocosméticos magistrais. Braz J Nat Sci. 2022;4(3):1-7. doi: 10.31415/bjns.v4i3.157
6. Martelli EC, da Silva JC, Vieira J, de Marquezoni RS, Gandra RF. Conservação de formulação tópica utilizando micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. Sci Plena. 2022;18(10):1-18. doi: 10.14808/sci.plena.2022.104502
7. Markets And Markets [Internet]. Essential oils market size, share, trends and forecast to 2026 | COVID-19 Impact Analysis; mar 2021 [citado em 5 fev 2022]. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/essential-oil-market-119674487.html>.
8. Janani K, Ajitha P, Sandhya R, Teja KV. Chemical constituent, minimal inhibitory concentration, and antimicrobial efficiency of essential oil from *Origanum vulgare* against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. J Conserv Dent. 2019;22(6):538-43. doi: 10.4103/JCD.JCD_80_19
9. Fernandez AST, Bruni ARS, de Oliveira VMAT, Março PH, Valderrama P. Autenticação de orégano (*Origanum vulgare* L.) orgânico utilizando espectroscopia NIR e Quimiometria. Quím Nova. 2020 Dec;43(10):1500-4. doi: 10.21577/0100-4042.20170616
10. Asensio CM, Quiroga PR, Al-Gburi A, Huang Q, Grosso NR. Rheological behavior, antimicrobial and quorum sensing inhibition study of an argentinean oregano essential oil nanoemulsion. Front Nutr. 2020;7:569913. doi: 10.3389/fnut.2020.569913
11. Luo K, Zhao P, He Y, Kang S, Shen C, Wang S, et al. Antibacterial effect of oregano essential oil against *Vibrio vulnificus* and its mechanism. Foods. 2022 Jan;11(3):403. doi: 10.3390/foods11030403
12. Moghrovyan A, Sahakyan N, Babayan A, Chichoyan N, Petrosyan M, Trchounian A. Essential oil and ethanol extract of oregano (*Origanum vulgare* L.) from armenian flora as a natural source of terpenes, flavonoids and other phytochemicals with antiradical, antioxidant, metal chelating, tyrosinase inhibitory and antibacterial activity. Curr Pharm Des. 2019 Aug;25(16):1809-16. doi: 10.2174/1381612825666190702095612
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). Wayne (US): NCCLS; 2003.
14. de Araújo MM, Longo PL. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Arq Inst Biol. 2016;83:1-7. doi: 10.1590/1808-1657000702014
15. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 2008 Jun;18(2):301-7. doi: 10.1590/S0102-695X2008000200026
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Approved standards M100-S22. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 16th ed. Wayne (US): CLSI; 2012.
17. Carvalho MIP, Albano HCP, Teixeira PCM. Influence of oregano essential oil on the inhibition of selected pathogens in “Alheira” during storage. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2019;18(1):13-23 doi: 10.17306/J.AFS.2019.0624
18. Hać-Szymańczuk E, Cegiełka A, Karkos M, Gniewosz M, Piwowarek K. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. Food Sci Biotechnol. 2018 Oct 16;28(2):449-57. doi: 10.1007/s10068-018-0491-1
19. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 481, de 23 de setembro de 1999. Parâmetros para controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 1999. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/res0481_23_09_1999_rep.html
20. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021. Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC

- MERCOSUL n° 35/20. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2021. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5284308/RDC_528_2021_.pdf/b5f44e81-46ca-4eb5-a5f9-8e84ed067400
21. Fernandes JPS, Savino G, Amarante ACG, de Sousa MR, da Silva GR, Cianciulli ME, et al. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. *Quím Nova*. 2013;36(6):890-3. doi: 10.1590/S0100-40422013000600026
 22. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário nacional da farmacopeia brasileira. 2. ed. Brasília (DF): Anvisa; 2012.