



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DE *Ocimum gratissimum*
L. (LAMIACEAE)**

FRANCISCO RODRIGO DE LEMOS CALDAS

CRATO - CE

2011

FRANCISCO RODRIGO DE LEMOS CALDAS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DE *Ocimum gratissimum*
L. (LAMIACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago

Co-orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

CRATO - CE

2011

FRANCISCO RODRIGO DE LEMOS CALDAS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf - Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Jefferson Queiroz Lima
Instituto Federal do Ceará - IFCE

**Aos amigos que contribuíram para a
execução desse projeto.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Marcelo Oliveira Santiago** pela ajuda durante esse período.

A minha mãe **Luiza Lemos** pela confiança durante a nossa jornada.

Aos meus amigos **Arimatéia Duarte Fontenele** e **Aíla Maria Duarte Fontenele**, pelo carinho, apesar da distância.

Ao meu amigo **Danúbio Andrade Farias** e sua esposa **Monalisa Moura Andrade** pela ajuda nos tempos difíceis no início da caminhada.

À Professora **Fabíola Rodrigues**, sem a sua orientação o trabalho não teria sido realizado.

Ao Professor **Dr. José Galberto Martins da Costa**, pela orientação e acolhida em seu Laboratório.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospeção Molecular da Universidade Regional do Cariri, em especial aos coordenadores **Prof^ª. Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda** e **Dra. Imeuda Peixoto Furtado**.

A todos os funcionários e estudantes que compõem a Universidade Regional do Cariri, em especial a **Carla Karine Barbosa** e **Elaine Cristina Conceição** pela paciência.

Aos companheiros funcionários da Universidade Federal do Ceará pelo apoio e bom papo no tempo livre.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, em particular ao **Fábio Rodrigues** pela paciência e disposição para orientar os experimentos.

A minha amiga **Janete Magalhães** do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará pelo apoio e disponibilidade na análise instrumental.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, à Fundação Oswaldo Cruz, ao Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba, pelas contribuições para que esse estudo fosse realizado.

Ao CNPQ e FUNCAP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Considerações botânicas	17
3.2 Considerações etnofarmacológicas	20
3.3 Metabólitos secundários e óleos essenciais	21
3.4 Atividades farmacológicas	25
3.5 Mecanismo de ação antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Coleta do material vegetal	30
4.3 Análise da composição química	31
4.4 Avaliação antibacteriana e determinação da Concentração Inibitória Mínima	31
4.5 Avaliação da atividade moduladora por microdiluição	33
4.6 Avaliação da atividade moduladora dos óleos essenciais pelo método do contato gasoso	33
4.7 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.8 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Análises químicas dos óleos essenciais	36
5.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	41
5.3 Atividade moduladora dos óleos essenciais por microdiluição	44
5.4 Atividade moduladora dos óleos essenciais por contato gasoso	50
5.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	53
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Plantas da família Lamiaceae.....	18
<i>Figura 2:</i> a) Desenho técnico de folhas completas de <i>O. gratissimum</i> L.....	19
b) Fotografia de Inflorescências	19
<i>Figura 3:</i> Inflorescências de <i>O. gratissimum</i>	20
<i>Figura 4 :</i> Biossíntese dos fenilpropanóides	23
<i>Figura 5:</i> Mecanismos de ação dos componentes dos óleos essenciais.....	27
<i>Figura 6:</i> Espécimes de <i>Ocimum gratissimum</i> L. no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas LPPN – URCA.....	30
<i>Figura 7:</i> DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).....	34
<i>Figura 8:</i> Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e inflorescências frescas de <i>O. gratissimum</i> L.....	37
<i>Figura 9:</i> Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do 1,8-cineol.....	40
<i>Figura 10:</i> Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do Eugenol	40
<i>Figura 11:</i> Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do β -selineno.....	40
<i>Figura 12:</i> Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do β -cariofileno	40
<i>Figura 13:</i> Placa de microtitulação com 96 poços fundo U, utilizada na investigação da atividade moduladora de óleos essenciais de inflorescências de <i>O. gratissimum</i> coletados as 8:00 horas.	49
<i>Figura 14:</i> Placa de <i>petri</i> contendo óleos essenciais de inflorescências coletados 12:00 horas na presença de disco de Amicacina 30 μ g.....	52

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> : Lista de compostos isolados de <i>O. gratissimum</i> L.	25
<i>Tabela 2</i> : Atividades farmacológicas de <i>O. gratissimum</i>	26
<i>Tabela 3</i> : Constituintes químicos identificados por CG/EM presentes nos óleos essenciais de <i>O. gratissimum</i>	36
<i>Tabela 4</i> : Principais classes e subclasses de constituintes presentes nos óleos de folhas e inflorescências de <i>O. gratissimum</i> L. coletados em horários diferentes	38
<i>Tabela 5</i> : Concentração inibitória mínima - CIM dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de <i>Ocimum gratissimum</i> L. coletados em horários diferentes.....	41
<i>Tabela 6</i> : Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos na ausência e presença de folhas frescas de <i>O. gratissimum</i> L. coletados em horários diferentes.....	45
<i>Tabela 7</i> : Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos na ausência e presença de inflorescências frescas de <i>O. gratissimum</i> L. coletados em horários diferentes	47
<i>Tabela 8</i> : Modificação da atividade antibiótica por componentes voláteis do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> por contato gasoso frente à <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	50
<i>Tabela 9</i> : Modificação da atividade antibiótica por componentes voláteis do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> por contato gasoso frente à <i>S. aureus</i> ATCC 12692.....	51
<i>Tabela 10</i> : Atividade antioxidante de óleos essenciais extraídos de folhas e inflorescências de <i>O. gratissimum</i> coletados em diferentes períodos	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHA - *Hidroxi Anisol Butilado*

BHI - *Brain Heart Infusion Broth*

BHT - *Hidroxi Tolueno Butilado*

°C - Grau Celsius

°C/min - Grau Celsius/min

CE₅₀ – Concentração efetiva

CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Cm/seg - Centímetro por segundo

DMSO - Dimetilsulfóxido

eV – Elétron volt

g - grama

IR - Índice de Retenção

kPa - Quilopascal

m - Metro

m/z - Razão massa/carga

mL - Mililitro

mL/min - Milílitro por minuto

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio

OEOGF - Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum*

OEOGI - Óleo essencial de inflorescências frescas de *O. gratissimum*

PCA - *Plate Count Agar*

PDA - *Potato Dextrose Agar*

UFC/ mL - Unidade Formadora de Colônias por mililitro

µg/ mL - Micrograma por mililitro

µL - Microlitro

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

RESUMO

Ocimum gratissimum (Lamiaceae) é encontrada em regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, sendo conhecida popularmente como alfavaca. As partes medicinais da planta de onde é extraído o óleo essencial, correspondente às folhas e inflorescências, apresenta reconhecida atividade antimicrobiana devido ao alto teor de terpenos. Essa pesquisa mostra o estudo da composição química e a investigação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas coletadas às 8:00 horas e 12:00 horas, e inflorescências coletadas às 8:00 horas e 12:00 horas de *O. gratissimum*, avaliando a sua interferência sobre a atividade de alguns antimicrobianos de comprovada eficácia clínica. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e a identificação dos seus componentes feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O fenilpropanóide eugenol foi o constituinte majoritário em todos os óleos essenciais analisados, seguido do monoterpene oxigenado 1,8-cineol. A atividade antimicrobiana foi testada frente à bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, utilizando linhagens padrão e isolados clínicos. A avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora da ação dos antibióticos foi realizada pelos métodos de microdiluição e da modulação por contato a vapor. O *screening* antimicrobiano permitiu a observação da sensibilidade de bactérias aos óleos testados. Pelo método da microdiluição em caldo, foi observada a eficácia dos óleos testados frente às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, tanto as de linhagem padrão quanto os isolados clínicos. Os resultados mostraram que o óleo essencial obtido a partir das inflorescências coletadas às 8:00 horas apresentou o menor valor de CIM (128 µg/mL), essa concentração sobre bactéria Gram-negativa *E. coli Ec 27* multiresistente representa um resultado significativo. Pelo método do contato gasoso, foi observada uma interessante relação, do ponto de vista clínico para todos os óleos, com os aminoglicosídeos, traduzindo em efeitos sinérgicos, e para as tetraciclinas em efeito antagônico. Todos os óleos das folhas e inflorescências de *O. gratissimum* L. apresentaram atividade antioxidante com melhores resultados para os óleos essenciais das inflorescências. Conclui-se que *O. gratissimum* L. representa uma fonte de estudo relevante para a prospecção de produtos naturais.

Palavras-chave: *O. gratissimum* L., óleos essenciais, atividades antimicrobiana e antioxidante.

ABSTRACT

The *Ocimum gratissimum*, Lamiaceae, is found in semi-arid regions of Brazil, known popularly as basil. The medicinal part of the plant where oil is extracted essentially corresponds to the leaves and inflorescences, being recognized its antimicrobial activity due to the high content of terpenes. This research study shows the chemical composition and investigation of the antimicrobial activity of essential oil from leaves and inflorescences of *O. gratissimum* collected in two different periods assessing their influence on the activity of some antimicrobial drugs of proven clinical efficacy. Essential oils were extracted by hydrodistillation and the identity of the components made by gas chromatography / mass spectrometry. The constituents were identified in the essential oil of fresh leaves (EOOGF) and fresh flowers (EOOGI) used in microbiological testing, the phenylpropanoid eugenol was the major constituent in all essential oils analyzed by varying the percentage, the oxygenated monoterpene 1,8-cineole was ranked as the second most abundant component in leaves and inflorescences. Antimicrobial activity was examined using Gram-positive bacteria, Gram-negative, the standard strains and clinical isolates. The antimicrobial activity and modulating the action of antibiotics was performed by microdilution methods and modulation by contact steam. The antimicrobial screening allowed the observation of the sensitivity of bacteria to the tested oils. For the broth microdilution method, we observed the effectiveness of the oils tested against gram-negative and Gram-positive, both for the standard strain and clinical isolates. being the essential oil obtained from inflorescences collected at 8:00 hours, which showed the lowest MIC value (128 mg/mL), and this concentration of Gram-negative bacterium *E. coli* Ec 27 multiresistant a significant result. By gaseous contact method, we observed an interesting relationship, the clinical point of view for all oils, with the aminoglycosides, resulting in synergistic effects and antagonistic effect of tetracyclines. All oils from leaves and inflorescences of *O. gratissimum* showed antioxidant activity. When compared, the inflorescences oils showed antioxidant activity than oils from leaves. We conclude that *O. gratissimum* represents an alternative to the pharmaceutical industry in its search for natural products.

Key words: *Ocimum gratissimum* L., essential oils, antimicrobial activity and antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas pelo homem desde a antiguidade aos tempos modernos. A busca por alívio e a cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (VIEGAS, BOLZANI & BARREIRO, 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado, devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002; PINTO et al., 2005; MONTANARI & BOLZANI, 2001).

O Brasil não é somente o país com maior biodiversidade, mas também possui uma enorme diversidade cultural e uma flora diversificada com potencial econômico. Contudo, estudos detalhados são necessários para que se conheçamos o potencial da sua biodiversidade bem como o impacto do uso intensivo desses bens (ALBURQUERQUE et al., 2008).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permite aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; KINGHORN, 2001). A Organização Mundial de Saúde estima que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WHO, 1998).

Uma das maneiras de se conhecer a composição química das plantas é através da obtenção dos seus óleos essenciais. Os óleos essenciais são misturas de constituintes químicos de peso molecular e densidade baixa, sendo encontrados na maioria das plantas. São os

maiores responsáveis pelo odor exalado pelas plantas e muitas vezes apresentam atividades biológicas relevantes como, por exemplo, atividades larvicida e antimicrobiana (BURT, 2004).

A espécie *O. gratissimum* L. é comumente conhecida como alfavaca, utilizada na medicina popular devido as suas propriedades antissépticas. Os óleos essenciais de folhas e inflorescências possuem propriedades antimicrobianas (NAKAMURA et al., 1999; SILVA , et al., 2010; MATASYOH et al., 2007).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública. O aumento dos casos de resistência é amplamente reconhecido como um grave ameaça à saúde. Um exemplo de relevância clínica são as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, tanto hospitalares quanto domiciliares, apresentando morbidade e mortalidade elevadas (RATTI & SOUSA, 2009).

Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto as atividades sinérgicas antimicrobianas de óleos essenciais necessitam serem estudadas.

O presente estudo justifica-se pela necessidade de buscar novos produtos naturais para a indústria farmacêutica, colaborando para a melhoria do arsenal terapêutico de drogas antimicrobianas. Na indústria de alimentos e cosméticos as propriedades antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais são importantes atributos biológicos (BURT, 2004), que assumem um aspecto relevante para a busca de novos agentes antioxidantes e protetores de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição química e as propriedades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas frescas e inflorescências frescas de *Ocimum gratissimum* L.

2.2 Objetivos específicos

-Avaliar a composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas e das inflorescências de *O. gratissimum* coletadas em dois períodos diferentes do dia;

-Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição dos óleos essenciais de *O. gratissimum* frente a linhagens de bactérias e verificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais frente a bactérias padrão e multi-resistentes;

-Avaliar o efeito modulador dos óleos essenciais frente a antibióticos por microdiluição e por contato a vapor, usando bactérias padrão.

-Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais, comparando com o padrão Hidroxi Tolueno Butilado (BHT).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Considerações botânicas

A família Lamiaceae é composta por mais de 252 gêneros e 7000 espécies, sendo conhecida pela riqueza de espécies com propriedades medicinais, que têm sido usadas desde tempos antigos e de grande ocorrência na região mediterrânea (ALI, SALEEM & AHMAD, 2000). Se apresentam como árvores, arbustos e alguns como cipós. Os óleos aromáticos essenciais estão geralmente contidos nas folhas que emergem com cada par posicionado perpendicularmente ao anterior. A seção transversal das hastas é de formato quadrado. Tais plantas são majoritariamente bissexuais (CANTINO, HARLEY & WAGSTAFF, 1992; HEYWOOD et al, 2007). Muitas espécies de Lamiaceae têm longa história de uso de especiarias culinárias e na medicina popular. As plantas aromáticas sálvia, tomilho, alecrim, orégano, hortelã e manjeriço, por exemplo, são temperos típicos e consumidos em grandes quantidades em todo o mundo (WINK, 2003; CELIKTAS et al, 2006; HUSSAIN et al, 2008; BASER, 2002;. ESEN et al, 2007). Embora tenham sido descritos componentes tóxicos para algumas plantas da família Lamiaceae, alguns gêneros tem sido explorados pelas indústrias de óleo e culinária por mais de 75 anos (CHARLES & SIMON, 1990; CHARLES & SIMON, 1992; MARTINS et al, 1999; MANOSROIA, DHUMTANOMA & MANOSROIA, 2006).

O gênero *Ocimum* L. é composto de mais de 150 espécies e cresce amplamente em todas as regiões temperadas do mundo (MARTINS et al, 1999;. JIROVETZ & BUCHBAUER, 2001; MONDAL et al, 2007). *Ocimum sanctum*, *O. gratissimum* e *O. basilicum*, são frequentemente cultivada em vários países do Leste da Ásia, Europa, América e da Austrália para a produção de óleos essenciais (SILVA et al, 2004; ZHELJAZKOV et al, 2008).

Tradicionalmente, espécies de *Ocimum* têm sido amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, de perfumaria e cosméticos (TELICI, BAYRAM & YILMAZ, 2006). As partes aéreas das plantas são consideradas como antiespasmódico, estomáquico e carminativo na medicina nativa. Recentemente, o potencial antimicrobiano e antioxidante dos óleos essenciais de *O. sanctum*, *O. gratissimum* e *O. basilicum*, em especial como antioxidante e agentes antimicrobianos tem sido exploradas (BOZIN et al, 2006; MATASYOH et al 2007; POLITEO, JUKIC & MILOS, 2007; HUSSAIN et al, 2008).

Na figura 1 é possível verificar algumas espécies da família Lamiaceae: *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum*, *Mentha arvensis*, *Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*.

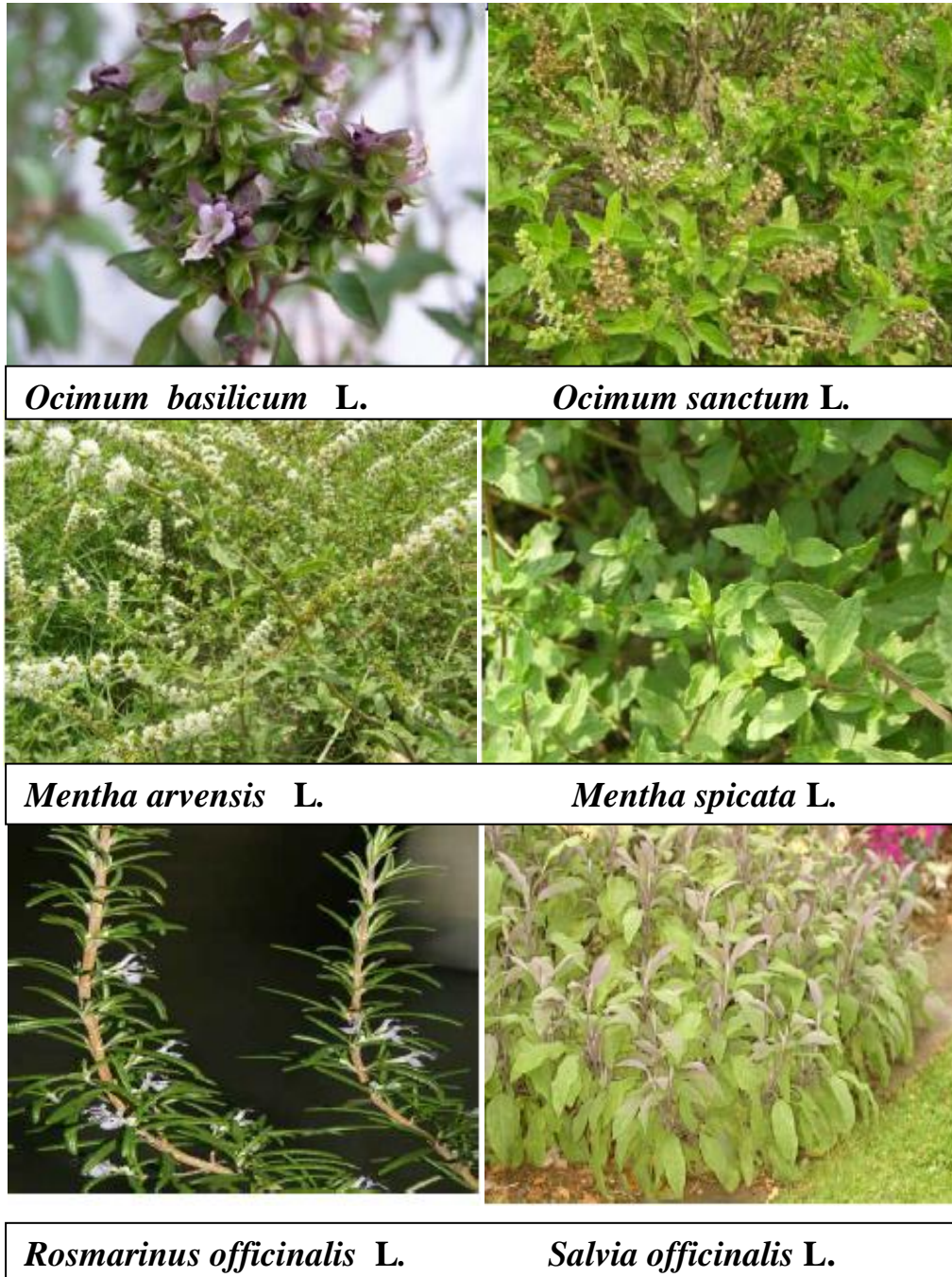


Figura 1: Plantas da família Lamiaceae. Fonte: HUSSAIN, 2009.

A espécie *O. gratissimum* L. é uma planta herbácea, que pertence a família Labiatae. A planta é originária de áreas tropicais, especialmente na Índia e na África Ocidental. Na Nigéria é encontrada no Cerrado e em áreas costeiras. É cultivada no Ceilão, Ilhas do Mar do Sul e também no Nepal, sendo conhecido por vários nomes em diferentes partes do mundo. Encontra-se um arbusto de até 1,9 m de altura, com hastes que são ramificadas. As folhas medem até 10 x 5 cm, e são ovadas a ovado-lanceoladas, sub-acuminado a acuminado em cuneate ápice, e decorrente de base com margem serrada, pubescente e pontilhada de ambos os lados. Os estômatos são raros ou ausentes na superfície superior, enquanto eles estão presentes na superfície inferior. Tricomas ordinárias são poucos. Possui Pecíolo até 6 cm de comprimento e ráceros até a 18 cm de comprimento. Os pedúnculos são densamente pubescentes. As células epidérmicas da folha possuem contornos irregulares (PRABHU et al., 2009). Na figura 2 observa-se o desenho técnico das folhas completas e na figura 3 as inflorescências de *O. gratissimum* L.

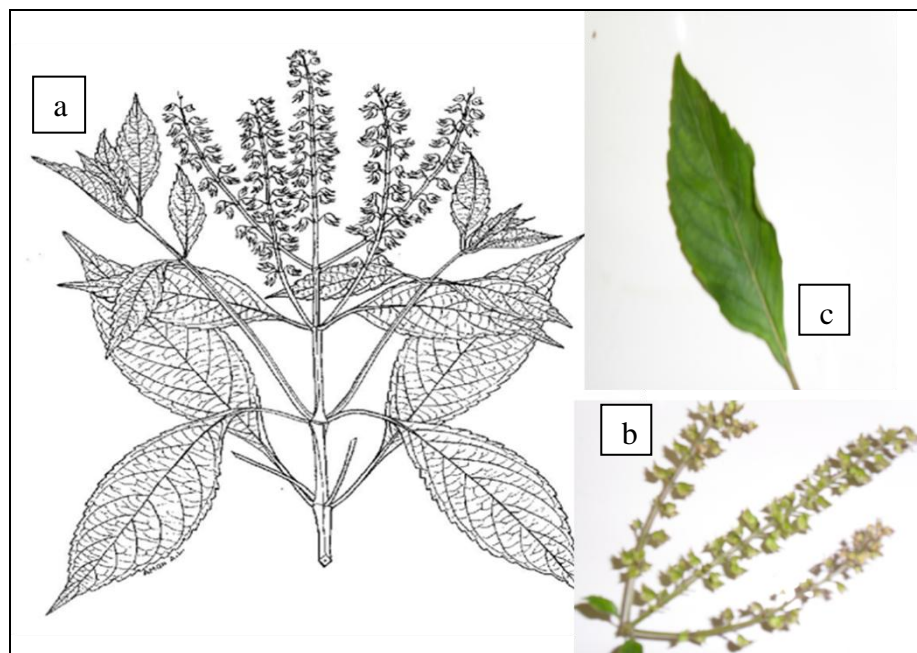


Figura 2: a) Desenho técnico de folhas completas de *O. gratissimum* L. . Fonte: PRABHU et al., 2009. b) Fotografia de Inflorescências. Fonte: Francisco Rodrigo de Lemos Caldas c) Fotografia de folhas. Fonte: Francisco Rodrigo de Lemos Caldas.



Figura 3: Inflorescências de *O. gratissimum*. Fonte: PRABHU et al., 2009.

3.2 Considerações Etnofarmacológicas

A medicina popular tem, por muito tempo, considerado extratos e óleos de plantas da família Lamiaceae como fonte ricas de substâncias medicinais, usados devidos as suas propriedades antimicrobiana, antivirótica, carminativa e espasmolítica. De acordo com PATON (1992), a alfavaca foi trazida no Brasil pelos escravos africanos e se naturalizou rapidamente no País. Acredita-se que os escravos tiveram um importante papel na disseminação da planta, pois foram os responsáveis por introduzir diferentes espécies em muitas regiões do Brasil, com o objetivo de preservar a tradicional medicina africana (PEREIRA & MAIA, 2007).

As flores e as folhas dessa planta são ricas em óleos essenciais, por isso é usado no preparo de chás e infusões. Nas áreas costeiras da Nigéria, a planta é usada no tratamento da epilepsia, febre alta e diarreia. Em áreas do Cerrado, decocção das folhas são usadas para tratar doença mental. A espécie *O. gratissimum* é usado por povos do Sudeste da Nigéria para manter feridas superficiais estéreis. Também é usado no tratamento de infecções fúngicas, febre, resfriado e defluxo. Habitantes da floresta tropical brasileira usam uma decocção das

raízes de *O. gratissimum* como um sedativo para crianças. Comunidades quenianas usam as folhas friccionadas entre palmas das mãos e cheiram como um tratamento para as narinas bloqueadas. São relatados usos para dores abdominais, dor nos olhos, infecções de ouvido, tosse, esterilidade, febre, convulsões, gargarejo, regulação da menstruação e como uma cura para o prolapso de reto (EFFRAIM, JACKS & SODIPO, 2003; RABELO et al., 2003)

Em Portugal, toda a planta tem sido utilizada para o tratamento da insolação, dor de cabeça, gripe, como sudorese, antipirético e para a sua atividade anti-inflamatória. As tribos da Nigéria usam o extrato de folhas no tratamento de diarreia, enquanto a infusão das folhas a frio é utilizada para o alívio do estômago e hemorróidas. A planta é comumente utilizada na medicina popular para tratar doenças diferentes, tais como infecções respiratórias, diarreia, dor de cabeça, doenças dos olhos, doenças de pele, pneumonia, tosse, febre e conjuntivite (FREIRE, MARQUES & COSTA, 2006; MATASYOH et al., 2007; PEREIRA & MAIA, 2007).

A infusão de folhas da espécie é usada como antisséptico, antiespasmódico e antitussígeno. Entre as várias espécies de *Ocimum*, *O. gratissimum* encontra ampla utilização clínica em todo o mundo, formulações contendo o óleo essencial das folhas foram incorporados em uma variedade de bases como antissépticos tópicos e para o uso no tratamento de pequenas feridas, furúnculos e espinhas (NGASSOUMA et al., 2003; ORAFIDIYA et al., 2001).

3.3 Metabólitos secundários e óleos essenciais

As plantas são responsáveis pela produção de compostos químicos importantes para o seu metabolismo a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem. Esses compostos são classificados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são lipídios, protídios e glicídios, essenciais a todos os seres vivos e com funções bem definidas, enquanto que os metabólitos secundários apresentam estruturas complexas e estão presentes em menores concentrações. Os metabólitos secundários encontram-se presentes em concentrações bem menores nas plantas a maioria deles tais como os alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas e ligninas têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas, etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos sendo encontrados e distribuídos

por todo o reino vegetal (BURT, 2004; COLLIN, 2001; VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

Conhecidos pela suas atividades antisséptica, bactericida, fungicida e virucida , propriedades medicamentosas e flavorizantes, eles são usados em embalsamentos, conservação dos alimentos, como antibióticos, analgésicos, sedativos, antiinflamatório, antiespasmódico e anestésico local. Até os dias atuais, essas características não se alteraram muito, exceto que agora são mais conhecidos alguns de seus mecanismos de ação particularmente para o efeito antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são exemplos de misturas desses metabólitos secundários, compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor. Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Também servem para atrair alguns insetos que favorecem a dispersão de pólen e sementes, ou mesmo para repelir outros insetos indesejáveis. Os óleos são líquidos, voláteis, límpido e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água. Eles podem ser sintetizados por toda a planta, como por exemplo em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, as células da epiderme ou tricomas glandulares (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que conduz às unidades básicas: ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico (Figura 4). Estes últimos, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, por meio de oxidações degradativas das cadeias laterais, podem gerar aldeídos aromáticos; as ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem as cumarinas. Os terpenóides são construídos pela natureza a partir do ácido mevalônico, do qual se obtém a unidade isoprênica, ou seja, o pirofosfato de isopentenila. O encadeamento cabeça cauda da unidade isoprênica produz diversas classes de terpenos, entre os quais os monoterpenos, compostos com dez átomos de carbono (C₁₀), e os sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono (C₁₅). Os terpenos são um enorme grupo de produtos naturais, formados a partir do hidrocarboneto isopreno. São classificados de acordo com o número de carbonos, em múltiplos de cinco (C₅= isopreno), monoterpenos (C₁₀) (GRAYSON, 2000), sesquiterpenos (C₁₅) (FRAGA, 2005), diterpenos (C₂₀) (HANSON, 2005), sesterpenos (C₂₅) (HANSON, 1996) e triterpenos (C₃₀) (CONNOLLY & HILL,

2007). Desse modo, já foram identificadas mais de 23000 combinações conhecidas de terpenos (WANG, TANG & BIDIGARE, 2005).

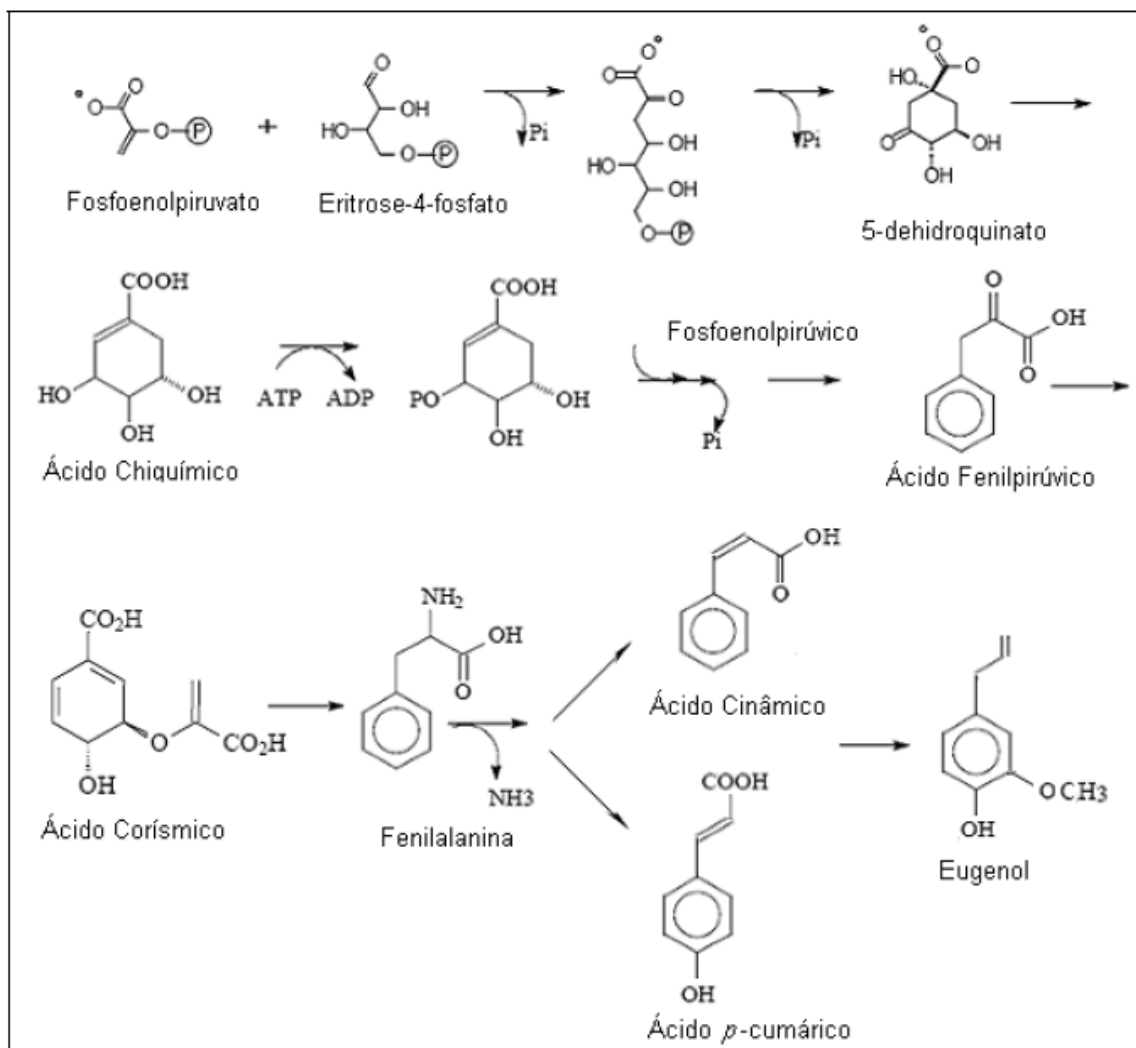


Figura 4 : Biossíntese dos fenilpropanóides. FONTE: LORENZO *et al.* 2002 e PERES, 2004.

A produção de terpenos nas plantas está relacionado a funções ecológicas. Eles são encontrados abundantemente em frutas, legumes, e plantas aromáticas e medicinais onde a função importante deles é proteção contra infecções, parasitas e outra condição de stress (BAKALLI *et al.*, 2008), além de serem responsáveis por atrair polinizadores e por poder agir na prevenção contra o ataque de herbívoros em algumas espécies de plantas (MATEO & JIMÉNEZ, 2000).

Terpenos são utilizados em inúmeras áreas da medicina, vários relatos indicam que os terpenos são bons agentes de penetração para a pele. Por isso, muitos terpenos tem

sido analisados como agentes suplementares para ação tópica em formulações cosméticas e de higiene pessoal. Terpenos apresentam baixa toxicidade e são portanto considerados agentes seguros, especialmente quando usados em imunocomprometidos. Na terapia anticâncer terpenos podem ser utilizados clinicamente como aceleradores para a aplicação de drogas com características lipofílicas e hidrofílicas. A via transdérmica, pode ser apropriada como uma rota alternativa de medicamentos como por exemplo para fármacos antitumorais, isso é especialmente importante pelo fato desse tratamento ser de longo prazo e minimizar efeitos colaterais do tratamento (GAO & SING, 1998).

Na terapêutica como carreadores para aplicação de drogas na dermatologia e cosmetologia em sistemas multifásicos e veículos, soluções de hidrogel e emulsões de óleo em água são possíveis aplicações. A justificativa de sua boa atividade como transdérmicos se explica pela perturbação reversível do arranjo de lipídeos intercelulares na região do estrato córneo (CALL et al. , 2006).

Moléculas pequenas são melhores agentes permeabilizantes do que as maiores. Os grupos apolares são mais efetivos que os polares, contudo para carrear moléculas hidrofóbicas os terpenos polares como cineol e mentol são mais efetivos. Essa atividade sinérgica dos terpenos foi estabelecida para os seguintes terpenos: mentol, cineol, terpineol (NARISHETTY & PANCHAGNULA , 2004).

A espécie *O. gratissimum* L. tem sido descrita como uma fonte de metabólitos secundários de importância biológica reconhecida.

Na tabela 1 consta uma série de compostos isolados de várias partes coletadas.

Tabela 1 : Lista de compostos isolados de *O. gratissimum* L.

Parte usada	Compostos	Referências
Folhas	Timol, eugenol	NADKARNI , 1999
Folhas	Gratissimol	SATYAVATI et al., 1997
Folhas	Eugenol, metileugenol, cis-ocimeno, trans-ocimeno, pineno, canfora, germacreno D, trans-cariofileno, farneseno, bisaboleno	MATASYOH et al., 2007
Folhas	Eugenol, bisaboleno e timol	JANINE et al., 2005
Sementes	Timol e eugenol	IWALOKUN et al., 2003
Folhas	Timol, p-cimeno, transabineno	KEITA et al., 2000
Folhas	Eugenol, 1,8-cineol, metil chavicol, linalol, metil eugenol	LAWRENCE, 1997
Partes aéreas	Eugenol, linalol, limoneno, metil eugenol, transcariofileno, farneseno, terpineol, metil isoeugenol, geraniol, copaeno, bisabolol, β -pineno, p-cimeno, cubeneno, T-cadinol, eudesmol, sabineno, mirceno, α -humelene, α -elemeno	PANDEY & CHOWDHURY, 2000
Partes aéreas	Eugenol	TEREZINHA et al., 2006
Folhas	Citral, etil cinamato, eugenol, linalol e timol	DUBEY et al., 1997
Folhas	Timol, terpineno, p-cimeno, limoneno, terpineol e 1,8-cineol	JIROVETZ et al., 2005
Extrato aquoso	Taninos, esteróides e terpenóides	OFFIAH et al., 1999
Folhas	Ácido oleanólico	NJOKU et al., 1997

3.4 Atividades farmacológicas

A Tabela 2 exhibe propriedades farmacológicas atribuídas à espécie *O. gratissimum*. Esses estudos demonstram várias atividades dos óleos essenciais extraídos de várias partes da espécie. As

atividades antimicrobiana, antifúngica e antioxidante são importantes para a prospecção de novas drogas antimicrobianas e na utilização como conservantes em formulações cosmeceúticas (AKINMOLADUN et al., 2007; DUBEY et al., 2000; MATIAS et al., 2010, NAKAMURA et al., 1999).

Tabela 2: Atividades farmacológicas de *O. gratissimum*.

Atividade	Tipo de extrato ou óleo	Referências
Analgésica		AZIBA et al., 1999
Antidiabética	Extrato aquoso das folhas	MOHAMMED et al., 2007
Antidiarréica		OFFIAH & CHIKWENDU, 1999
Antihipertensiva	Óleos essenciais das folhas	INTERAMINENSE et al., 2005
Antiinflamatória		SAHOUE et al., 2003
Antimicrobiana	Extratos aquosos das folhas	NAKAMURA et al., 1999
	Óleos essenciais das folhas	MATASYOH et al., 2007
	Extratos alcoólicos das folhas	NGASSOUMA et al., 2003
Antimutagênica	Extratos aquosos das folhas	OBASEIKI-EBOR et al., 1993
Antioxidante	Extratos aquosos das folhas	TREVISAN et al., 2006
	Óleos essenciais das folhas	AKINMOLADUN et al., 2007
Cardiovascular	Óleos essenciais das folhas	LAHLOU et al., 2004
Cicatrizadora		ORAFIDIYA et al., 2005
Citotóxica	Extrato alcoólico das folhas	DUBEY et al., 1997
Crescimento capilar	Óleos essenciais das folhas	ORAFIDIYA et al., 2004
Hepatoprotetora	Extrato aquoso das folhas	EFFRAIM et al., 2003
Imunoestimulatória	Extrato alcoólico das folhas	OLADUNMOYE et al., 2006
Leishmanicida	Óleos essenciais folhas	LUIZE et al., 2005
	Extratos aquosos folhas	
Nematicida	Óleos essenciais das folhas	CHATTERJE et al., 1982
Ovicida		PESSOA et al., 2002
Relaxamento gástrico	Extratos aquosos das folhas	OWULADE et al., 2004
Sistema Nervoso Central	Óleos essenciais das folhas	LÖSCHER & SCHMIDT et al., 1988
	Extratos aquoso das folhas	FREIRE et al., 2006

3.5 Mecanismo de ação antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais

Muitos produtos naturais quando avaliados como agentes antimicrobianos e como agentes modificadores de resistência mostram um efeito significativo contra muitas espécies de bactérias, seja revertendo à resistência natural de uma bactéria específica para determinado antibiótico, promovendo a eliminação de plasmídeos, inibindo transporte e funções importantes da membrana plasmática (JANA & DEB, 2006).

A estratégia de associação de produtos naturais com antibióticos tem sido chamada de “herbal shotgun”, onde se tem combinações de extratos e óleos vegetais visando não somente um alvo específico, mas vários alvos nos microorganismos, o que pode ocasionar em sinergismo com drogas utilizadas na terapêutica tradicional (HEMAISWARYA et al. 2008; WAGNER & ULRICH-MERZENICH 2009).

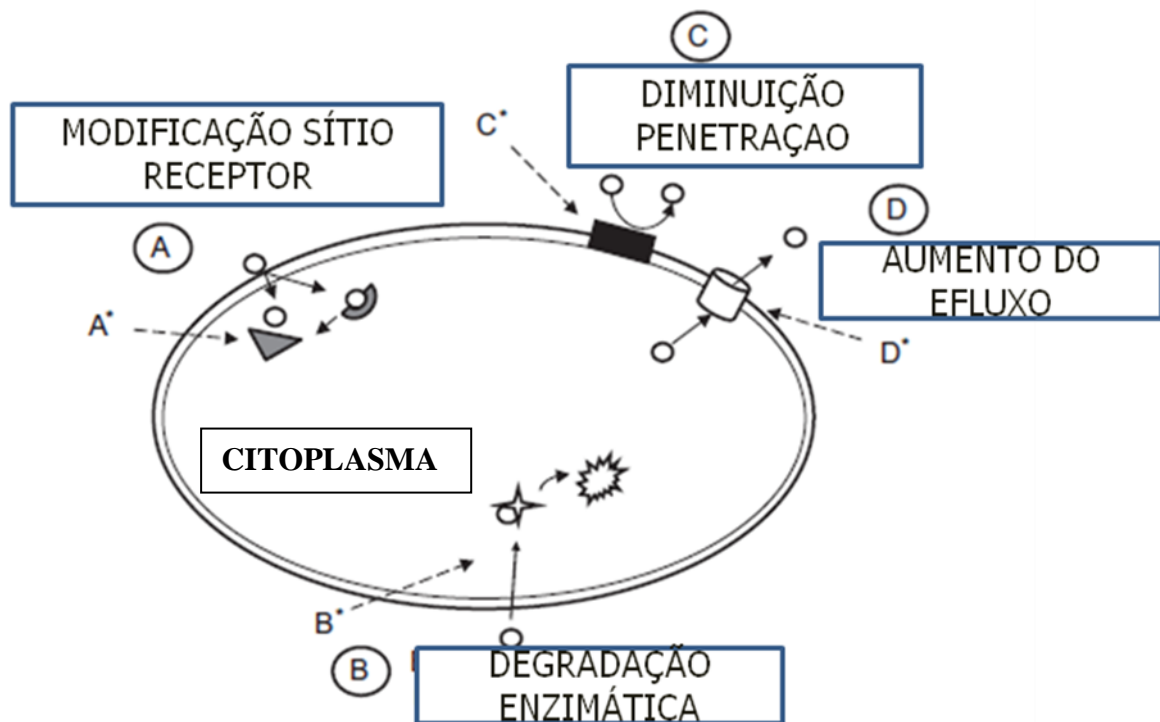


Figura 5: Mecanismos de ação dos componentes dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais afetam a membrana plasmática interferindo com a cadeia respiratória e produção de energia. A fraca atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra bactérias gram-negativas pode ser atribuída a presença de polissacarídeos hidrofílicos servindo como barreiras para componentes hidrofóbicos dos componentes ativos dos óleos essenciais (MANN et al. 1998, TASSOU & NYCHAS, 1995). O mecanismo de inibição envolve diferentes modos de ação, e é parte pode ser devido a sua hidrofobicidade., permitindo a maior entrada de antibióticos e a saída de componentes vitais do conteúdo celular (BURT, 2004).

Na figura 5 temos exibidos locais específicos da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes dos produtos naturais. São descritos na literatura a capacidade de desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Podendo muitas vezes ocorrer em uma mesma célula bacteriana mais de um mecanismo (BURT, 2004). Uma característica importante, responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, são os componentes hidrofóbicos que permitem a partição de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeável (SIKKEMA, 1994).

Componentes de óleos essenciais agem também em proteínas da membrana citoplasmática (KNOBLOCH et al., 1989). Hidrocarbonetos cíclicos poderiam agir sobre enzimas ATPases que são conhecidas por estarem localizados na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas, hidrocarbonetos lipídicos poderiam distorcer a interação lipidioproteína, interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína são possíveis (SIKKEMA, 1995), provocando fuga de íons e de material celular.

Alguns óleos essenciais estimularam o crescimento de pseudomicélios, uma indicação de que pode atuar sobre enzimas envolvidas na síntese de componentes estruturais das bactérias (CONNER & BEUCHAT, 1984).

Os metabólitos encontrados no gênero *Ocimum* apresentam dados na literatura que justificam sua atividade antimicrobiana e são sugeridos alguns mecanismo de ação. O eugenol inibe a produção de amilase e protease por *B. cereus*, degradação da parede celular e lise celular também foram encontradas (THOROSKI et al., 1989). O timol e carvacrol são agentes permeabilizantes da entrada de antibióticos. O Bloqueio enzimático pode ser também um potencial mecanismo de ação (WENDAKOON & SAKAGUCHI, 1995). Os terpenos cineol e linalol tem atividade contra bactérias da cavidade oral, pele e trato respiratório (KUBO et al.,).

Os óleos essenciais quando usados como agentes antimicrobianos apresentam baixo risco de resistência antimicrobiana devido a sua composição complexa, mistura de vários metabólitos, o que dificultaria a adaptabilidade dos microorganismos (DAFERERA et al., 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

As folhas e as inflorescências da espécie *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas no mês de Outubro de 2010 no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais – LPPN da Universidade Regional do Cariri – URCA, município de Crato – CE.

As exsicatas dos espécimes foram encaminhadas ao Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima – HCDAL do Departamento de Ciências Biológicas (URCA), as quais se encontram depositadas sobre os registros nº 3978.



Figura 6: Espécimes de *Ocimum gratissimum* L. no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas LPPN – URCA. Fonte: Francisco Rodrigo de Lemos Caldas.

4.2 Extração de óleos essenciais das folhas e inflorescências frescas de *Ocimum gratissimum* L.

Os óleos essenciais foram obtidos utilizando-se o sistema de hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger*. As folhas (500 g) e as inflorescências (200 g) frescas foram trituradas e colocadas separadamente em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com de 2,5 L de água destilada e aquecido até ebulição por 2 horas. Os óleos essenciais obtidos foram coletados e posteriormente secos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e armazenado sob refrigeração (-4 °C) até a realização das análises químicas, ensaios antibacterianos e antioxidantes.

4.3 Análise da composição química

As análises da composição química dos óleos essenciais de folhas e inflorescências coletados em dois horários diferentes, 8:00 e 12:00 horas respectivamente foram realizadas por Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas (CG/EM) em aparelho Shimadzu QP, Modelo 2010 usando-se coluna capilar não-polar OV-5, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1,7 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 25 °C para 230 °C em 4 °C/min e em seguida 180 °C para 250 °C em 10 °C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450 *m/z*.

O processo de identificação dos componentes individuais foi realizado pela correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com a comparação com os padrões relatados na literatura (ADAMS, 2001).

4.4 Avaliação antibacteriana e determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada a partir do método de microdiluição em caldo, modificado a partir do documento da CLSI/NCCLS M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). Foram utilizadas cinco linhagens padrão (ATCC) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo duas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Staphylococcus aureus* ATCC 6338 e quatro Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella*

pneumoniae ATCC 10031 e uma linhagem multirresistente isoladas de material clínico: *Escherichia coli* Ec 27 obtida do Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, obtida de escarro resistente a Aztreonam, Ampicilina, Amicacina, Amoxicilina, Cefadroxil, Cefaclor, Cefalotina, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Imipinem, Canamicina, Sulfametrim, Tetraciclina, Tobramicina. Previamente aos testes, as linhagens bacterianas foram inoculadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) caldo a 3,8% e incubadas durante 24 horas a 35 ± 2 °C. Após este pré-cultivo, procedeu-se à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI a 3,8%, com turvação correspondendo a 0,5 da Escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). Em seguida essa suspensão foi diluída até 1×10^6 UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados em placa de microdiluição com 96 poços, acrescido de diferentes concentrações dos óleos, resultando num inóculo final de 1×10^5 UFC/mL.

As soluções dos óleos essenciais foram preparadas utilizando 10 mg das amostras solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração realizaram-se diluições em água destilada para obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 26 e 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996). Como revelador, foi adicionado em cada poço, 25 µL de resazurina sódica preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v), por um período de uma hora em temperatura ambiente. O controle negativo foi efetuado com 100 µL de BHI acrescido do inóculo bacteriano padronizado.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração vermelha. A resazurina facilita a verificação do crescimento microbiano, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor vermelha indica a presença de células viáveis em crescimento. Dessa maneira foi determinada a menor concentração de cada óleo capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores diluídos (ALVES et al., 2008). Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

4.5 Avaliação da atividade moduladora por microdiluição

Para avaliação dos óleos essenciais como moduladores da atividade antibiótica, os CIMs dos antibióticos (benzilpenicilina, ceftriaxona, gentamicina), foram determinados na presença e ausência dos óleos essenciais pelo método de microdiluição, modificado a partir do documento CLSI/NCCLS M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). Foram utilizadas concentrações subinibitórias (CIM 1/8) em BHI a 10%.

Para os óleos essenciais das folhas utilizou-se três linhagens padrão: *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 12692, *E. coli* ATCC 25922 e uma linhagem multirresistente isoladas de material clínico: *E. coli* (Ec 27). Para os óleos essenciais provenientes das inflorescências também foram utilizadas três linhagens padrão: *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e uma linhagens multirresistente *E. coli* (Ec 27). As linhagens padrão foram selecionadas devido os óleos essenciais apresentarem as menores CIMs nos ensaios antibacterianos.

As soluções dos antibióticos foram preparadas com a adição de água destilada de forma a obter uma concentração correspondendo a 1024 µg/mL. Um volume de 100 µL de cada solução dos antibióticos foi diluída seriadamente (1:2) nos poços contendo o caldo BHI a 10% e a suspensão bacteriana diluída (1:10). As concentrações finais dos antibióticos no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C e a atividade foi evidenciada pelo uso de resazurina sódica como especificado anteriormente.

4.6 Avaliação da atividade moduladora dos óleos essenciais pelo método do contato gasoso

Os óleos essenciais foram também analisados para a atividade moduladora utilizando o método de contato gasoso (modificação a partir de INOUE, TAKIZAWA e YAMAGUCHI, 2001). Nesse ensaio foram utilizadas duas linhagens padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo uma Gram-positiva, *S. aureus* ATCC 12692, e outra Gram-negativa, *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Previamente, essas linhagens foram inoculadas em placas contendo BHI ágar e incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C. Após esse período, foram suspensas em tudo de ensaio com água destilada de forma a obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1 x 10⁸ UFC/mL). Um *swab* estéril foi imerso na suspensão bacteriana e, retirou-

se o excesso de inóculo através da compressão do *swab* nas paredes do tubo, em seguida, foi semeada na base das placas com Plate Count Agar (PCA) uniformemente em estrias.

Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando concentração de 50 µg dos óleos essenciais diluídos em DMSO. Na base das placas onde continha o BHI mais o inóculo bacteriano foram adicionados discos dos seguintes antibióticos: tetraciclina (30 µg/disco), amicacina (30 µg/disco) e gentamicina (10 µg/disco), em seguida as placas foram invertidas e um volume de 50 µL de cada concentração foi colocado no interior da tampa, de forma que os constituintes dos óleos essenciais pudessem interagir com os antibióticos. Após esse procedimento, as placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e os resultados lidos com auxílio de uma régua milimetrada, sendo os diâmetros dos halos de inibição dos controles comparados aos Padrões Interpretativos dos Diâmetros dos Halos Inibição estabelecido pela CLSI/NCCLS (2003). Para avaliar a presença de sinergismo ou antagonismo dos óleos essenciais foram utilizados os discos dos antibióticos, sendo adicionados nas placas, posteriormente determinaram-se as alterações no diâmetro do halo de inibição frente às linhagens analisadas. Placas sem o óleo essencial e com DMSO foram utilizadas como controle.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de inflorescências e folhas foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* por seqüestro do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (MENSOR et al., 2001). Quando uma solução de DPPH é misturada a um substrato que age como um doador de hidrogênio, uma forma não radicalar estável do DPPH é obtida com uma simultânea mudança de coloração do violeta para o amarelo (SZABO et al., 2007).

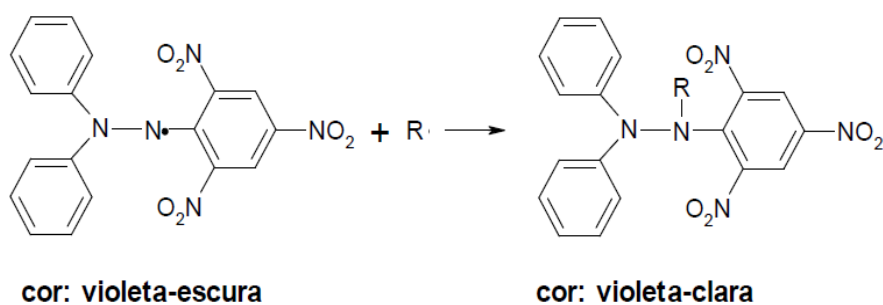


Figura 7: DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).

As amostras para a realização do ensaio foram preparadas adicionando-se 1 mL da solução de DPPH (60 μ M) em 2,5 mL de soluções dos óleos essenciais que foram diluídas em metanol nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 μ g/mL. Após o tempo de reação de 30 minutos das amostras preparadas, as absorvâncias foram lidas com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 520 nm.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase, chegando-se assim à concentração das amostras que promovesse a diminuição para a metade da concentração inicial de DPPH (50%), definida como Concentração Efetiva (CE 50) (MENSOR et al., 2001).

Um teste em branco foi realizado adicionando-se 1 mL de metanol a 2,5 mL das concentrações dos óleos. Como controle negativo foi usado a mistura de 1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de metanol e como controle positivo utilizou-se o 2,5 mL das concentrações de BHT (butil-hidroxitolueno) e 1 mL da solução de DPPH. A atividade antioxidante (AA) das amostras por seqüestro do DPPH foi expressa em porcentagem, segundo a equação apresentada:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{\text{óleo}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100]}{Abs_{\text{controle}}} \right\}$$

AA%: Atividade antioxidante em percentual

Abs óleo: Absorvância do óleo essencial

Abs branco: Absorvância do branco

Abs controle: Absorvância do controle positivo

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e \pm desvio padrão da média, avaliados estatisticamente usando-se o teste de *Tukey* e análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microcal Origin 6,0 para Windows, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises químicas dos óleos essenciais

Os resultados da composição química dos óleos estudados de folhas e inflorescências, seus índices de retenção e composição percentual são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Constituintes químicos identificados por CG/EM presentes nos óleos essenciais de *O. gratissimum*

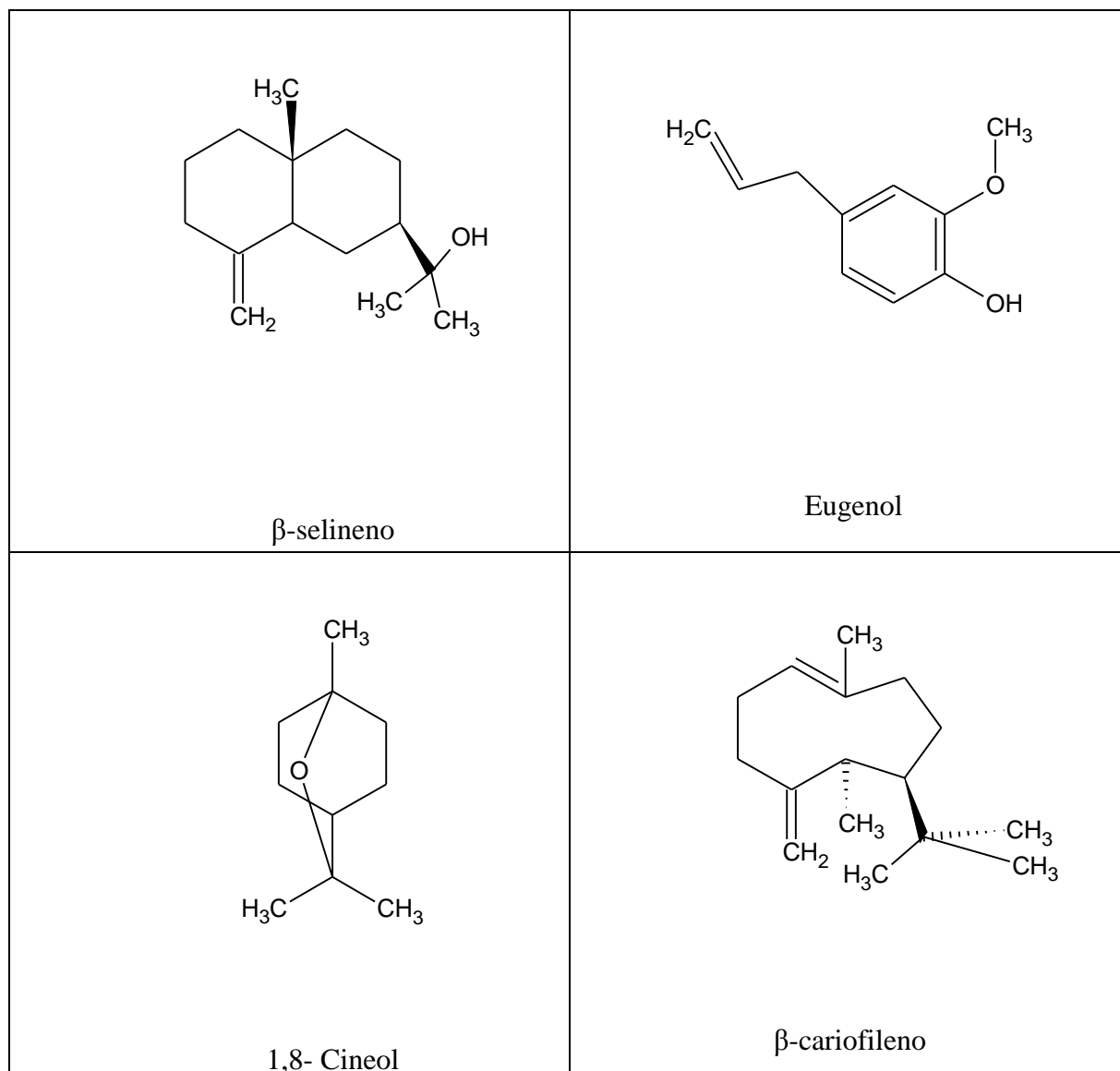
Constituintes	IR exp	IR Lit	Composição química %			
			Folhas		Inflorescências	
			08:00	12:00	08:00	12:00
α -pineno	999	939	0,78	0,61	0,48	0,26
sabineno	1026	975	0,69	ND	ND	0,31
β -pineno	1029	979	1,94	1,59	ND	0,94
mirreno	1041	990	0,53	0,46	ND	ND
1,8-cineol	1069	1031	22,94	19,8	25,04	17,05
β -ocimeno	1079	1037	5,33	4,66	1,38	1,75
linalool	1126	1096	0,54	0,45	0,93	0,87
α -terpineol	1198	1188	0,72	0,74	0,89	1,38
Timol	1278	1290	ND	ND	ND	0,2
Eugenol	1325	1359	53,31	52,22	40,74	21,89
α -copaeno	1347	1376	ND	ND	ND	0,51
β -bourboneno	1356	1388	ND	ND	ND	0,72
β -elemeno	1358	1390	ND	ND	ND	0,77
β-cariofileno	1389	1408	2,19	1,87	6,47	12,44
Aromandreno	1398	1441	ND	ND	ND	0,61
α -humuleno	1409	1454	ND	ND	ND	1,83
germacreno D	1431	1485	0,81	ND	1,49	4,26
β-selineno	1434	1489	2,68	2,68	10,98	19,97
α -selineno	1442	1498	0,93	1,87	1,99	5,51
óxido cariofileno	1512	1583	ND	ND	ND	4,31
TOTAL IDENTIFICADO			93,39	86,95	90,39	95,58

ND: Não detectado. IR exp: Índice de retenção relativo experimental: n-alcenos foram utilizados como ponto de referência no cálculos dos índices de retenção relativo. IR Lit: Índice de retenção relativo valores da literatura (ADAMS, 2001)

O Eugenol foi o constituinte majoritário identificado em todos os óleos, apresentando maior concentração nas folhas (40,74% e 21,89% nas inflorescências coletadas às 08:00 e às 12:00, respectivamente, e 53,29% e 52,22% nas folhas coletadas às 8:00 horas e às 12:00, respectivamente). Esses resultados obtidos sugerem a classificação do quimiotipo do material estudado no quimiotipo eugenol, presente em regiões tropicais, relatado em trabalhos anteriores (SILVA, et al., 1999; SILVA et al., 2010; MADEIRA et al., 2002; FREIRE et al., 2006; RABELO et al., 2003 ;SANGWAN et al., 2001).

Foram encontrados como componentes majoritários os compostos exibidos na Figura 8.

Figura 8: Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e inflorescências frescas de *O. gratissimum* L.



Silva et al. (2010) e Madeira et al. (2002), também descreveram o eugenol e 1,8 cineol, como principais constituintes do óleo essencial das folhas. Silva et al. (2010) demonstrou que eugenol foi o constituinte mais abundante nas inflorescências. Jirovetz et al. (2003) analisando a composição fitoquímica dos óleos extraídos de folhas de *O. gratissimum* L. o determinou como principal constituinte (63,36%). A composição do óleo essencial obtido das folhas de *Ocimum gratissimum* L. em diferentes estações do ano foi determinada por Freire et al. (2006), obtendo a quantidade de eugenol e do monoterpeneo 1,8-cineol como componentes majoritários em todas as quatro estações.

Analisando a Tabela 4, os óleos obtidos das inflorescências foram mais ricos em sesquiterpenóides, a subclasse de hidrocarbonetos sesquiterpenos foram encontrados em concentrações superiores, tendo destaque β -selineno (10,98% Versus 19,97%) e β -cariofileno (6,47% Versus 12,44%), para as coletas 8:00 e 12:00 respectivamente. Considerando as principais classes e subclasses, houve diferenças quantitativas entre as folhas e inflorescência de óleo essencial. A concentração dos fenilpropanóides no óleo essencial das folhas foi superior ao do óleo essencial das inflorescências (53,31%, 52,22% nas folhas e 40,74% e 21,89% nas inflorescências).

Tabela 4: Principais classes e subclasses de constituintes presentes nos óleos de folhas e inflorescências de *O. gratissimum* L. coletados em horários diferentes

Classes e subclasses dos compostos		Percentual %			
		OEGF 08:00	OEGF 12:00	OEGI 08:00	OEGI 12:00
Monoterpenóides	Monoterpenos hidrocarbonos	9,27	7,32	1,86	3,26
	Monoterpenos oxigenados	24,20	20,99	26,86	19,50
Sesquiterpenóides	Sesquiterpenos hidrocarbonos	6,61	6,42	20,93	46,62
	Sesquiterpenos oxigenados	ND	ND	ND	4,31
Fenilpropanóides		53,31	52,22	40,74	21,89
Total identificado		93,39	86,95	90,39	95,58

ND: Não detectado

O óleo essencial extraído das inflorescências coletados às 12:00 apresentou o maior teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos (46,62%), sendo os mais representativos β -selineno (19,97%), α -selineno (5,51%), Germacreno D (4,26%), α -humuleno (1,83%), β -cariofileno (12,44%). Os sesquiterpenos oxigenados tiveram uma participação minoritária no perfil dos óleos essenciais.

A classe dos monoterpenóides foi caracterizada como a segunda classe importante de compostos voláteis. Os monoterpenos oxigenados foram detectados em todos os óleos em concentrações representativas. O monoterpeno oxigenado 1,8-cineol, foi classificado como o segundo componente mais abundante em folhas. Os resultados obtidos divergem dos trabalhos anteriores (SILVA, et al., 1999; SILVA et al., 2010; MADEIRA et al., 2002; FREIRE et al., 2006; RABELO et al., 2003), quanto ao percentual dos constituintes.

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação apresentaram rendimentos de 0,52% para as folhas e de 0,30% para as inflorescências. Em trabalhos anteriores observaram-se que os rendimentos dos óleos essenciais das folhas e das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. estão na ordem de 0,21% a 0,70 % (DUBEY, et al., 2000; LUZ, et al., 2009; CORTEZ, et al., 1998; NAKAMURA, et al., 1998; SILVA, et al., 2009), sendo encontrados em alguns quimiotipos, como o quimiotipo geraniol teores de 1,66% (VIEIRA, et al., 2001).

As diferenças encontradas entre os resultados obtidos dos ensaios realizados e dados encontrados em outros trabalhos se devem a diversos fatores. Luz et al., 2009 afirma que a produção dos metabólitos secundários, quando submetida a estímulos ambientais está sob o controle de dois padrões de resposta, um de maior dimensão e mais lento, sazonal, e outro mais rápido e de menor alteração, influenciado pelas flutuações climáticas diárias. A composição química do óleo essencial pode variar devido a diversidade genética, o hábitat e os tratos culturais. A época da colheita, fontes geográficas, o horário, o modo de secagem do material vegetal, parte da planta e fatores ambientais, como umidade, água, solo e herbivoria também podem influenciar sobre a composição e o teor do óleo e com isso aumentar ou diminuir a resposta biológica.

A produção de óleos essenciais a partir de plantas depende de vários fatores de ordem bioquímica, metabólica e genética. A regulação fisiológica, além de ser exercida de uma forma específica de desenvolvimento, é altamente suscetível à modulação através de uma regulamentação ambiental, parâmetros meteorológicos; como temperatura atmosférica e a quantidade de chuvas que têm sido relatados a influenciar o teor de óleo e composição em várias plantas aromáticas (SANGWAN et al., 2001; CARVALHO et al., 2006b; GOBBO & LOPES, 2007).

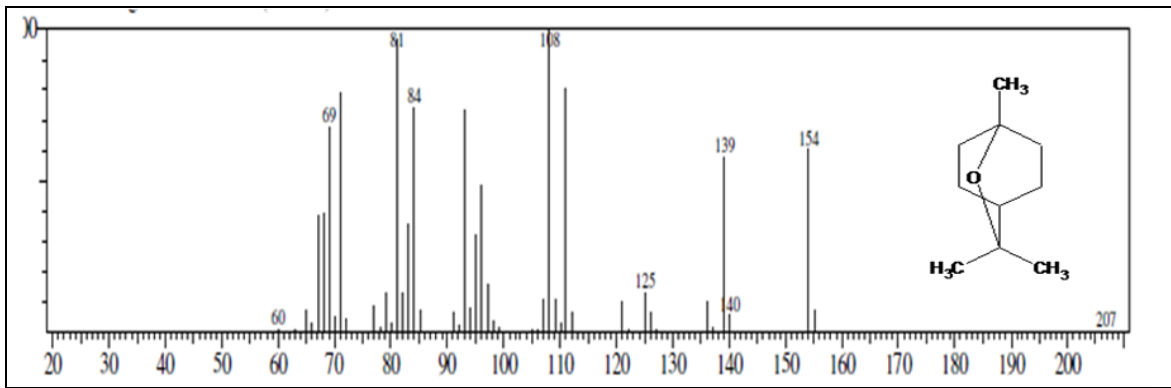


Figura 9: Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do 1,8-cineol

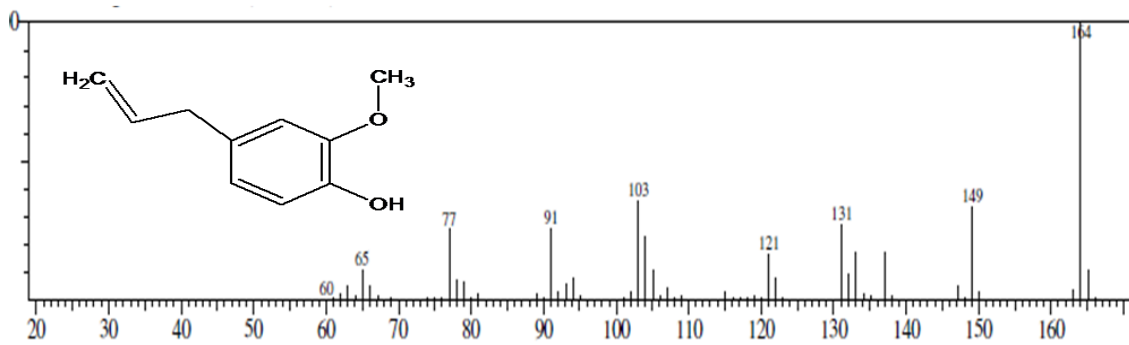


Figura 10: Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do Eugenol

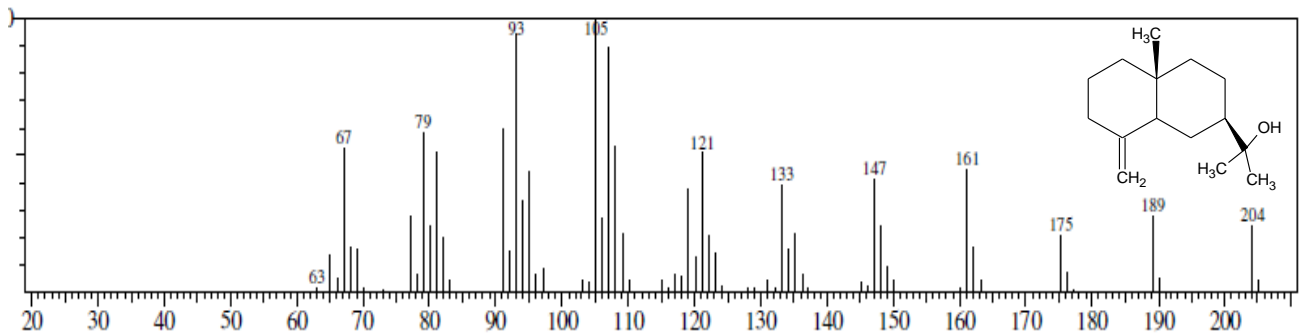


Figura 11: Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do β -selineno

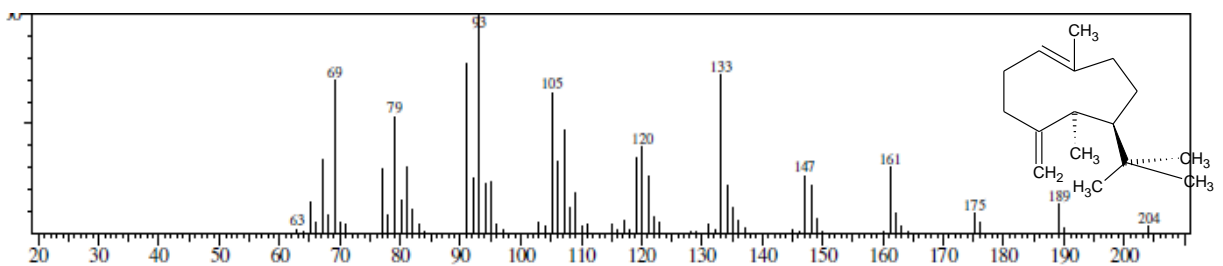


Figura 12: Espectro de massas (i.e., 70 eV.) do β -cariofileno

5.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os resultados dos ensaios com óleos essenciais demonstraram atividade antibacteriana tanto para folhas como para as inflorescências. Na análise dos resultados observou-se que os óleos apresentaram atividades inibitórias frente as bactérias testadas. Os óleos apresentaram atividade frente às linhagens Gram-positivas e Gram-negativas padrão e multirresistente, apresentando valores de CIM entre 256-512 µg/mL para as bactérias Gram-positivas testadas (exceto para o óleo obtido a partir de inflorescência coletado às 8:00 horas testado sobre a linhagem padrão *S. aureus* ATCC 6338) e de 128-512 µg/mL para as Gram-negativas (Tabela 5).

O óleo essencial obtido a partir das inflorescências coletadas às 8:00 horas foi o que apresentou o menor valor de CIM (128 µg/mL), sendo essa concentração sobre bactéria Gram-negativa *E. coli* (*Ec 27*) multiresistente um resultado significativo, já que na literatura é relatado a maior resistência das bactérias Gram-negativas a ação de óleos essenciais, descrita como decorrência da complexa dupla membrana apresentada por estes microrganismos, a qual limita a difusão de compostos hidrofóbicos, através de sua cobertura lipopolissacarídica (BURT, 2004; HOLLEY & PATEL, 2005).

Tabela 5: Concentração inibitória mínima - CIM dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. coletados em horários diferentes

Bactérias	CIM µg/mL			
	OEOGF		OEOGI	
	8:00	12:00	8:00	12:00
<i>S. aureus</i> ATCC 12692	256	256	256	256
<i>S. aureus</i> ATCC 6338	512	512	≥ 1024	512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	256	256	512	256
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	256	512	512
<i>E. coli</i> Ec 27	512	256	128	256
<i>k. pneumoniae</i> ATCC 10031	512	512	256	256

OEOGF: Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas

OEOGI: Óleo essencial de inflorescências de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas

A composição química com elevado teor de terpenos justifica a atividade antimicrobiana dos terpenos. Os terpenos tem sido descritos com atividade antimicrobiana, sobre as bactérias Gram-positivas e gram-negativas, os microrganismos possuem uma sensibilidade diferenciada, dependendo do material vegetal analisado e a composição química dos óleos e extratos. Em geral, bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos terpenos do que os Gram-negativos (BURT, 2004).

O mecanismo de ação dos terpenos é intimamente associado a seu caráter lipofílico. Monoterpenos preferencialmente influenciam estruturas de membrana o que aumenta a fluidez e permeabilidade, alterando a topologia das proteínas da membrana e induzindo perturbações na cadeia respiratória. Uma mistura de terpinen-4-ol, α -terpineol, 1,8-cineol e linalol (monoterpenos) tem demonstrado possuir atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativos isolados da cavidade oral, pele e trato respiratório. Além disso, resultados promissores foram obtidos em testes contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*. A ordem de classificação da atividade antibacteriana de terpenos contra o *S. aureus* foi: > farnesol >(+) - nerolidol > plaunotol > monoterpenos >, tais como (-)-citronelol, geraniol, nerol e linalol. Timol e (+)-mentol (Monoterpenos) também expressaram elevada toxicidade quando analisados contra cepas de *S. aureus* e, adicionalmente, (+)-mentol foi tóxico contra *Escherichia coli* (TROMBETTA et al., 2005; HADA et al., 2003).

O constituinte sesquiterpeno β -cariofileno possui atividade antimicrobiana (OZÜRK et al., 2009). O (E)-cariofileno apresentou atividade antimicrobiana (JULIANI Jr. et al., 2002), a atividade antimicrobiana do germacreno D, foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar (BIAVATTI et al., 2001) e microdiluição em caldo (DEUSCHLE et al., 2007). Em ambos os casos, o germacreno D apresentou-se inativo contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Micrococcus roseus*, *M. luteus*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações testadas (até 5 mg/mL). No entanto, o germacreno D é um dos constituintes majoritários presente em óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana, extraídos de diferentes espécies vegetais (JUTEAU et al., 2002; GONZAGA et al., 2003; IACOBELLIS et al., 2005) e, segundo FRANCESCATO et al., (2007) esse constituinte pode estar contribuindo para a atividade antimicrobiana de constituinte(s) ativo(s) desses óleos essenciais.

Kubo et al. (1993) sugeriu que a atividade de terpenos contra *S. aureus* pode ser estreitamente dependente do número de átomos de carbono na cadeia hidrofóbica das hidrofílico grupos hidroxila. No entanto, esta sugestão não foi totalmente confirmada.

Recentemente, foi proposto que a atividade antibacteriana contra *S. aureus* depende dos comprimentos das cadeias alifáticas de álcoois terpênicos e da presença de ligações duplas (INOUE et al., 2004). Por sua vez, os sesquiterpenóides nerolidol, farnesol, bisabolol e apitone são responsáveis pelo aumento da permeabilidade bacteriana e susceptibilidade aos antibióticos (BREHM & JOHNSON, 2003). O terpeno mais importante que pode ser utilizado em terapia antimicrobiana é (4R)-(+)- carvona (Monoterpenos), que foi eficaz contra a *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus* apresentaram atividade para *Escherichia coli* (CARVALHO & FONSECA, 2006).

O fenilpropanóide eugenol, um dos componentes majoritários presentes nos óleos essenciais analisados, tem sido reportado como um metabólito secundário com atividade antimicrobiana contra bactérias; *B. cereus*, *C. jejuni*, *E. coli* 0157:H7, *S. enterica*, *Aeromonas hydrophila*, *S. typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* (WENDAKOON AND SAKAGUCHI, 1995; FRIEDMAN et al., 2002).

Nakamura et al. (1999) descreveu a atividade de óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* contra *S. aureus*, e também contra membros da família Enterobacteriaceae; apresentou atividade contra *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*. Diferentemente dos resultados obtidos por NAKAMURA et al. (1999), no nosso screening antibacteriano, *P. aeruginosa* apresentou sensibilidade ao óleo essencial de folhas de *O. gratissimum*. Outros estudos demonstraram atividade dos óleos essenciais para *B. cereus* e *E. faecalis* (NGASSOUMA et al., 2003) e elevada atividade contra *Shigella dysenteriae* (IWALOKUN et al., 2001), o que explica a utilização das partes aéreas do *O. gratissimum*, na medicina popular para o tratamento das disenterias. AKINYEMI et al. (2005) confirma atividade de extratos de etanólicos *O. gratissimum* nativo do Sudoeste da Nigéria contra *S. aureus* resistentes a metilina (SARM).

Matasyoh et al. (2007) mostrou que o óleo de *O. gratissimum* possui atividade antimicrobiana contra cepas patogênicas de bactérias Gram positivas de *S. aureus* e *Bacillus* spp. e Gram negativas (*Escherichia Coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*), e contra um fungo patogênico *C. albicans*. Sendo que a atividade contra as bactérias Gram positivas foi mais pronunciada ou igual ao antibiótico controle.

Cimanga et al., (2002) menciona que quando comparamos muitos óleos, por exemplo; os óleos de *A. stipulatum* e *O. gratissimum* (timol >10%) ao óleo *M. myristica* (timol < 1%) deveria se esperar maior atividade antimicrobiana, e isso não é observado. Seus dados sugerem que os componentes fitoquímicos presentes em maior percentual, não são necessariamente os responsáveis pela atividade biológica dos óleos essenciais, e que por

muitas vezes não se observa correlação entre o percentual dos componentes e sua atividade antimicrobiana. Assim, a participação dos constituintes menos abundantes deve ser considerada importante e a existência de um efeito sinérgico entre eles. Na análise dos resultados do *screening* antibacteriano devem ser considerados diversos fatores; partes coletadas da planta, o meio de cultura, a técnica utilizada, o estado da planta utilizado, a idade e a origem, as áreas geográficas das plantas, a quantidade de óleo utilizado e a técnica de isolamento, todos esses fatores são importantes para explicar a grande variedade dos resultados obtidos das atividades biológicas das plantas.

5.3 Atividade moduladora dos óleos essenciais por microdiluição

As Tabelas 6 e 7, mostram a interferência dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *O. gratissimum* L. sobre a atividade dos antibióticos analisados. Os antibióticos analisados nos ensaios foram:

Benzilpenicilina, um composto β -lactâmico. Exerce ação bactericida no estágio de multiplicação de microrganismos sensíveis, atuando por inibição do mucopeptídeo da parede celular, não sendo ativo contra bactérias produtoras de penicilinas, as quais inclui muitas vezes cepas de estafilococos, age inibindo a síntese do peptidoglicano e conseqüentemente a parede celular (BULÁRIO ELETRÔNICO ANVISA)

Ceftriaxona; cefalosporina semi-sintética de "terceira geração", com uma meia-vida longa, que resulta em um esquema de administração recomendada uma vez por dia. É administrado por via intravenosa ou intramuscular e tem um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativos aeróbicos e alguns anaeróbicos. Embora a Ceftriaxona tenha alguma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, com base em evidências não pode ser recomendado como terapia única de antibiótico em infecções por *pseudomonas* (RICHARDS et al.,1984).

Gentamicina é um aminoglicosídeo, potente antibiótico bactericida que atuam através da criação de fissuras na membrana externa da célula bacteriana. Esse grupo tem como característica inibir a síntese protéica ao se ligar a subunidade 30s do ribossomo microbiano causando a morte de bactérias, particularmente ativos contra aeróbios, bactérias gram-negativas e agem sinergicamente contra algumas bactérias gram-positivas (GONZALEZ & SPENCER, 1998; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Analisando a Tabela 6, foram observadas alterações relevantes nas CIMs dos antibióticos foram observadas quando adicionados os óleos essenciais de folhas frescas ao meio de crescimento em concentrações (CIM 1/8):

Tabela 6 : Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos na ausência e presença de folhas frescas de *O. gratissimum* L. coletados em horários diferentes

AMOSTRA	LINHAGENS		Benzilpenicilina	Gentamicina	Ceftriaxona	
			µg/ml	µg/ml	µg/ml	
OEOGF8	<i>P.a 15442</i>	MIC	≥1024	1	4	
		OE 32 µg/mL	≥1024	1	64	
	<i>E.coli 25922</i>	MIC	≥1024	8	8	
		OE 64 µg/mL	≥1024	4	0,5	
	<i>E.coli 27</i>	MIC	≥1024	1	64	
		OE 64 µg/mL	≥1024	2	16	
	<i>S.a 12692</i>	MIC	512	16	16	
		OE 32 µg/mL	512	1	8	
	OEOGF12	<i>P.a 15442</i>	MIC	≥1024	1	4
			OE 32 µg/mL	≥1024	1	4
		<i>E.coli 25922</i>	MIC	≥1024	8	8
			OE 32 µg/mL	≥1024	8	8
<i>E.coli 27</i>		MIC	≥1024	1	64	
		OE 32 µg/mL	256	1	8	
<i>S.a 12692</i>		MIC	512	16	16	
		OE 32 µg/mL	256	2	8	

OEOGF: Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas

P. aeruginosa ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E.coli 27*, *S. aureus* ATCC 12692

Os óleos essenciais das folhas frescas coletados as 8:00 horas foram utilizados na concentração de 32 µg/mL (CIM 1/8) frente à *P. aeruginosa*, ocorrendo aumento de CIM (4 para 64 µg/mL) na presença de ceftriaxona, caracterizando antagonismo. Frente à *S. aureus* foi observada atividade moduladora sinérgica sobre a gentamicina (16-1 µg/mL) e ceftriaxona (16-8 µg/mL). Quando testado sua atividade sobre *E. coli* ATCC 25922 ocorreu sinergismo sobre a atividade de ceftriaxona ocorrendo redução de CIM (8-0,5 µg/mL) e sobre a gentamicina. O mesmo sinergismo ocorreu quando o óleo foi testado contra *E. coli* 27 (64-16 µg/mL) na presença da cefalosporina.

Os óleos essenciais de folhas frescas coletados as 12:00 horas foram utilizados sempre na concentração de 32 µg/mL (CIM 1/8). Quando testado sua atividade sobre *E. coli* 27 ocorreu redução de CIM (1024-256 µg/mL), caracterizando efeito modulador sinérgico sobre a benzilpenicilina. Sobre a atividade da ceftriaxona apresentou redução de CIM (64 para 8 µg/mL) com a mesma bactéria multiresistente. Frente à *S. aureus* ATCC 12692, apresentou efeito sinérgico com benzilpenicilina, gentamicina e ceftriaxona.

Analisando a Tabela 5, foram observadas alterações relevantes nas CIMs dos antibióticos foram observadas quando adicionados os óleos essenciais de inflorescências frescas ao meio de crescimento em concentrações (CIM 1/8).

Os óleos essenciais de inflorescências coletados as 8:00 horas quando testados em sua menor concentração de 16 µg/mL sobre *E. coli* 27 apresentou sinergismo com gentamicina (16 para 8 µg/mL) e com ceftriaxona (32 para 4 µg/mL). Na concentração de 32 µg/mL; frente a *S. aureus* ATCC 12692 apresentou antagonismo com benzilpenicilina, aumento de CIM (512-1024 µg/mL), sinergismo com gentamicina (redução de CIM 16-8 µg/mL), sinergismo com ceftriaxona (4-2 µg/mL). Contra *K. pneumoniae* ATCC 10031 apresentou antagonismo com gentamicina (0,5 -2 µg/mL). Frente a *P. aeruginosa* apresentou antagonismo com benzilpenicilina.

Os ensaios dos óleos essenciais de inflorescências coletados as 12:00 horas foram realizados na concentração de 32 µg/mL para esse óleo. Obtendo-se as seguintes interações relevantes: Contra *P. aeruginosa* ATCC 15442 efeito antagônico com gentamicina. Contra *E. coli* 27 redução de CIM (16-4 µg/mL) com gentamicina caracterizando sinergismo. Também foi encontrado presença de sinergismo com ceftriaxona contra *E. coli* 27 (32-8 µg/mL). Redução de CIM (512-256 µg/mL) contra *S. aureus* ATCC 12692 na presença de benzilpenicilina caracterizando sinergismo.

Tabela 7 : Concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos na ausência e presença de inflorescências frescas de *O. gratissimum* L. coletados em horários diferentes

AMOSTRA	LINHAGENS		Benzilpenicilina	Gentamicina	Ceftriaxona	
			µg/ml	µg/ml	µg/ml	
OEOGI8	<i>P.a 15442</i>	MIC	512	32	32	
		OE 64 µg/mL	≥1024	32	32	
	<i>K.pneu10031</i>	MIC	512	0,5	8	
		OE 32 µg/mL	512	2	8	
	<i>E.coli 27</i>	MIC	512	16	32	
		OE 16 µg/mL	512	8	4	
	<i>S.a 12692</i>	MIC	512	16	4	
		OE 32 µg/mL	≥1024	8	2	
	OEOGI12	<i>P.a 15442</i>	MIC	512	32	32
			OE 32 µg/mL	512	256	32
		<i>K.pneu10031</i>	MIC	512	0,5	8
			OE 32 µg/mL	512	0,5	8
<i>E.coli 27</i>		MIC	512	16	32	
		OE 32 µg/mL	512	4	8	
<i>S.a 12692</i>		MIC	512	16	4	
		OE 32 µg/mL	256	16	4	

OEOGI: Óleo essencial de inflorescências frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas

P. aeruginosa ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E.coli 27*, *S. aureus* ATCC 12692

A característica da interferência exercida sobre a atividade antibiótica variou de acordo com o tipo do antibiótico em contato com os óleos essenciais, e tipo de linhagem bacteriana analisada. Embora existam estudos sobre a atividade bacteriana dessa espécie, não tem sido relatado estudos comparativos de atividade modulatória de óleos de folhas e inflorescências de *O. gratissimum* com antibióticos pelo método de microdiluição.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública. O aumento dos casos de resistência a essa classe de antibiótico é amplamente reconhecido como um grave ameaça à saúde (COUTINHO et al., 2008; COUTINHO et al., 2009). Um exemplo de relevância clínica são as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, tanto hospitalares quanto domiciliares, apresentando morbidade e mortalidade elevadas.

Na clínica médica em situações especiais, torna-se necessária a associação de dois ou mais antimicrobianos a fim de se obter ação sinérgica entre os mesmos, ampliação do espectro de ação ou ainda melhor proteção de pacientes com imunodepressão. As drogas a serem associadas devem ter, preferencialmente, as seguintes características: ação bactericida, mecanismo de ação diferente, espectro específico e menor custo. Contudo, o uso indiscriminado dessas associações tem também contribuído para o aumento de linhagens bacterianas multirresistentes.

Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas. A busca de novos agentes antibacterianos é importante devido ao aumento progressivo na resistência de linhagens bacterianas a várias classes de antibióticos (COSTA et al., 2007).

Os principais mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos são efluxo ativo do antibiótico, modificação do sítio ativo de ligação a droga alteração por mutação ou inativação enzimática e alteração da permeabilidade da bactéria à droga (HEMAISWARYA et al., 2008).

Produtos naturais de origem vegetal podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência. Vários trabalhos relatam a modulação de extratos vegetais sobre a atividade antibiótica e, uma forte tendência na potencialização de aminoglicosídeos tem sido observada (COUTINHO et al. 2008).

Chung *et al.*, (2009), mostrou que a atividade da oxacilina sobre *S. aureus* resistentes a oxacilina, foi aumentada pelo sinergismo de vulgarone B, componente encontrado em óleos essenciais de *Artemisia iwayomogi* K.O mecanismo pode estar associado a capacidade desse componente clivar o DNA e causar morte celular. AVERINOVA *et al.*, (1975) já tem descrito sinergismo de óleo essencial de *O. gratissimum* com ampicilina, canamicina, ácido fusídico, na ação contra cepas de *S. aureus* 209.

Nweze & Eze (2009) concluíram após investigação pelo método de difusão em ágar a interação existente entre extratos de folhas de *O. gratissimum* com vários antibióticos, destacando-se a interação com estreptomicina, quando testadas contra cepas padrões de *E. coli*, caracterizando presença de antagonismo. MATIAS *et al.*, (2010) realizou testes com

extratos metanólicos de folhas de *O. gratissimum* onde foi observada sinergismo com aminoglicosídeos contra cepas multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*.

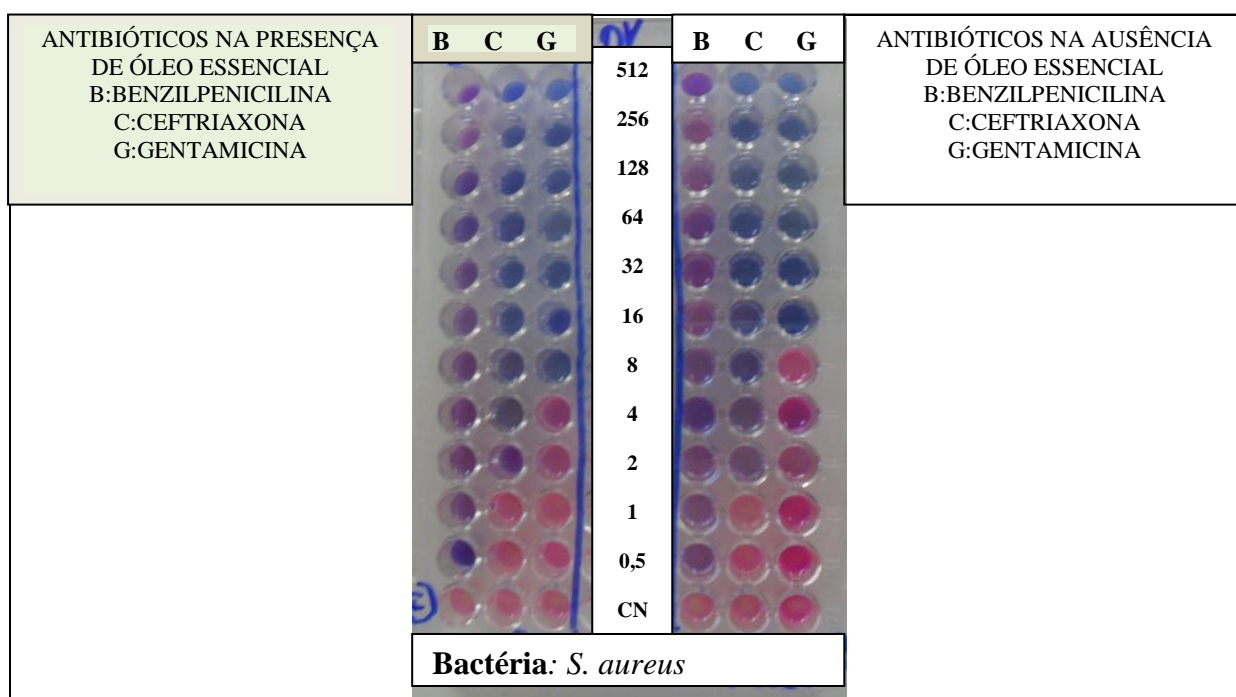


Figura 13: Placa de microtitulação com 96 poços fundo U, utilizada na investigação da atividade moduladora de óleos essenciais de inflorescências de *O. gratissimum* coletados as 8:00 horas.

5.4 Atividade moduladora dos óleos essenciais por componentes voláteis dos óleos essenciais.

Nessa avaliação, os diâmetros dos halos de inibição obtidos para a gentamicina, tetraciclina e amicacina frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram classificados como sensíveis quando comparado ao padrão estabelecido pela CLSI/NCCLS (2003).

Na concentração analisada os óleos essenciais de folhas e inflorescências mostraram atividade moduladora sinérgica para os aminoglicosídeos, gentamicina e amicacina, frente a *P. aeruginosa*, destacando-se o óleo obtido das inflorescências coletados às 12:00 horas que exibiu aumento na atividade antibiótica da gentamicina, aumento de 64,29% no diâmetro de halo de inibição (Tabela 7).

Na modulação com as tetraciclinas frente a *P. aeruginosa*, os óleos essenciais apresentaram redução da atividade antibiótica, destacando-se mais uma vez o óleo essencial das inflorescências coletados as 12:00 horas, com redução de 72,31% no diâmetro de halo de inibição (Tabela 6).

Tabela 8 : Modificação da atividade antibiótica por componentes voláteis do óleo essencial de *O. gratissimum* por contato gasoso frente à *P. aeruginosa* ATCC 15442

Tratamento	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 (mm ± DP %)					
	Gentamicina		Tetraciclina		Amicacina	
	10µg	A (%)	30 µg	A (%)	30 µg	A (%)
SEM TRATAMENTO	14±0,6	0,00	32±0,6	0,00	15±0,6	0,00
DMSO	14±0,6	0,00	32±1,1	0,00	15±1,5	0,00
OEOGF 8:00	17±0,6	21,43	12±0,6*	-63,08	19±0,6*	26,67
OEOGF 12:00	18±0,6*	28,57	14±0,6*	-56,92	20±1,0*	33,33
OEOGI 8:00	21±1,0*	50,00	10±0,6*	-69,23	17±0,6	13,33
OEOGI 12:00	23±1,1*	64,29	9±1,0*	-72,31	18±1,1	20,00

OEOGF: Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas; OEOGI: Óleo essencial de inflorescências frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas; Dose inibitória mínima (1 mg/L ar). Os valores das médias dos halos de inibição são estatisticamente significantes quando comparado com os controles ($p < 0,05$ – ANOVA seguido por Student-Newman Keuls-test Múltipla Comparação). Os resultados são expressos como média ± DP (n=3).

Frente a *S. aureus*, os óleos de folhas e inflorescências apresentaram atividade moduladora sinérgica com os aminoglicosídeos, gentamicina e amicacina, sendo o maior efeito observado na atividade moduladora dos óleos de inflorescências coleta 8:00 horas com amicacina, aumento de 58,82% no diâmetro de halo de inibição (Tabela 7).

Na presença de tetraciclina foi observado novamente antagonismo por parte de todos os óleos testados, redução no diâmetro do halo de inibição, com destaque mais uma vez para os óleos obtidos das inflorescências coletados às 12: 00 horas , com redução de 73,91%.

Tabela 9 : Modificação da atividade antibiótica por componentes voláteis do óleo essencial de *O. gratissimum* por contato gasoso frente à *S. aureus* ATCC 12692

Tratamento	<i>S. aureus</i> ATCC 12692 (mm ±DP %)					
	Gentamicina		Tetraciclina		Amicacina	
	10µg	A (%)	30µg	A (%)	30 µg	A(%)
SEM TRATAMENTO	16±1,0	0,00	23±1,5	0,00	17±0,6	0,00
DMSO	16±0,6	0,00	23±0,6	0,00	17±1,5	0,00
OEOGF 8:00	18±0,6	12,50	15±0,6	-34,78	23±1,5*	35,29
OEOGF 12:00	18±1,0	12,50	15±1,0	-34,78	24±1,5*	41,17
OEOGI 8:00	20±1,0	25,00	15±0,6	-34,78	27±1,1*	58,82
OEOGI 12:00	19±0,6	18,75	6±1,0	-73,91	20±1,0*	17,65

OEOGF: Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas; OEOGI: Óleo essencial de inflorescências frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas; Dose inibitória mínima (1 mg/L ar). Os valores das médias dos halos de inibição são estatisticamente significantes quando comparado com os controles ($p < 0,05$ – ANOVA seguido por Student-Newman Keuls-test Múltipla Comparação). Os resultados são expressos como média ± DP (n=3).

Os resultados mais relevantes de interferência foram para o óleo essencial de inflorescências de *O. gratissimum* coletados as 12:00 horas, que apresenta na composição química o mais elevado teor de sesquiterpenos hidrocarbonos (46,62%), sendo os mais representativos β -selineno (19,97%), α -selineno (5,51%), Germacreno D (4,26%), α -humuleno (1,83%), β -cariofileno (12,44%), óleos essenciais ricos na mistura β -cariofileno/biciclogermacreno ou β -cariofileno/germacreno D, tem demonstrado potente atividade antimicrobiana (MAIA et al., 2010). O germacreno D já foi mencionado por apresentar atividade moduladora (SIMÕES et al., 2008).

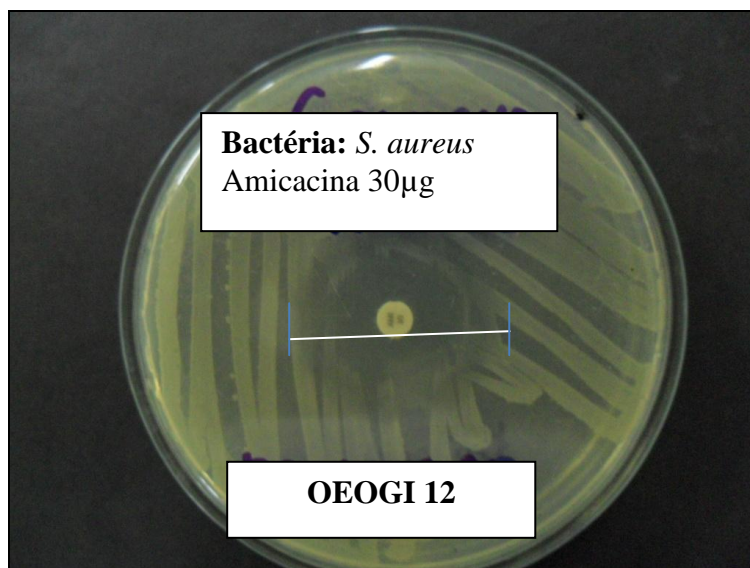


Figura 14: Placa de petri contendo óleos essenciais de inflorescências coletados 12:00 horas na presença de disco de Amicacina 30µg.

O aumento crescente da frequência de *S. aureus* resistentes a oxacilina (ORSA) e a possibilidade do aparecimento de amostras resistentes a vancomicina tornam importante o desenvolvimento de novas drogas com atividade antiestafilocócicas. Amostras de ORSA são, geralmente, resistentes a inúmeros antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, os macrolídeos, as lincosaminas, os aminoglicosídeos, o cloranfenicol e a tetraciclina (FARIAS, et al.,1997).

Sousa et al., (2011) testou a atividade de componentes volatéis de óleos essenciais de *Lantana montevidensis* Briq. (Verbenaceae) como moduladores da atividade de gentamicina e amicacina, observando que os óleos essenciais apresentaram efeito sinérgico, aumentando a atividade desses antibióticos frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* (chegando a aumentar em 102% a atividade de amicacina contra *Pseudomonas*) o que expressa a influência de óleos essenciais para atuar como adjuvantes no tratamento de infecções respiratórias.

5.5 Atividade antioxidante *in vitro*

Muitos processos bioquímicos geram substâncias que são denominadas radicais livres, como superóxidos e hidroxilas e outras substâncias com oxigênio como H₂O₂ e O₂. A alta produção de radicais livres nos organismos e a peroxidação de gorduras em membranas celulares têm implicado em várias doenças patofisiológicas, incluindo metagênese, diabetes, arteriosclerose coronária, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (FRANCO et al., 2008; BANERJEE et al., 2005).

A oxidação de lipídios em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, juntamente com o crescimento de microrganismos indesejáveis tem resultado no desenvolvimento de principalmente, rancidez e deterioração, conduzindo a produtos não aceitáveis para consumo humano. Muitos óleos essenciais e compostos isolados destes têm sido recentemente reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais, os quais poderiam ser utilizados como substitutos potenciais aos antioxidantes sintéticos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A natureza antioxidante de compostos fenólicos tem sido documentada em uma série de plantas. Autores tem descrito que atividade antioxidante seja atribuída à presença de compostos fenólicos pertencentes a classes dos taninos e flavonóides, que possuem atividade antioxidante, por atuarem como sequestradores de radicais de oxigênio (GIORGI et al., 2009; TAI AE et al., 2010; NAKASHIMA et al., 2009; QUETTIER-DELEU et al., 2000, SOARES 2002; SOUSA et al., 2007).

Hakkim et al., (2008) comparou a atividade antioxidante, pelo método do β-caroteno, de várias espécies do gênero *Ocimum* contra BHA (controle positivo) onde a seguinte ordem de poder antioxidante foi estabelecida: *O. gratissimum* > *O. americanum* > *O. minimum* > *O. citriodorum* > *O. kilimandscharicum* > *O. grandiflorum* > *O. lamiifolium* > *O. selloi*. Ao realizar a análise fitoquímica de extratos das espécies obteve à identificação de 11 compostos fenólicos compostos (ácido rosmarínico, ácido litospérmico, vanílico, ácido p-cumárico, ácido hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido feniláctico e ácido sináptico) o que atribuiu aos responsáveis pela atividade antioxidante dessas espécies.

Prakash e colaboradores (2010) analisaram óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum*, que quando caracterizado por GC-MS, revelou 30 componentes, representando 95,97% da composição do óleo. Na investigação foram considerados como majoritários;

cinamato de metila (48,2%), γ -terpinene (24,0%), 1,8 - cineol (4,0%). Comparando sua atividade antioxidante pelo método do DPPH com padrões conhecidos como BHT e BHA, e avaliando sua atividade antimicrobiana contra aflatoxinas, concluíram que o OE poderia ser recomendado como um aditivo na proteção de alimentos, evitando a biodegradação através de peroxidação.

Tabela 10: Atividade antioxidante de óleos essenciais extraídos de folhas e inflorescências de *O. gratissimum* coletados em diferentes períodos

[] $\mu\text{g/mL}$	OEOGF8	OEOGF12	OEOGI8	OEOGI12	BHT
5	56,76 \pm 1,56	48,41 \pm 3,08	10,89 \pm 4,83	33,25 \pm 0,02	13,67 \pm 2,19
10	80,83 \pm 1,68	61,26 \pm 4,48	23,18 \pm 5,22	34,98 \pm 2,10	60,93 \pm 1,62
25	79,88 \pm 2,41	82,58 \pm 0,64	44,49 \pm 5,01	53,34 \pm 2,42	65,54 \pm 1,12
50	86,49 \pm 2,27	89,75 \pm 0,80	57,25 \pm 1,00	69,26 \pm 4,64	88,10 \pm 1,24
125	91,71 \pm 1,54	92,76 \pm 0,46	78,58 \pm 1,77	84,15 \pm 0,58	91,61 \pm 1,81
250	93,95 \pm 0,85	95,25 \pm 0,48	88,89 \pm 2,09	89,19 \pm 2,98	94,00 \pm 1,00
CE₅₀	83,97 \pm 0,60	82,51 \pm 0,42	57,64 \pm 2,28	66,23 \pm 1,56	75,37 \pm 0,47

OEOGF: Óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas

OEOGI: Óleo essencial de inflorescências frescas de *O. gratissimum* coletado às 8:00 horas e 12:00 horas.

Os resultados são expressos como média \pm DP (n=3).

CE50: Concentração efetiva

Na análise dos resultados da atividade antioxidante (AA%) considerou-se como valor de referência a CE50 de 75,37 \pm 0,47 $\mu\text{g/mL}$ do BHT (controle positivo) para comparar como a atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas frescas e inflorescências de *O. gratissimum* devido o BHT ser bastante utilizado como parâmetro para atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Os resultados quantitativos da atividade antioxidante dos óleos estão apresentados na Tabela 8, na qual mostra que todos os óleos apresentaram atividade sequestradora do radical livre DPPH. Os óleos essenciais das folhas demonstraram uma menor atividade em

comparação ao BHT. Por sua vez os óleos extraídos das inflorescências apresentaram maior atividade antioxidante do que as folhas e do que o próprio controle positivo.

Estudos relatam que OE de *O. gratissimum* que apresentava alto teor de eugenol mostrou efeito significativo na atividade antioxidante pelo método do DPPH. A alta atividade do óleo de *O. gratissimum* foi atribuída ao seu elevado teor de eugenol. Esse fato foi corroborado pelos compostos puros testados, o eugenol isolado apresentou bons valores de CE 50. Óleos essenciais de *O. basilicum*, que são ricos em linalol, não têm a atividade anti-radical potente quando comparado ao *O. gratissimum*, o que seria explicado pela ausência de um anel fenólico em seu composto majoritário (DAMBOLENA et al., 2010).

Hussain et al., (2008) afirma que a atividade antioxidante de óleos essenciais de *O. basilicum* L. variam de acordo com a estação da coleta das folhas, seguindo a seguinte ordem decrescente de atividade: Inverno > BHT (controle positivo) > Primavera > Outono > Verão > Linalol. A variação nas condições sazonais modifica o perfil da composição fitoquímica, mudando o percentual dos componentes minoritários e também alterando a atividade antioxidante, evidenciando a importância de considerar toda a composição química presente.

Trevisan et al., (2006) , por sua vez, relata que apesar de haver uma correlação positiva da presença de compostos fenólicos como o eugenol, com a capacidade antioxidante de óleos essenciais, deve-se entender que a capacidade antioxidante dos óleos não estaria claramente relacionada a proporção e o perfil dos compostos secundários de plantas. O que justifica o fato de que apesar dos óleos essenciais das folhas possuírem um maior teor de eugenol do que os óleos essenciais extraídos das inflorescências, eles não apresentaram maior atividade antioxidante esperada.

Dessa forma, embora seja relevante a maior contribuição do componente majoritário, principalmente quando reconhecidamente esses ativos possuem atividade antioxidante, outros componentes do óleo em menor proporção seriam também os responsáveis pela atividade antioxidante.

6 CONCLUSÕES

A maioria dos constituintes presentes nos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *O. gratissimum* L. identificados por CG/MS, pertencem à classe dos terpenos. Os compostos que apresentaram maior percentual nos óleos analisados foram eugenol, cineol, β -selineno e β -cariofileno. Um total de 20 constituintes foi identificado nos óleos essenciais, os componentes majoritários variaram seu percentual de acordo com o horário coletado e as partes da planta coletadas. Para os óleos extraídos das folhas coletadas 8:00 horas e 12:00 horas respectivamente; eugenol (53,31% Vs 52,22%), 1,8-cineol (22,14% Vs 19,80). Para os óleos extraídos das inflorescências coletadas 8:00 horas e 12:00 horas respectivamente; β -selineno (10,98% Vs 19,97%), β -cariofileno (6,47% Vs 12,44%), eugenol (40,74% Vs 21,89%), 1,8-cineol (25,04% Vs 17,05%).

Os óleos apresentaram atividade frente às linhagens Gram-positivas e Gram-negativas padrão e multirresistente, sendo o óleo essencial obtido a partir das inflorescências coletadas às 8:00 horas o que apresentou o menor valor de CIM (128 $\mu\text{g/mL}$), sendo essa concentração sobre bactéria Gram-negativa *E. coli Ec 27* multiresistente um resultado significativo.

Uma interferência dos óleos essenciais na atividade antibiótica foi observada para todos os antibióticos analisados por microdiluição. Pelo método do contato gasoso foi observada uma interessante relação do ponto de vista clínico para todos os óleos com os aminoglicosídeos, traduzindo em efeitos sinérgicos, e para as tetraciclinas em efeito antagônico. Todos os óleos das folhas e inflorescências de *O. gratissimum* apresentaram atividade antioxidante. Quando comparados, os óleos das folhas apresentaram atividade antioxidante inferior aos óleos das inflorescências.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AKINYEMI, K.O.; OLADAPO, O.; OKWARA, C.E.; IBE, C.C.; FASURE, K.A. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 6, 2005.

AKINMOLADUN, A.C.; IBUKUN, E.O.; EMMANUEL, A.; OBUOTOR, E.M.; FAROMBI, E.O. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Science Resesearch Essay**, v. 2, n.5, p.163-166, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; CUNHA, L.V.F.C. **Métodos e técnicas na pesquisa Etnobotânica**. 2.ed. Recife: Comunigraf, 2008. 322p.

ALI, M. S.; SALEEM, M.; ALI, Z.; V. U. AHMAD. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 55, n.8, p. 933-936, 2000.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; JACOMETTI, C. F.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AVERINOVA, E. L.; ASHMARIN, I. P.; MOVCHAN, N.A; LAPINA, I.K. Combination of novoimanin with antibiotics with a differente mechanism of action. **Antibiotiki**, v. 20, n. 7, p. 636-639, 1975.

AZIBA, P.I.; BASS, D.; ELEGBE, Y. Pharmacological investigation of *Ocimum gratissimum* in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 427- 429, 1999.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBACK, D.; WAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 57, p. 727- 733, 2005.

BARREIRO, E. J. ; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova** (Online), v. 32, p. 679-688, 2009.

BASER, K. H. C. The Turkish *Origanum* species. In *Oregano. The Genera Origanum and Lippia*, Kintzios SE (ed.). **Taylor & Francis**: London. pp 109, 2002.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ALBUQUERQUE, S.; MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian *Rutaceae* species. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 121-124, 2001.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n 5, p. 1822-1828, 2006.

BREHM-STECHER B. F.; JOHNSON E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n 10, p. 3357–3360, 2003.

BULÁRIO ELETRÔNICO DA ANVISA: ON LINE. Disponível em: < <http://www.4anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp> >. acesso em : 12 de Janeiro de 2011.

BURT, S.; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a

review. **In Journal food Microbiology** v. 94, n. 3, p. 223 -253, 2004.

CAL, K.; KUPIEC, K; SZNITOWSKA, M. Effects of physicochemical properties of cyclic terpenes on their *ex vivo* skin absorption and elimination kinetics. **Journal Dermatological Science**, v. 41, n. 2, p. 137–142. 2006.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: status and classification. In Harley, R.M. & Reynolds, T. (eds) *Advances in Labiate Science*. **Royal Botanic Gardens**, Kew. p. 511-522, 1992.

CARVALHO C. C. : FONSECA M. M. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 413– 422, 2006.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 24-30, 2006b.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p.99, 1998.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, H.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2006.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 458-462, 1990.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, p. 231–234, 1992.

CHATTERJE, A.; SUKUL, N.C.; LASKEL, S.; GHOSHMAJUMADAR, S. Nematicides principal from two species of Lamiaceae. **The Journal of Nematology** , v. 14, n. 1, p. 118-20, 1982.

CIMANGA, K. A.; KAMBU, K.; TONA, B. L.; APERS, S. A.; DE BRUNEY, A . N.; HERMANS, A.; TOTTE, A.; PIETERS, L. A.; VTILETINCK, A. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 213–220, 2002.

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulators.**, v.34, p.119-134, 2001.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, v.49, p. 429– 434, 1984.

CONNOLLY, J. D., HILL, R.A. Triterpenes. **Natural Products**, v. 24, p. 465, 2007.

CORTEZ, D. G.; CORTEZ, L. E. R.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L.; **Arquivos Ciências Saúde Unipar**, p. 125-127, 1998.

COSTA, J. G.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUSA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2007.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p.

328-330, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. In vitro interference of Hyptis martiusii Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside - resistant *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 5, p. 566-568, 2009.

CHUNG, E.Y.; BYUN, Y.H.; SHIN, E. J.; CHUNG, H.S.; LEE, Y.H. AND SHIN SEUNGWON. Antibacterial Effects of Vulgarone B from *Artemisia iwayomogi* Alone and in Combination with Oxacillin. **Archives Pharmacy Research**, v. 32, n.12, p. 1711-1719, 2009.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22: p. 39-44, 2003.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LOPEZ, A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.11, n. 2 , p. 410–414, 2010.

DEUSCHLE, R. A. N.; CAMARGO, T.; ALVES, S. H.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 71-75, 2007.

DUBEY, N.K.; TIWARI, T.N.; MANDIN, D.; ANDRIAMBOAVONJY, H.; CHAUMONT J. P. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, v.7, n. 15, p. 567-569; 2000.

DUBEY, N.K; KISHORE, N; VARMA, J.; LEE, S.Y. Cytotoxicity of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum*. **Indian Journal Pharmacist Science** v. 59, n.1, p. 263-264; 1997.

EFFRAIM, K.D; JACKS, T.W.; SODIPO, O.A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **Africa Journal Biomedical Research**, v. 6, p. 21-25, 2003.

ESEN, G., A. D.; AZAZ, M.; KURKCUOGLU, K.; BASER, H; TINMAZ, C. Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. hirtum Ietswaart from the Marmara region, Turkey. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 22, p. 371-376, 2007.

FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I. L.; PIGNATARI, A.C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. **Revista Associação Medica Brasileira**, v.43, n.3, p. 199-204, 1997.

FRAGA, B.M. Sesquiterpenes. **Natural Products**. v. 22, p. 465. 2005.

FRANCESCATO, L. N.; DEUSCHLE, R. A. N.; MALLMANN, C. A.; ALVES, S. H.; HEINZMANN, B. M. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 240-245, 2007.

FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A.G.; PANAYIOTIFID,M.I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 6-11, 2008.

FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M. O. M. ; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, n. 1-2, p. 161-166, 2006.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1545–1560, 2002.

GAO, S.; SINGH, J. In vitro percutaneous absorption enhancement of lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal Control Release**, v. 51, p.193–199, 1998.

GIORGI, A. M.; BOMBELLI, R. ; LUINI, A.; SPERANZA, G.; COSENTINO, M., SERGIO LECCHINI, S.; COCUCCI, M. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Infusions from Leaves and Inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rchb. **Phytotherapy Research**. v. 23, p. 540–545, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Fatores que interferem no teor de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374 – 381, 2007.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; DESSOY, E. C.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medical**, v. 69, n. 8, p. 773-775, 2003.

GONZALEZ, L.S; SPENCER, J.P. Aminoglycosides: a practical review. **American Family Physician** v.58, p. 1811–1820, 1998.

GRAYSON, D.H. Monoterpenes. **Natural Products**, v.17, p. 385. 2000.

HADA T.; SHIRAISHI A.; FURUSE S.; INOUE Y.; HAMASHIMA H.; MATSUMOTO Y.; MASUDA K.; SHIMADA J. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Natural Medicine**, v.57, p. 64–67, 2003.

HAKKIM, F. L.; ARIVAZHAGAN, G.; BOOPATHY, R. Antioxidant property of selected *Ocimum* species and their secondary metabolite content. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n.9, p. 250-257, 2008.

HANSON, J.R. Diterpenes. **Natural Products Rep.** 22, 594. 2005.

HANSON, J.R. Sesterpenes. **Natural Products Rep.** 13, 529, 1996.

HEYWOOD, V.H.; BRUMMITT, R.K.; CULHAM, A.; SEBERG, O. Flowering Plant Families of the World. **Royal Botanic Gardens**, Kew; 2007.

HEMAISWARYA, SH.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against diseases. **Phytomedicine**, v.15, n. 8 , p 639-652, 2008.

HOLLEY, R. G.; PATEL, D.; Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292, 2005.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; HUSSAIN SHERAZI, S. T.; & PRZYBYLSK, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry** ,v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.

HUSSAIN, A. I. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae.. **Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry**, Pakistan, 2009.

IACOBELLIS, N. S.; LO CANTORE, P.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 325–331, 2004.

INTERAMINENSE, L.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MAGALHÃES, P.J.C.; DUARTE, G.P.; LAHLOU, S. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Planta Medica** v. 71, n. 4, p. 376-378; 2005.

IWALOKUN, B.A.; GHENLE, G.O.; ADEWOLE, T. A; AKINSINDE, K.A. Shigellocidal properties of three Nigerian medicinal plants: *Ocimum gratissimum*, *Terminalia avicennoides*, and *Momordica balsamina*. **Journal of Health Population and Nutrition**, v.19, n. 4, p 331-335, 2001.

IWALOKUN, B.A.; GBENLE, G.O.; ADEWOLE, T.O.; SMITH, S.I.; AKINSINDE, K.A.; OMONIGBEHIN, E.O. Effects of *Ocimum gratissimum* L. essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigeria. **Acta Pathologic Microbiology Immunology Scandinavia**, v. 111, n. 4, p.477-82, 2003.

JANA, S.; DEB, J.K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 70, n 2. p.140–150, 2006.

JANINE, A.L; XISTO, S.P.; ORIONALDA, F.L.F.; JOSÉ, R.P.; PEDRO, H.F; LÚCIA, K.H.S.; ALINE, A.L.; MARIA, R.R.S. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** , v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G. Analysis, chemotype and quality control of the essential oil of a new cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) plant from Bulgaria. **Scientia Pharmaceutica**, v. 69, n.1, p. 85-89; 2001.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SHAFI, M.P.; KANIAMPADY, M.M. Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **Europe Food Research Technology**, v. 217, n. 2, p.120–124, 2003.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M.B.; NGAMO, L.T.; ADJOUDJI, O. Combined investigation of the chemical composition of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Xylopiya aethiopica* from Cameroon and their insecticidal activities against stored maize pest *Sitophilus zeamais*. **Ernährung**, v. 29, n. 2, p. 55-60, 2005.

JULIANI, H. R.; BIURRUN, F.; KORoch, A. R.; OLIVA, M. M.; DEMO, M. S.; TRIPPI, V. S.; ZYGADLO, J. A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. **Planta Medica**, v. 68, n. 8, p.762-764, 2002.

JUTEAU, F.; MASOTTI, V.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 532-535, 2002.

KÉITA, S.K.; VINCENT, C.; JEAN-PIERRE, S.; BÉLANGER, A. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. **Flavour and Fragrance**, v. 15, n. 5, p 339-341, 2000.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21 st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n.2, p.135, 2001.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119– 128, 1989.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M.; KUBO, A. Antibacterial activity of long-chain alcohols: the role of hydrophobic alkyl groups. **Bioorganic Medical Chemistry Letters**, v. 3, n. 6 , p.1305–1308 1993.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L.D.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MORAIS, S.M.; DUARTE, G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in rats: Role of the autonomic nervous system. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, v.31, n. 4 p. 219-225 , 2004.

LAWRENCE, B. M. Progress in Essential oils: *Ocimum gratissimum* oil .**Perfum Flavor**, v. 22, n. 4, p.70-74, 1997.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations, **Epilepsy Res**, v. 2, n. 3, p. 145- 181, 1988.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.,; MORELLO, L.G. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal Pharmacy Science**, v. 41, n.1, p. 85-95; 2005.

LUZ, J. M. Q.; ETLERT, P. A. D.; INNECCO, R. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 4, p. 539-542, 2009.

MADEIRA, S.V.F.; MATOS, F.J.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; CRIDDLE, D.N. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n.1, p. 1–4, 2002.

MAIA, A. I. V.; TORRES, M. C.M.; PESSOA, O. D. L.; MENEZES, J. E. S. A.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V. L. R.; MELO, V. M. M.; SOUZA, E. B.; CAVALCANTE, M. G. B.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliiana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p.538–544.

MANOSROIA, J.; P. DHUMTANOMA, A.; MANOSROIA, D.; Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**,. v. 235, n. 1, p.114-120, 2006.

MARTINS, A. P.; L. R. SALGUEIRO; R. VILA, F.; TOMI, S.; CANIGUERAL, J.; CASANOVA, A. P.; DA CUNHA, ; ADZET, T.; Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*, **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 187–189, 1999.

MATASYOH, L.G.; MATASYOH, J. C.; WACHIRA, F.N.; KINYUA, M.G.; MUIGAI, A.W.T.; MUKIAMA, T.K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v. 6 , n. 6, p. 760-765, 2007.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 557–567, 2000.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.;COUTINHO,H.D.M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L.. **Biomedicine & Pharmacotherapy** (2010). doi:10.1016/j.biopha.2010.09.024.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MONDAL, S. S. C.; MAHAPATRA, B. R.; MIRDHA, S.; NAIK, N. Antimicrobial activity of essential oils obtained from fresh and dried leaves of *Ocimum sanctum* L. against enteric bacteria and yeast. **Acta Horticulturae**; v. 756: p. 267-270; 2007.

MONTANARI, C. A. & BOLZANI, V. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOHAMMED, A, TANKO Y, OKASHA MA, MAGAJI RA, YARO AH. Effects of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* on blood glucose levels of streptozotocin induced diabetic wistar rats. **Africa Journal Biotechnology**; v. 6, n.18, p. 2087-2090; 2007.

NADKARNI, K. M. **Indian Materia Medica**, 3rd ed. Popular Prakashan Pvt Ltd. India. 1999.

NAKASHIMA, T.; NEGRI, M. L.S.; POSSAMAI, J.C. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa -*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p.553-556, 2009.

NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. V.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A.; DIAS, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n.5, p. 675-678, 1999.

NARISHETTY, S. T.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effects of terpenes and their mechanism of action. **Journal Controll Release**, v. 95, n. 3, p. 367-379. 2004.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.

NGASSOUMA, M.B.; ESSIA-NGANGB, J.J; TATSADJIEUB, L.N.; JIROVETZC, L.; G. BUCHBAUERC, G.; ADJOU DJIA, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n.3, p. 284-287, 2003.

NJOKU, C.J; ZENG, L.; ASUZU, I.U.; OBERLIES, N.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Oleanolic acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (lamiaceae). **International Journal Pharmacognosy**, v. 35, n.2, p 134-137, 1997.

NWEZE EI, EZE EE. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L. in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 9, n. 37, 2009.

OBASEIKI-EBOR, E.E.; ODUKOYA, K.; TELIKEPALLI, H.; MITSCHER, L.A.;SHANKEL, DM. Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria (West Africa). **Mutation Research Letters**, v. 302, n. 2, p. 109-117, 1993.

OFFIAH, V.N.; CHIKWENDU, U. A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. **Journal Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 327-330; 1999.

ORAFIDIYA, L.O; OYEDELE, A.O; SHITTU, A.O; ELUJOBA A. A. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 177-183; 2001.

ORAFIDIYA, L.O; FAKOYA, F.A; AGBANI, E.O; IWALEWA, E.O. Vascular permeability- increasing effect of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn as a mechanism for its wound healing property. **African Journal Traditional Complementary and Alternative medicines**, v.2, n. 3, p. 253-258, 2005.

ORAFIDIYA, L.O; AGBANI, E.O; ADELUSOLA, K.A. A study on the effect of the essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. on cyclophosphamide induced inhibited hair growth in pulp rats. **International Journal Aromatherapy**, v.14, n. 3, p. 119-28, 2004.

OWULADE, M.O; EGHIANRUWA, K.I; DARAMOLA, F.O. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa calyces* and *Ocimum gratissimum* leaves on intestinal transit in rats. **African Journal Biomed Research**, v.1, n.7, p.31-33, 2004.

OZÜRK, M.; DURU, M. E.; AYDOGMUS-OZTÜRK, F.; HARMANDAR, M.; MAHLIÇLI, M.; KOLAK, U.; ULUBEEN, A. GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. **Natural Products Communication**, v. 4, n. 1, p. 109-114, 2009.

OLADUNMOYE, M.K. Immunostimulatory Activity of ethanolic leaf extract from *Ocimum gratissimum* in albino rat orogastrically dosed with *Escherichia coli* (NCIB 86). **Journal Pharmacology Toxicology**, v. 1, n.4, p.389-94, 2006.

PANDEY, A.K; CHOWDHURY AR. Composition of the essential oil of *Ocimum gratissimum* grown in Madhya. Pradesh. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22-23, p. 26-28, 2000.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v.47, n.3, p. 403-435, 1992.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciências Tecnológicas Alimentos**, v.27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PESSOA, L.M; MORAIS, S.M; BEVILAQUA, C.M.L; LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2002.

PINTO, A. C.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, A. C.; JUNIOR, V. V.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

POLITEO, O., JUKIC, M. MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p.379-385, 2007.

PRABHU, K. S.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR A. A.; SHIRWAIKAR, A. *Ocimum gratissimum*: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K.; KHARWAR, R.N. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against. **Food Research International**, v. 44, n.1, p. 385-390, 2011.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J. ; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C.; BAILLEUL, F. ; TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **Journal of Ethnopharmacology** , v.72, n. 1, p. 35-42, 2000.

RABELO, M.; SOUZA, E.P.; SOARES, P. M. G.; MIRANDA, A.V.; MATOS, F.J.A.; CRIDDLE, D.N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v.36, n. 4, p. 521-524, 2003.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 30, n 2, p. 137-143, 2009.

RICHARDS, D. M.; HEEL R C.; BROGDEN, R.N.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Ceftriaxone. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 27, n. 6, p. 469–527, 1984.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulatory**, v. 34, p.3-21. 2001.

SATYAVATI, G.V; GUPTA, A.K; NEERAJ, T. Medicinal plants of India. **ICMR** , v. 2, New Delhi, India, 1987.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, p.8022–8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201– 222, 1995.

SILVA, M.G.V.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS F.J.A.; MACHADO, M.I.L. ; ALENCAR J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, n. 1, p. 32–34, 1999.

SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; LOPES, P.R.O.; SILVA, F. O.; HOLANDA, M. T. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. **ARKIVOC**, v. 6, p. 66-71, 2004.

SILVA, L.L.; HELDWEIN, C.G.; REETZ, L.G.B.; HORNER, R.; MALLMAN, C.A.; HEINZMANN, B. Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p.700-705, 2010.

SIMÕES, M.; ROCHA, S.; COIMBRA, M. A.; VIEIRA, M. J. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility using sesquiterpenoids. **Medical Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 616-23, 2008.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição Campinas**, v. 15, n. 1, 2002.

SOUSA, C. M. M.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, M.S.B.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. G.; COUTINHO, H.DM.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S.G; COSTA, J. G. M. Chemical Composition and Aminoglycosides Synergistic Effect of *Lantana montevidensis* Briq. (Verbenaceae) Essential Oil. **Records of Natural Products**, v. 5, n. 1, p. 60-64; 2011.

SAJJADI, S. E. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. **Daru**, v. 14, n. 3, p.128-130, 2006.

SAHOUE, G.B.; TONZIBO, Z.F.; BOTI, B.; CHOPARD, C.; MAHY, J.P.; N'GUESSAN Y. T. Anti-inflammatory and analgesic activities: Chemical constituents of essential oils of *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon giganteus* inhibited lipooxygenase L-1 and cyclooxygenase of PGHS. **Bulletin Chemistry Society Ethiopia**, v. 17, n. 2, p. 191-197, 2003.

SZABO, M. R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A.X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**. v. 61, n 3, p 214-216, 2007.

TAIAE, H.A.; SALAMA, Z.A.R.; RADWAN, S. Potential Activity of Basil Plants as a Source of Antioxidants and Anticancer Agents as Affected by Organic and Bio-organic Fertilization. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38 n.1, p. 119-127, 2010.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.-J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 593– 600, 1995.

THARANATHAN, R.N; SHAMANNA, D. Composition of *Ocimum- Gratissimum* Shrubby Basil Seed Mucilage. **Indian Journal Chemistry**, v. 13, p. 307-308. 1975.

TELCI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). **Biochemical Systematic Ecology**, v. 34, n. 6, p. 489-497, 2006.

TEREZINHA, J.F; RAFAEL, S.F; LIDIANE, Y.; JOSÉ, R.P.S.; NOEMIA, K.I.; ANELI, M.B. Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 49, n. 6, p.867-871, 2006.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 3, p. 399– 403, 1989.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5^a ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2008, 760 p.

TREVISAN, M. T. S.; SILVA, M.G.V.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization Of The Volatile Pattern And Antioxidant Capacity Of Essential Oils From Different Species Of The Genus *Ocimum*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 378-382, 2006.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v.49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

VERPOORTE , R.; MEMELINK , J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.181-187, 2002.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical systematics and ecology**, v 29, n 3, p 287-304, 2001.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova** , v 29, n 2, p 326-337, 2006.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R.R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. In: ZHANG, L., DEMAIN, A.L. (Eds) **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. Humana Press, Totowa, p. 197-227, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Food safety and food borne illness. In: World health Organization Fact sheet. Geneva: World Health Organization, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: janeiro 2010.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p 3–19; 2003.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; TEKWANI, B.; KHAN, S. I. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvest. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p.380-385, 2008.