



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
RECURSOS NATURAIS

JULIO CESAR SILVA

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DO
EFEITO TOXICOLÓGICO, FRENTE À *Drosophila melanogaster*, DO EUGENOL E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum Gratissimum* L.

CRATO-CE

2021

JÚLIO CÉSAR SILVA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DO
EFEITO TOXICOLÓGICO, FRENTE À *Drosophila melanogaster*, DO EUGENOL E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum Gratissimum* L.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. George Joaquim Garcia Santos

Coorientadora: Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues

CRATO - CE

2021

Julio Cesar Silva, autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Silva, Julio Cesar.

S586a Avaliação comparativa da atividade antibacteriana e do efeito toxicológico, frente à *Drosophila melanogaster*, do Eugenol e óleo essencial de *Ocimum Gratissimum* L./ Julio Cesar Silva. – Crato - CE, 2021

70p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. George Joaquim Garcia

Santos Coorientadora: Dra. Fabiola Fernandes

Galvão Rodrigues

1. Antibióticos, 2. *Drosophila melanogaster*, 3. Eugenol, 4. *Ocimum gratissimum* L.; 5. Óleo essencial; I. Título.

CDD: 547.7

JULIO CESAR SILVA

Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada à Universidade Regional do Cariri–URCA, para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

APROVADO EM: 29/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. George Joaquim Garcia Santos- Orientador

Universidade Regional do Cariri – URCA

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Marivando Barros- Avaliador Interno

Universidade Regional do Cariri - URCA

Assinatura: _____

Prof. Dr. João Hermínio, da Silva- Avaliador externo

Universidade Federal do Cariri - UFCA

Assinatura: _____

À minha família e ao, tão amado, Príncipe Dyllan.

AGRADECIMENTOS

A máxima mais linda do evangelho segundo Jesus nos diz: “Não temas, estou contigo”. Por isso, não seria possível externar minhas palavras de agradecimento sem antes pensar no alicerce de todas as criações. Somente em ti, Senhor, encontrei a calma nos momentos de angústia. No seu colo recostei minha alma e a ansiedade virou ternura. Jamais, em toda esta caminhada me senti sozinho, pois estavas comigo. Nos momentos que desabei, seguraste-me! A ti toda a honra e glória. Em ti não temerei mal algum! “Ainda que a figueira não floresça, que não haja fruto na vide, todavia me alegrarei”. Me alegrarei em ti, Jesus, pois não há convicção mais perfeita do que o seu amor por nós.

A minha família (Régia, Dedé, Augusto, Maria, Valéria, Dyllan), o princípio de tudo, meu maior e melhor bem. Sempre foi, será por vocês e sobre nós. Obrigado pelo mérito dessa caminhada ao lado do conforto e segurança que me oferecerem, com vocês não existem dias ruins.

A minha melhor amiga e porto seguro (mãezinha, De Lalô, Dona Régia), tenho dito: “Tu és presente do indicativo, és futuro mais que perfeito. É palavra monossilábica definida em toda sua infinidade, por um único ideal: o amor. E se há convicção do quão necessitados somos por esse valor, indubitavelmente, sou dependente de teu amor e de tua existência. Não existirão impossíveis que me impeçam do compromisso de te fazer ainda mais feliz.

Aos meus amigos, que não posso me dar ao mérito de esquecer-los. A vocês toda a minha gratidão (Carlinha, Dany, Fênix Menezes, Gabie, Hellen, Josy, Marina, Paulinha e Xys- Em ordem alfabética, para evitar os ciúmes).

Aos meus cúmplices, Thais e Raimundo, nada disso seria possível sem vocês ao meu lado.

A Hafins Hafins (Ghabriel), que me deu a oportunidade de conhecer o sentimento amoroso mais puro, por me fazer bem, por estar comigo na alegria e na tristeza, saúde e doença. Obrigado por ter me escolhido.

A minha musa inspiradora Flaviana Braga, que com serenidade e humildade sempre trouxe luz a minha caminhada.

Às células motrizes de todos os resultados obtidos nesta produção: Janaina, Nair e Thiago. Vocês são os melhores que podemos ter.

Ao LMBM, LABSEMA, LPPN.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Não menos importante aos meus orientadores: George Joaquim e em especial minha eterna professora Fabiola, você é luz.

“The Big Girl Don’t Cry.”

Fergie

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos como mecanismo viável à manutenção da saúde. Compostos bioativos, com notáveis propriedades farmacológicas, têm apresentado significativo papel nos modelos clínicos de estudo das doenças, contribuindo com suas ações antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias. Muitas evidências, atestadas por experimentações clínicas, mostram que o uso de antibióticos em conjunto com metabólitos isolados é capaz de reverter a resistência bacteriana em ensaios *in vitro*. Este estudo fornece inicialmente uma revisão de literatura (*Ocimum gratissimum* L. na perspectiva da atividade antibacteriana: uma revisão), realizada através de um levantamento bibliográfico nas bases Periódicos Capes e Scopus, utilizando os seguintes descritores: metabólitos secundários; plantas medicinais; bioprospecção ou bioprospecção molecular; *Ocimum gratissimum* L.; *Ocimum gratissimum* L. e atividade antibacteriana. Ademais, são disponibilizadas informações acerca do perfil químico e atividade antibacteriana e intrínseca combinada (microdiluição) da espécie *Ocimum gratissimum* L, tal como sua atividade toxicológica por meio do modelo *Drosophila melanogaster*. Após as buscas nas bases de dados foram contabilizados o número de 156 trabalhos. Ao final de todas as etapas de seleção, por meio dos critérios de exclusão estabelecidos, foram selecionados 72 artigos (incluindo os artigos usados nos aspectos gerais e da atividade antibacteriana), os quais tiveram sua análise feita para extração de dados e interpretação de seus resultados. O eugenol e o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. apresentaram atividade antibacteriana direta e associada aos antibióticos testados, o que os coloca como agentes promissores contra a resistência bacteriana. O óleo essencial apresentou menor toxicidade para moscas-das-frutas quando comparado ao eugenol isolado, embora os resultados tenham sido numericamente semelhantes.

Palavras-chave: Antibióticos; *Drosophila melanogaster*; Eugenol; *Ocimum gratissimum* L.; Óleo essencial.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used for thousands of years as a viable mechanism for maintaining health. Bioactive compounds, with remarkable pharmacological properties, have played a significant role in clinical models for the study of diseases, contributing with their antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and antiparasitic actions. A lot of evidence, attested by clinical trials, shows that the use of antibiotics together with isolated metabolites is capable of reversing bacterial resistance in in vitro assays. This study initially provides a literature review (*Ocimum gratissimum* L. from the perspective of antibacterial activity: a review), carried out through a literature review in the Capes and Scopus Periodicals databases, using the following descriptors: secondary metabolites; medicinal plants; bioprospecting or molecular bioprospecting; *Ocimum gratissimum* L.; *Ocimum gratissimum* L. and antibacterial activity. Furthermore, information is made available about the chemical profile and combined antibacterial and intrinsic activity (microdilution) of the species *Ocimum gratissimum* L, as well as its toxicological activity through the *Drosophila melanogaster* model. After searching the databases, the number of 156 works was counted. At the end of all selection steps, through the established exclusion criteria, 72 articles were selected (including articles used in general aspects and antibacterial activity), which were analyzed for data extraction and interpretation of their results. Eugenol and the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. showed direct antibacterial activity and associated with the tested antibiotics, which places them as promising agents against bacterial resistance. The essential oil showed lower toxicity to fruit flies when compared to eugenol alone, although the results were numerically similar.

Keywords: Antibiotics; *Drosophila melanogaster*; Eugenol; *Ocimum gratissimum* L.; Essential oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1.** Chromatogram CG-MS of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. 1 = 1,8-cineole-eucalytol; 2 = Cis-ocimene; 3 = 1-alpha-terpineol; 4 = Eugenol; 5 = Beta-element; 6 = Trans-caryophyllene; 7 = Alpha-humulene; 8 = Germacrene-D; 9 = Beta-selinene; 10 = Alpha-selinene34
- Fig. 2.** Evaluation of antibiotics (Amikacin, Ampicillin, Norfloxacin and Penicillin) modification by EUG and EOOg against bacterial strains (*Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Staphylococcus aureus* 10).38
- Fig. 3.** Effect of Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (a) and Eugenol (b) on the mortality test of *Drosophila melanogaster* at different concentrations and time.....39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADROS

Quadro 1: Atividade antibacteriana de <i>Ocimum gratissimum</i> L., de acordo com a literatura de 2000 a 2020.	55
--	----

TABELAS

Table 1: Relative composition of <i>Ocimum gratissimum</i> L. essential oil	34
Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of Eugenol and Essential Oil of <i>Ocimum gratissimum</i> L. against bacterial strains.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de variância

BHI- Brain Heart Infusion (caldo infusão cérebro-coração)

CIM- Concentração Inibitória Mínima

GC-MS - Gas Chromatography-Mass Spectrometry

CLSI- Clinicas & Laboratory Standards Institute

CPMZ- Clorpromazina

DMSO- Dimetilsufóxido

EEOg- Extrato Etanólico de *Ocimum gratissimum* L.

EUG- Eugenol

HIA- Heart infusion Agar (Ágar infusão de coração)

MIC - Minimum Inhibitory Concentration

OEOg- Óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L.

UFC- Unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

< - menor que

> - maior que

≥ - maior ou igual que

mL - mililitro

°C - graus Celsius

UFC/mL - unidade formadora de colônias por mililitros

µg – microgramas

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro de solvent

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS E QUADROS	xi
TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA	19
2.2 ESTUDOS COM O MODELO <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.3 BIODIVERSIDADE: A IMPORTÂNCIA DO USO SUSTENTÁVEL	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL VEGETAL	23
3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E OBTENÇÃO DO EUGENOL	23
3.3 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	23
3.4 PREPARAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum gratissimum</i> L. E DO EUGENOL	24
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	24
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINADA AOS ANTIBIÓTICOS	25
3.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE	25
3.7.1 Criação e estoque de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
3.7.2 Ensaio de mortalidade	25
3.7.3 Ensaio de geotaxia negativa	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1 MANUSCRITO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO	27
ABSTRACT	27
1 Introduction	28
2 Materials and methods	29
2.1 Botanical material	29
2.2 Essential Oil Extraction And Obtaining The Eugenol	30
2.3 Chemical analysis of the essential oil of <i>Ocimum gratissimum</i> L.	30
2.4 Preparation of the essential oil of <i>Ocimum gratissimum</i> L. and Eugenol.....	30
2.5 Determination of the minimum inhibitory concentration (CIM)	31
2.6 Evaluation of modulating antibiotic activity	31

2.7 Toxicity assay	32
2.7.1 Breeding and stocking of <i>Drosophila melanogaster</i>	32
2.7.2 Mortality assay	32
2.7.3 Negative geotaxis assay	33
2.8 Statistical analysis.....	33
3 Results	33
4 Discussion	40
5 Conclusion	43
References	44
4.2 CAPÍTULO DE LIVRO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO	47
INTRODUÇÃO	49
REVISÃO DE LITERATURA	50
PROCEDIMENTO METODOLÓGICO.....	50
Estratégia de pesquisa de literatura	50
Critérios de exclusão e inclusão	51
PLANTAS	
MEDICINAIS.....	51
Aspectos gerais	51
Bioprospeção de produtos vegetais	52
Metabólitos secundários de plantas medicinais	53
<i>Ocimum gratissimum</i> L.....	54
Generalidades	54
Atividade antibacteriana de <i>Ocimum gratissimum</i> L.	55
CONCLUSÃO	60
CONFLITOS DE INTERESSE	61
REFERÊNCIAS	61
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	lxx
ANEXO A	lxx
ANEXO B:	lxxii

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos como mecanismo viável à manutenção da saúde (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019). O consumo de chás no mundo todo, quer seja pelos seus compostos ou para o tratamento das enfermidades humanas, é um grande demonstrativo da relação histórica do homem no manejo dos recursos vegetais (NUNES; MACIEL, 2017). Apesar da consciência empírica dos povos, somente nos últimos anos tornou-se possível distinguir que as plantas medicinais produzem uma infinidade de compostos químicos, de atividades biológicas variadas e altamente atrativas para uma parcela da população mundial incapaz de arcar com os preços assustadores dos medicamentos (LANINI *et al.*, 2009).

Embora seja impossível deduzir quando a humanidade começou a usar espécies vegetais para tratamento das doenças, as plantas medicinais são os tipos de medicamentos antigos já registrado historicamente (HALBERSTEIN, 2005). Uma justificativa deste manejo está na praticidade e rendimento do seu uso, já que as plantas medicinais podem ser usadas em sua totalidade, *in natura*, seca ou moída, cada uma delas contendo produtos químicos específicos (ZHANG *et al.*, 2015). Além desse fator, uma maioria expressiva dos indivíduos encontra nos produtos de origem natural, em especial nas plantas, sua principal fonte exclusiva de elementos medicamentosos, devido à abundância da biodiversidade, como também da herança cultural por trás dessa prática (MESSIAS *et al.* 2015).

Ainda que o Brasil possua uma expressiva e relevante flora, apenas uma porção limitada deste valoroso recurso é aproveitada para pesquisas visando a produção de medicamentos, mesmo sendo indubitáveis as possibilidades que as plantas medicinais têm de oferecer novas oportunidades para criação de tratamentos eficazes e mais econômicos (SOUSA *et al.*, 2017). Pressupõe-se que ao menos metade da flora brasileira possua princípios ativos com propriedades preventivas e curativas e mesmo assim uma ínfima porcentagem de 1% foi estudada de maneira satisfatória (CARNEIRO *et al.*, 2014).

No entanto, o uso de plantas reconhecidamente medicinais é uma prática difundida no Brasil e de grande valia mundialmente, já que são largamente usadas para alívio de náuseas, gases, má digestão e outras muitas propriedades distinguidas nas literaturas (FREITAS *et al.*, 2018). Aliás, os produtos naturais, na forma de extratos, óleos essenciais e metabólitos isolados, têm conseguido reverter um danoso problema mundial: a resistência bacteriana (LIMAVERDE *et al.* 2017).

A resistência aos antibióticos se dá de maneira espontânea e pela habilidade inata dos micro-organismos de se adaptarem, mas atualmente, o uso indiscriminado de antibióticos contribui com a persistência da pressão seletiva e de bactérias oportunistas, favorecendo a ocorrência de novos mecanismos de resistência. Em consonância com essa lógica, este problema tornou-se um impasse do setor de saúde, em conjunturas nacionais e mundiais, em países subdesenvolvidos e também desenvolvidos (SANTOS, 2004).

Por vez, compostos bioativos, com notáveis propriedades farmacológicas, têm apresentado significativo papel nos modelos clínicos de estudo das doenças, contribuindo com suas ações antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias (CHANG *et al.*, 2010). É válido ressaltar também que muitas evidências, atestadas por experimentações clínicas, mostram que o uso de antibióticos em conjunto com metabólitos isolados consegue reverter a resistência bacteriana em ensaios *in vitro* (PADUCH *et al.*, 2007).

Ocimum gratissimum L., conhecida popularmente como alfavaca, se destaca nesse aspecto, pela gama de propriedades medicinais que oferece à medicina tradicional e por ser alvo de constantes estudos de isolamento de seus compostos e das atividades biológicas destes (PEREIRA; MAIA, 2007). Como exemplo destes constituintes têm-se o Eugenol (4-alil-2-metoxifenol), um composto natural e seguro, com espectro amplo de atuação contra bactérias, fungos e leveduras (ZHANG; DING, 2020). Todavia, a habitualidade do uso de plantas medicinais pode ser insegura, sendo indispensável a realização de estudos que estabeleçam um perfil tóxico bem definido para os produtos vegetais corriqueiramente utilizadas (DUARTE *et al.*, 2018).

Este estudo fornece inicialmente uma revisão de literatura (*Ocimum gratissimum* L. na perspectiva da atividade antibacteriana: uma revisão), realizada através de um levantamento bibliográfico nas bases Periódicos Capes e Scopus, utilizando os seguintes descritores: metabólitos secundários; plantas medicinais; bioprospecção ou bioprospecção molecular; *Ocimum gratissimum* L.; *Ocimum gratissimum* L. e atividade antibacteriana. Ademais, são disponibilizadas informações acerca do perfil químico e atividade antibacteriana e intrínseca combinada da espécie *Ocimum gratissimum* L.

Tendo em vista que as literaturas acadêmicas evidenciam a presença do Eugenol nos produtos obtidos da alfavaca, os experimentos realizados nesta pesquisa colaboram com a inovação científica, enquanto apresentam a comparação dos efeitos *in vitro* do Eugenol x Óleo essencial para cada uma das atividades de interesse nesta produção. Desta maneira, torna-se possível evidenciar qual dos produtos, no seu campo comparativo, é mais eficiente.

Além disso, ensaios de toxicidade contra *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) do óleo essencial e do Eugenol também foram realizados, com a finalidade de descrever a capacidade da alfavaca de exercer toxicidade às qualidades motoras a até mesmo a mortalidade das mosca-da-fruta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A introdução de antibióticos na prática clínica foi umas das intervenções que, além de salvar milhões de vidas, propiciou uma revolução no ramo medicinal e no tratamento das doenças infecciosas (ALÓS, 2015). Apesar disso, ainda no século XXI, as infecções contribuem com uma relativa taxa de mortalidade da população, embora essas porcentagens tenham diminuído, quando comparadas com os séculos anteriores (LOZANO *et al.*, 2012). Parte dessa mortalidade acentuada está estreitamente associada à resistência bacteriana, definida como a capacidade de sobrevivência de algumas bactérias, mesmo quando submetidas a concentrações de antibióticos, que em outras, seriam letais (ALÓS, 2015).

Muitos fatores estão envolvidos por trás da problemática vinculada a resistência, o primeiro deles está na escassez de recursos que a indústria farmacológica dispõe para pesquisa e produção de antibióticos, resultando em poucos ou nenhum novo mecanismo de ação descoberto nos últimos anos (COOPER; SHLAES, 2011). A falta de interesse na produção de fármacos mais enérgicos, paliativos para tratativa da resistência, se deve, antes de mais nada, a baixa rentabilidade econômica dos antibióticos, haja vista o retorno financeiro que outros medicamentos para doenças crônicas, como diabetes ou hepatite C, podem oferecer (MAY, 2014; HOOFNAGLE; SHERKER, 2014).

Contudo, estudos realizados com bactérias, em períodos que precedem a descoberta dos antibióticos, comprovam que o processo de resistência em patógenos bacterianos humanos é algo que existe antes da descoberta destes fármacos, com uma prevalência muito abaixo da visualizada hoje (ALÓS, 2015). Atualmente, estima-se que pelo menos 1.753 milhões de pessoas em todo mundo foram colonizadas por cepas resistentes, ou seja, a prevalência da resistência aumentou significativamente em espécies bacterianas patogênicas (WOERTHER *et al.*, 2013).

Segundo Alós (2015), a apresentação de diferentes mecanismos de resistência para uma mesma família de antimicrobiano, tem sido ainda mais frequente, levando a um tratamento difícil de ser realizado e dificultando a identificação do possível perfil fenotípico bacteriano. Prosseguindo com a visão deste mesmo autor, patógenos importantes para o homem têm evoluído para resistência, nos 70 anos seguintes a descoberta dos antibióticos, em consequência da utilização maciça e descuidada destes. Todavia, o fenômeno da resistência pode ser também uma implicação da predisposição de bactérias ao desenvolvimento de genes

(NESME *et al.*, 2014). Prova disso, é o registro de bactérias isoladas, há pelo menos 4 milhões de anos, apresentando resistência a 14 dos antibióticos atualmente comercializados (BHULLAR *et al.*, 2012).

Outrossim, a troca horizontal de genes e as mutações que conferem resistência, além de bastante comuns nos microrganismos, são estratégias evolutivas que ocorrem também há milhões de anos (OLIVER, 2000). No que lhe concerne, as bactérias apresentam eficazes mecanismos de compartilhamento genético, como conjugação, transformação e transdução, capazes de induzir melhor tolerância e adaptabilidade a ação dos antibióticos (ALÓS, 2015). Em outras palavras, a resistência bacteriana se deve principalmente a plasticidade genética das bactérias, sendo esta diretamente influenciada pela replicação rápida desse grupo de microrganismos (COURVALIN, 2008).

Conforme Roberts e colaboradores (2009), os impactos negativos da resistência repercutem diretamente em custos de saúde. Em continuidade ao pensamento destes autores, somente nos Estados Unidos, no ano de 2008, foram estimados gastos de 10,7 a 15 milhões de dólares para 188 adultos hospitalizados, que apresentaram infecções multirresistentes a bactérias. Por se tratar de um problema mundial, o monitoramento da resistência precisa ser globalizado (ALÓS, 2015). Uma possibilidade para contorno dessa problemática é o uso de alternativas complementares ou que intensifiquem a ação dos antibióticos, sendo os produtos naturais promissores para neutralizar a incidência das infecções, da promiscuidade e persistência da plasticidade genética das bactérias e da disseminação da resistência (ALÓS, 2015; BAQUERO; COQUE, DE LA CRUZ, 2011).

2.2 ESTUDOS COM O MODELO *Drosophila melanogaster*

O desenvolvimento da genética no Brasil e seu impulso na década de 30 respaldou a inserção de novos modelos de análises moleculares em âmbito nacional (SIÃO, 2007). A partir de então, modelos, como *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta), tornaram-se elementos-chave, tanto para genética como para variados testes de outras áreas, permitindo o estudo das patologias humanas e servindo como alternativa a utilização de mamíferos em pesquisas científicas (MORALES, 2008).

Hoje, os modelos não-mamíferos são largamente usados, principalmente para testagem dos estágios iniciais da descoberta de fármacos (AVANESIAN; SEMNANI, JAFARI, 2009). No campo da toxicologia, os estudos envolvendo *Drosophila melanogaster* ocorreram na última década, destinando-se a entender o conjunto de reações genético-moleculares causadas

pelas substâncias ou drogas e o modo que estas influenciam os perfis orgânicos a uma maior ou menor sensibilidade, em diferentes concentrações (RAND *et al.*, 2014). No que concerne aos testes de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, por exemplo, os ensaios com as moscas-da-fruta têm obtido maior desempenho e eficácia, quando comparados com os modelos que fazem usam o peixe zebra ou vermes (SEGALAT, 2007).

Ademais, existem uma série de vantagens de se usar a mosca-da-fruta em estudos de laboratórios, entre elas estão: curto ciclo de vida, simplicidade da arquitetura genética, facilidade e alto custo-benefício de manutenção em laboratório em relação a outros modelos, suas informações genéticas quase totalmente elucidadas em mais de um século de estudos, que permitiu um amplo acervo de dados associados a expressão e atividade gênica, e por fim seu holometabolismo, com duas etapas móveis de vida— larval e adulta (RAND *et al.*, 2014).

Ainda, o conhecimento de genes-mestre presentes em *Drosophila melanogaster*, a organização segmentar de seu corpo, com elementos característicos em cada segmento e a surpreendente descoberta de genes homólogos homeóticos, comuns a quase todos os grupos de animais, e mantidos ao longo da evolução, são fatores que incentivam o amplo uso desse modelo cientificamente (HARTFELDER, 2006). Como resultado desse conjunto de aspectos, a mosca do fruto tem se consagrado uma poderosa ferramenta dos programas de pesquisa nos ramos moleculares, da biologia, genética e comportamento, já que as vias fisiológicas e farmacológicas são perfeitamente conservadas neste modelo, propiciando sua utilização nas triagens orientadas de detecção das doenças e toxicidade (RUBIN *et al.*, 2000; JAFARI *et al.*, 2006).

2.3 BIODIVERSIDADE: A IMPORTÂNCIA DO USO SUSTENTÁVEL

Os compostos químicos e bioativos exercem uma função determinante para garantia da diversidade terrestre, influenciando a comunicação celular, defesa e regulação de processos que devem justificar a conservação e o manejo sustentável (BOLZANI, 2016). A nível global são apontadas 8,7 milhões de espécies (MORA *et al.*, 2011) e o Brasil ocupa um dos principais pódios de riqueza, na América Latina e mundo, distribuída na variedade de seus biomas (JOLY *et al.*, 2011).

Embora relevante e significativa, a biodiversidade passou a sofrer riscos irreversíveis e catastróficos, em razão da exploração e por estar associada apenas como uma provedora de bens e serviços atrelados a valores (ROMEIRO, 2006). Com a ascensão do sistema capitalista, o homem passou a enxergar os recursos naturais como possibilidades explorativas e de

importância econômica, vinculada ao lucro, causando o desequilíbrio ambiental, perceptível no clima, solo, alteração do relevo e ainda mais na vegetação (ALCÂNTARA, 2011).

A destruição dos recursos vegetais é um exemplo de ameaça antrópica à diversidade, que perturba e ocasiona o estresse ambiental e de várias espécies, causando impactos negativos para manutenção dos processos vitais no meio ambiente (RIVERS *et al.*, 2014).

Os fatores relatados geram uma preocupação vinculada a perda da diversidade do planeta, por não ser possível delimitar seu limite máximo e o nível de reversibilidade desses impactos negativos (STEFFEN *et al.*, 2015). Sendo a vegetação, as plantas medicinais e os demais recursos imprescindíveis como fonte de matéria-prima para indústria, por exemplo, a diminuição de sua riqueza é uma ameaça para uma variedade de estudos vinculados as seguintes áreas: biológica, química, bioquímica, farmacológica, toxicológica e outras (JOLY *et al.*, 2011).

Torresi *et al.* (2010) definem sustentabilidade como o conjunto de práticas baseadas na garantia das necessidades humanas, sem comprometimento dos recursos para as novas gerações. Por base nessa lógica, algumas mudanças posturais devem ser encaradas seguindo o viés estabelecido pela sustentabilidade e educação ambiental, guiando a minimização gradativa da exploração dos recursos naturais e de sua destruição, por meio do uso racional do meio ambiente (SANTOS; SILVA, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Duzentos e dez gramas (210g) de folhas de *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas em julho de 2020 no Viveiro Municipal de Crato, localizado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- ICMBio (7°14'27.7"S 39°25'01.4"W). As folhas foram coletadas às 12:00 PM, horário de pico do eugenol, conforme estipulado por Borges e colaboradores (2012). Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário Dardano Andrade de Lima, na Universidade Regional do Cariri, Crato/CE, e tombada com código 14.389.

3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E OBTENÇÃO DO EUGENOL

A extração do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho do tipo *Clevenger*. As folhas foram trituradas, colocadas em um balão de vidro de 5,0 L e postas em contato com 2,5 L de água destilada para posterior ebulição, durante 2h. A separação do óleo foi realizada por meio da adição de sulfato de sódio de anidro (Na₂SO₄). O óleo essencial foi mantido sob refrigeração, a -4°C, até a realização das testagens. O eugenol foi cedido pelo Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos – LABSEMA, da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato/CE, e obtido de Sigma Aldrich, Brasil.

3.3 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L.

Análises no CG/EM foram realizadas no cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU), seguindo as seguintes condições de análise: Injetor 250°C; temperatura inicial do forno de 50°C, apresentando uma primeira rampa de aquecimento de 5 °C/min a 180 °C, permanecendo por 4 minutos; uma segunda rampa de 10 °C/min a 260°C, permanecendo por 10 minutos; razão Split de 1:100; temperatura da interface: 250 °C e fonte de 250 °C; faixa de massa de 50 a 400 Daltons; ionização por impactos de elétrons, 70 eV. Para cromatografia dos componentes foi empregada uma coluna DB5-MS (Agilent), 30 m × 0,25 mm com espessura do filme interno de 0,25 µm e fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e hélio como gás arraste. A identificação foi realizada por comparação dos

espectros de massas com os das bibliotecas Nist08 e comparação com o registros de base da literatura.

3.4 PREPARAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. E DO EUGENOL

Em um tubo de ensaio foi adicionado 10 mg do óleo essencial e 500 µL de DMSO. Essa solução foi transferida para outro tubo e diluída em 9265 mL de água destilada estéril, resultando em uma solução com concentração final de 1.024 µg / mL. Esta foi usada em todos os testes. O mesmo processo foi repetido para o eugenol.

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

As cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 10 e *Streptococcus mutans* ATCC 0446 foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura HIA e incubadas a 37 ° C por 24 h. Em seguida, uma amostra de cada cultura foi arrastada e diluída em tubos de ensaio contendo solução salina estéril, em triplicata. Após esse procedimento, a turbidez foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Uma alíquota de 100 µL de cada inóculo bacteriano (referente a 10% da solução total) foi transferida para um tubo contendo 900 µL de uma solução de Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) 10%. Para o preparo do BHI, foi pesado 10% do material, em relação ao volume total utilizado. Cada poço de uma placa de microdiluição de 96 poços foi preenchido com 100 µL da solução formada e, em seguida, o óleo essencial foi diluído em concentrações que variavam de 512 µg / mL a 8 µg / mL. Um poço sem óleo essencial adicionado foi usado como controle positivo do crescimento bacteriano. O mesmo processo realizado para o óleo essencial foi repetido com o eugenol. Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ° C por 24 h. O crescimento bacteriano foi analisado adicionando 20 µL de resazurina a cada poço, previamente preparado na concentração de 0,4 mg / ml. Após a adição da resazurina, as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente e após este período foi observada a variação colorimétrica, visto que não houve crescimento bacteriano nos poços que permaneceram com a cor azul, e que houve crescimento bacteriano nos poços que mudaram da coloração azul para rosa (JAVADPOUR *et al.*, 1998; GALUCCI *et al.*, 2009.). Todo o teste foi realizado em triplicata.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINADA AOS ANTIBIÓTICOS

Para avaliação da atividade combinada aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As substâncias (clorpromazina, eugenol e óleo essencial) foram testadas em suas concentrações subinibitórias (MIC/8). Cada substância foi diluída em tubos contendo 900 µL de BHI 10%, onde foram adicionados separadamente 100 µL do inóculo bacteriano das linhagens *Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Staphylococcus aureus* 10. 100 µL da concentração obtida foram colocados em cada poço da placa de microdiluição. Diluições seriadas foram feitas, até o penúltimo poço, por meio do acréscimo dos antibióticos Amicacina, Ampicilina, Norfloxacin e Penicilina e do inibidor enzimático Sulbactam (associado a ampicilina), todos estes com concentração inicial de 1024 µL/mL. O último poço de cada placa foi utilizado como controle de crescimento. As placas foram incubadas em estufa a 37 ° C por 24 horas e as concentrações inibitórias mínimas, de cada substância testada, foram determinadas por método colorimétrico, através da adição de resazurina (GALUCCI *et al.*, 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE

3.7.1 Criação e estoque de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (estirpe de Harwich) foi obtida do National Species Stock Center, Bowling Green, OH. As moscas foram criadas de acordo com a metodologia de Cunha e colaboradores (2015) em recipientes de vidro de 340 mL e cultivadas em meio contendo: 83 % de massa de milho, 4 % de açúcar, 4 % de leite liofilizado, 4 % de farelo de soja, 4 % de farelo de trigo e 1 % de sal. Por ocasião do cozimento da mistura foi acrescentado 1 g de Nipagin (Metilparabeno). Após resfriamento nos recipientes de crescimento foi adicionado 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*. As moscas foram mantidas a temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade relativa do ar de 60 % em estufa BOD com ciclo claro-escuro 12:12 h. Todos os testes foram realizados com a mesma estirpe.

3.7.2 Ensaio de mortalidade

Os ensaios de mortalidade foram realizados em conformidade com a metodologia de Cunha e colaboradores (2015). Moscas adultas, machos e fêmeas, foram colocadas em recipientes de 130 mL (6 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro). Os potes foram divididos em grupos controle e teste. Um mililitro (1mL) de solução a 20%, contendo sacarose e água destilada, foi colocado no fundo de todos os potes do tubo controle. Os grupos testes foram constituídos de potes que continham eugenol e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. Nesse caso, as condições de testagem para ambas as substâncias foram semelhantes, adotando-se a metodologia de fumigação, onde os compostos são acrescentados em um papel filtro na tampa do tubo e assim são volatilizados e absorvidos. Foram usadas as concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do eugenol e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L., com tempo de contagem de 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 e 48h. A temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foi mantida durante todo o ensaio, assim como a umidade relativa do ar de 60% em estufa BOD, de ciclo claro-escuro, 12:12h. Os testes foram realizados em sextuplicata, com cada pote contendo um total de 20 moscas.

3.7.3 Ensaio de geotaxia negativa

A determinação do dano à capacidade locomotora foi realizada através do ensaio de geotaxia negativa descrita por COULOM e BIRMAN (2004). As moscas vivas, após exposição ao eugenol e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. em horários pré-determinados, foram conduzidas ao fundo dos potes. Após um minuto, as moscas que atingiram 4cm de altura nos recipientes foram contadas e este procedimento foi repetido após o intervalo de 1 minuto.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação foram divididos em subseções [1] Revisão de literatura, publicada como capítulo de livro e já apresentada na seção 2 e [2] Manuscrito **Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent Eugenol**, apresentado a seguir e submetido no dia 01 de junho de 2021, em Food Chemistry Journal, Qualis A1 (Novo Qualis) e fator de impacto: 6,306. Área: Biodiversidade.

4.1 MANUSCRITO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO

Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent Eugenol

Julio Cesar Silva ^a; Raimundo Luiz Silva Pereira ^a; Thiago Sampaio de Freitas ^a; Janaína Esmeraldo Rocha ^a; Nair Silva Macedo ^a; Carla de Fatima Alves Nonato ^a; Marina Leite Linhares ^b; Daniely Sampaio Arruda Tavares ^c; Francisco Assis Bezerra da Cunha ^a; Henrique Douglas Melo Coutinho ^{a,*}; Sidney Gonçalo de Lima ^d; Francisco Nascimento Pereira-Junior ^e; Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues ^a; George Joaquim Garcia Santos ^a.

^aDepartment of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, R. Cel. Antonio Luis 1161, 63105000 Crato, CE, Brazil

^bUniversity Center Doutor Leão Sampaio, Av. Leão Sampaio 400, 63040000 Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^cResearch and Development Center for Medicines, Federal University of Ceara, R. Coronel Nunes de Melo 1000, 60430275 Fortaleza, CE, Brazil

^dChemistry department, Federal University of Piaui, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, 64049550 Teresina, PI, Brazil

^eCenter for Agricultural and Biodiversity Sciences - CCAB, Federal University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil;

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the direct antibacterial activity, antibiotic modulation and toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major compound Eugenol. The phytochemical analysis of the essential oil from leaves was investigated by Gas

Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG-MS) and Eugenol was the major compound (63.25%). The Minimum Inhibitory Concentration and clinical antibiotics modulatory activities were performed using the 96-well plate microdilution methodology. *Drosophila melanogaster* was used as a model to assess the toxicity of the two substances. In conclusion, the eugenol and essential oil of *Ocimum gratissimum* L. showed direct antibacterial activity and associates with the tested antibiotics, which place them as promising agents against bacterial resistance. The essential oil showed less toxicity to fruit flies when compared to eugenol alone, although the results were numerically similar.

Keywords: Antibacterial agents; *Drosophila melanogaster*; *Ocimum gratissimum* L.; Essential oils; Eugenol.

1 Introduction

As ancient as the history of civilizations, medicinal plants have always been seen for their properties in offering relevant medicinal resources to ancient people ([BADKE *et al.*, 2011](#)). This perception collaborated with the dissemination of the therapeutic use of plant resources, which was established as a traditional secular practice and common to a diversity of cultures ([BARRETO *et al.*, 2010](#)).

With the development of research, it is now known that the usefulness offered by medicinal plants in the treatment of diseases is associated with the fact that they are considerable sources of secondary metabolites, which protect plants, in addition to being the target of clinical and therapeutic interests ([RIMAWI *et al.*, 2020](#)).

The discovery of new drugs for the treatment of bacterial infections has ensured the improvement of human health and the prolongation of its life ([HE *et al.*, 2020](#)). The need to discover new treatments for diseases occurs in theory due to the involvement of resistance, low responsiveness to drugs, such as those that treat problems such as cancer, and to the many adverse effects offered by the drugs currently commercialized ([ZUHAIRI *et al.*, 2020](#)).

In particular, bacterial resistance stands out in this context. The incidence of cases of antibiotic resistant bacterial have been observed whit increasing frequency over the past several decades, due to the prescription and incorrect use of antibiotics ([OBEIDAT *et al.*, 2012](#)). The worsening of this scenario has an impact on the inefficiency of the drugs used, leading to the discovery of new drugs, through the screening of possible phytochemicals and the manipulation of the apparatus made available by plant products ([ACHMIT *et al.*, 2021](#)). As a result, research

that evaluates the antibacterial activity of essential oils has increased considerably (KUHN *et al.*, 2019).

In general, essential oils are volatile compounds of different combinations, obtained from flowers, leaves and barks, which may involve the presence of monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoids and others (BIZZO *et al.*, 2009). Investigations have been carried out to determine the chemical profile of these oils and how they can be used in different areas, such as industry, pharmacy and food (KUCUKBAY *et al.*, 2014). Essential oils are abundant in different plant species, constituting most of the chemical substances of medicinal plants (SWAMY *et al.*, 2020).

In this context, the Lamiaceae family has gained evidence, for its usefulness to the human being in offering medicinal properties and cosmetic. It is estimated that this family has a total of 200 genera and more than 6900 species distributed around the world (MOHAMMADHOSSEINI, 2017). Among these is *Ocimum gratissimum* L., herbaceous, perennial and with a woody base, originally from the African continent and sub-spontaneous in Brazil, mainly in the Northeast region (SHARMA *et al.*, 2011).

Borges *et al.* (2012) distinguished Eugenol as the most expressive chemical constituent of *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca). This phenolic, aromatic and lipophilic phyto-compound has shown substantial biological activities, including antibacterial (ZHANG *et al.*, 2018).

Although encouraged, the widespread use of medicinal plants, such as their chemical components, can generate toxic responses (CUNHA *et al.*, 2015). In view of this problem, the *Drosophila melanogaster* (fruit fly) model has been consecrated in evaluating the pharmacological and toxicological effects offered by metabolites or inputs derived from medicinal plants (ZEMOLIN *et al.*, 2014).

In this way, this study characterized the chemical profile of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L., presenting the possibility of its antibacterial effect and of its activity associated with antibiotics. Similar analysis was performed for Eugenol alone, comparing its effect with the results presented for essential oil. Finally, essential oil and Eugenol were analyzed through their effects on the induction of mortality or interference in the negative geotaxis mechanism of fruit flies.

2 Materials and methods

2.1 Botanical material

Two hundred and ten grams (210 g) of *Ocimum gratissimum* L. leaves were collected in July 2020 at the Crato Municipal Nursery, located at the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation – ICMBio, according to coordinates 7°14'27.7"S 39°25'01.4"W. The leaves were collected at 12:00 PM, Eugenol peak time, as stipulated by Borges and collaborators (2012). An excicata of the specimen was deposited at the Herbarium Dardano de Andrade de Lima – HCDAL of the Regional University of Cariri - URCA, Crato/CE, under number 14.389.

2.2 Essential Oil Extraction And Obtaining The Eugenol

The extraction of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. was carried out by the hydrodistillation method, using the Clevenger-type apparatus. The leaves were crushed, placed in a 5.0 L glass flask and placed in contact with 2.5 L of distilled water for subsequent boiling for 2 hours. The oil was separated by adding sodium sulfate (Na₂SO₄) anhydrous and preserved in refrigeration (-4°C) until its use. Eugenol (Sigma-Aldrich) was kindly provided by Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha from the Semi-Arid Bioprospecting and Alternative Methods Laboratory - LABSEMA, Regional University of Cariri (URCA), Crato/CE.

2.3 Chemical analysis of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L.

Analyzes in CG/EM were performed on the chromatograph (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injector from SHIMADZU), following the following analysis conditions: Injector 250 °C; initial oven temperature of 50 °C, with a first heating ramp of 5 °C/min to 180 °C, remaining for 4 minutes; a second ramp of 10 °C/min to 260 °C, remaining for 10 minutes; Split ratio of 1:100; interface temperature: 250 °C and 250 °C source; mass range from 50 to 400 Daltons; ionization by electron impacts, 70 eV. For component chromatography, a DB5-MS (Agilent) column, 30 m × 0.25 mm with an inner film thickness of 0.25 µm and a stationary phase of diphenyl dimethylpolysiloxane and helium as carrier gas was used. The identification was carried out by comparing the mass spectra with those of the Nist08 libraries and comparison with the base records of the literature.

2.4 Preparation of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and Eugenol

In a test tube 10 mg of essential oil and 500 μL of DMSO were added. This solution was transferred to another tube and diluted in 9265 mL of sterile distilled water, resulting in a solution with a final concentration of 1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that was used in all tests. The same process was repeated for Eugenol.

2.5 Determination of the minimum inhibitory concentration (CIM)

The bacterial strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 10 and *Streptococcus mutans* ATCC 0446 were seeded in Petri dishes containing HIA culture medium and incubated at 37 °C for 24 h.

Then, a sample of each culture was dragged and diluted in test tubes containing sterile saline, in triplicate. After this procedure, the turbidity was adjusted according to the McFarland 0.5 scale. A 100 μL aliquot of each bacterial inoculum (referring to 10% of the total solution) was transferred to a tube containing 900 μL of a 10% Brain and Heart Infusion Broth (BHI) solution.

Each well of a 96-well microdilution plate was filled with 100 μL of the solution formed, and then the essential oil was microdiluted in a 1:1 ratio, the concentrations ranged from 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A well with no essential oil added was used as a positive control of bacterial growth. The same process performed for the essential oil was repeated with Eugenol. The reading of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by colorimetric method after 24 hours of incubation at 37 °C in a bacteriological oven. Bacterial growth was analyzed by adding 20 μL of resazurin (0.4 mg / ml) to each well. After the addition of resazurin, the plates were incubated for 1 h at room temperature and after this period the colorimetric variation was observed, since there was no bacterial growth in the wells that remained blue, and there was bacterial growth in the wells that changed from blue to pink coloring (GALUCCI *et al.*, 2009.). The tests were performed in triplicate.

2.6 Evaluation of modulating antibiotic activity

To evaluate the activity associated with antibiotics, the method described by Coutinho and collaborators *et al.* (2010). The substances (Chlorpromazine, Eugenol and essential oil)

were tested in their sub-inhibitory concentrations (MIC/8). Each substance was diluted in tubes containing 900 μL of BHI 10%, where 100 μL of the bacterial inoculum of the strains *Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Staphylococcus aureus* 10 were added separately. 100 μL of the obtained concentration were placed in each well of the microdilution plate. Microdilutions were performed with antibiotics Amikacin, Ampicillin, Norfloxacin and Penicillin and the enzymatic inhibitor Sulbactam (associated with Ampicillin), all of them with an initial concentration of 1,024 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The last well of each plate was used as a growth control. The plates were incubated in an oven at 37 °C for 24 hours and the Minimum Inhibitory Concentrations of each tested substance were determined by colorimetric method, through the addition of resazurin (GALUCCI *et al.*, 2009). The tests were performed in triplicate.

2.7 Toxicity assay

2.7.1 Breeding and stocking of *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH. The flies were grown according to methodology described by Cunha *et al.* (2015) in 340 mL glass containers and grown in medium containing: 83% corn mass, 4% sugar, 4% lyophilized milk, 4% soybean, 4% wheat or oat bran and 1% salt). When cooking the mixture, 1 g of Nipagin (Methylparaben) was added. After the mixture cooled in the growth flasks, 1 mL of a solution containing *Saccharomyces cerevisiae* was added.

The flies were grown in BOD type incubator at a temperature of 25 °C \pm 1 °C, with light-dark cycles 12:12 h and a relative humidity of 60%.

2.7.2 Mortality assay

Mortality tests were performed in accordance with the methodology of Cunha *et al.* (2015). Adult flies, male and female, were placed in 130 mL containers (6 cm high and 6.5 cm in diameter). The pots were divided into control and test groups. One milliliter (1mL) of 20% sucrose solution in distilled water was placed at the bottom of all control pots. The test groups consisted of pots that contained eugenol or essential oil of *Ocimum gratissimum* L. The fumigation methodology was adopted, where the compounds are added on a filter paper in the tube cap and thus are volatilized and absorbed. The concentrations of 1, 5 and 10 $\mu\text{L} / \text{mL}$ of Eugenol and essential oil of *O. gratissimum* were used, with a counting time of 1, 2, 3, 6, 9, 12,

24 and 48h. The temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ was maintained throughout the test, as well as the relative humidity of 60% in a BOD type incubator with a light-dark cycles 12: 12h. The tests were performed in sextuplicate, with each pot containing a total of 20 flies.

2.7.3 Negative geotaxis assay

Damage to the locomotor system was determined by the negative geotaxis test, as described by *Cunha et al.* (2015). Live flies, after exposure to Eugenol or essential oil of *O. gratissimum* at predetermined times, were taken to the bottom of the pots. After one minute, the flies that reached 4 cm in height in the containers were counted and this procedure was repeated after the 1-minute interval.

2.8 Statistical analysis

The antibacterial assays were performed in triplicates and the results were expressed as the geometric mean. Statistical hypothesis analysis was performed for the antibacterial assays using a Two-Way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, using the GraphPad Prism 7.0 software. To analyze the toxicity data, a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was performed. No statistical differences using the same concentration as a function of time were observed.

3 Results

The yield of the essential oil of *Ocimum gratissimum* (EOOg) was 0.39%. Phytochemical characterization, performed by mass chromatography, identified the presence of 10 compounds, as can be seen in Figure 1.

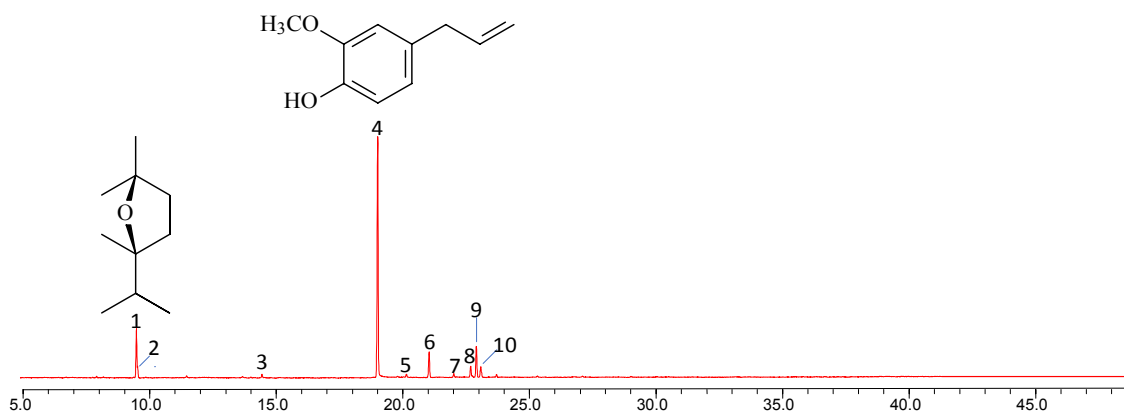


Fig. 1. Chromatogram CG-MS of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. 1 = 1,8-cineole-eucalytol; 2 = Cis-ocimene; 3 = 1-alpha-terpineol; 4 = Eugenol; 5 = Beta-element; 6 = Trans-caryophyllene; 7 = Alpha-humulene; 8 = Germacrene-D; 9 = Beta-selinene; 10 = Alpha-selinene.

When analyzing the constituents individually, it is observed that Eugenol (63.25%), Cineole (10.83%), Beta-silinene (8.43%) and Trans-caryophyllene (6.85%) are the major components (Table 1).

Table 1: Relative composition of *Ocimum gratissimum* L. essential oil.

N°	RT	Similarity (%)	Constituent	Kovats Index	Molecular Formula	Absolute Area	Relative Area
1	9.525	95	1,8-cineole-eucalytol	991	C ₁₀ H ₁₈ O	648767	10,83%
2	9.574	93	Cis-ocimene	1050	C ₁₀ H ₁₆	112333	1,88%
3	14.428	93	1-alpha-terpineol	1189	C ₁₀ H ₁₈ O	50805	0,85%
4	18.955	97	Eugenol	1356	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	3787946	63,25%
5	20.077	91	Beta-elemene	1375	C ₁₅ H ₂₄	50833	0,85%
6	20.959	96	Trans-caryophyllene	1419	C ₁₅ H ₂₄	410342	6,85%
7	21.921	94	Alpha-humulene	1438	C ₁₅ H ₂₄	60036	1,00%
8	22.585	96	Germacrene-D	1480	C ₁₅ H ₂₄	182146	3,04%
9	22.810	95	Beta-selinene	1485	C ₁₅ H ₂₄	504974	8,43%

10	22.985	94	Alpha-selinene	1494	C ₁₅ H ₂₄	180493	3,01%
----	--------	----	----------------	------	---------------------------------	--------	-------

Source: Elaborated by the author (2021).

The analysis of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed using the microdilution method. The values obtained for the MICs of each substance were considered clinically significant when lower than 1000 µg/mL (HOUGHTON *et al.*, 2007). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) obtained in the tests with Eugenol (EUG) demonstrated its action against the strains: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus mutans* ATCC 0446 (Table 2a).

Following the analysis of antibacterial activity, the EOOg showed results similar to those obtained by the EUG, with clinically significant responses evidenced against the same strains tested (Table 2b).

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of Eugenol and Essential Oil of *Ocimum gratissimum* L. against bacterial strains.

	STRAINS	MIC
(a) EUGENOL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,024.00 µg/mL
	<i>Escherichia coli</i> 06	1,024.00 µg/mL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	512.00 µg/mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	406.37 µg/mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	322.54 µg/mL
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	203.19 µg/mL
	<i>Staphylococcus aureus</i> 10	1,024.00 µg/mL
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 0446	322.54 µg/mL
(b) ESSE	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,024.00 µg/mL
	<i>Escherichia coli</i> 06	1,024.00 µg/mL

Source: Elaborated by the author (2021).

<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	645.08 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	812.75 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	512.00 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	80.63 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	1,024.00 µg/mL
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 0446	812.75 µg/mL

An evaluation of the associated activity of EUG and EOOg with antibiotics was also carried out. In addition, the effect of the combination of chlorpromazine (CPMZ), associated with the antibiotics of interest, and Sulbactam (SULB) in combination with Ampicillin was also tested. The results obtained in this analysis were distributed in sections, organized according to pairs of antibiotics, which act on the external and internal portion of the bacterial cell.

Figures 2a and 2b represent the results of the combination of the compounds mentioned above, against the *Escherichia coli* 06 strain. A possible synergistic effect was evidenced in the association between CPMZ + Norfloxacin, and EUG + Norfloxacin. The same could be seen with Amikacin, when associated with EUG and EOOg. On the other hand, CPMZ when associated with Amikacin, caused an increase in MIC, resulting in a possible antagonistic phenomenon (Figure 2a).

It should be noted that the combination of Sulbactam and Ampicillin caused a reduction in MIC, from 1,024 µg/mL to 128 µg/mL, possibly potentiating the activity of ampicillin against the strain tested (Figure 2b).

Figures 2c and 2d show a combined activity of the antibiotics Norfloxacin, Amikacin, Penicillin and Ampicillin, for the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 24. Chlorpromazine continued to intensify the action of Norfloxacin, as well as with *Escherichia coli* 06. This possible synergistic effect was also evidenced in the association CPMZ + Amikacin and EUG + Amikacin. Nevertheless, the EUG + Norfloxacin combination was possibly antagonistic, with a corresponding increase in the inhibitory concentration of the antibiotic against the strain tested. This information can be seen in Figure 2c.

Sulbactam continued to intensify the action of Ampicillin, by reducing the MIC from 512 µg/mL to 4 µg/mL, but unlike what was seen in *Escherichia coli* 06, there was a possible antagonistic process in the association of this antibiotic with the EUG, given the increase in MIC from 512 µg/mL to 812.7 µg/mL (Figure 2d).

Figure 2e shows a possible antagonism in the combination of Norfloxacin + CPMZ and Norfloxacin + EUG against *Staphylococcus aureus* 10. This antagonism was repeated for Amikacin + CPMZ and Amikacin + EUG. However, there was an intensification of Amikacin activity, when combined with essential oil, similarly to what happened in the *Escherichia coli* 06 strain.

Interestingly, EUG and EOOg caused a possible synergistic effect (reduction of MIC from 1,024 $\mu\text{g/mL}$ to 161.3 $\mu\text{g/mL}$ and 128 $\mu\text{g/mL}$, respectively) when combined with Penicillin against *Staphylococcus aureus* 10 (Figure 2f) which it did not happen with the strains *Escherichia coli* 06 and *Pseudomonas aeruginosa* 24. In view of the Gram-positivity of *Staphylococcus aureus*, it is assumed that this effect for Penicillin is not prominent in Gram-negatives. The combination of Sulbactam + Ampicillin and EOOg + Ampicillin also potentiated the control effect, the latter contrary to what was seen in the other strains.

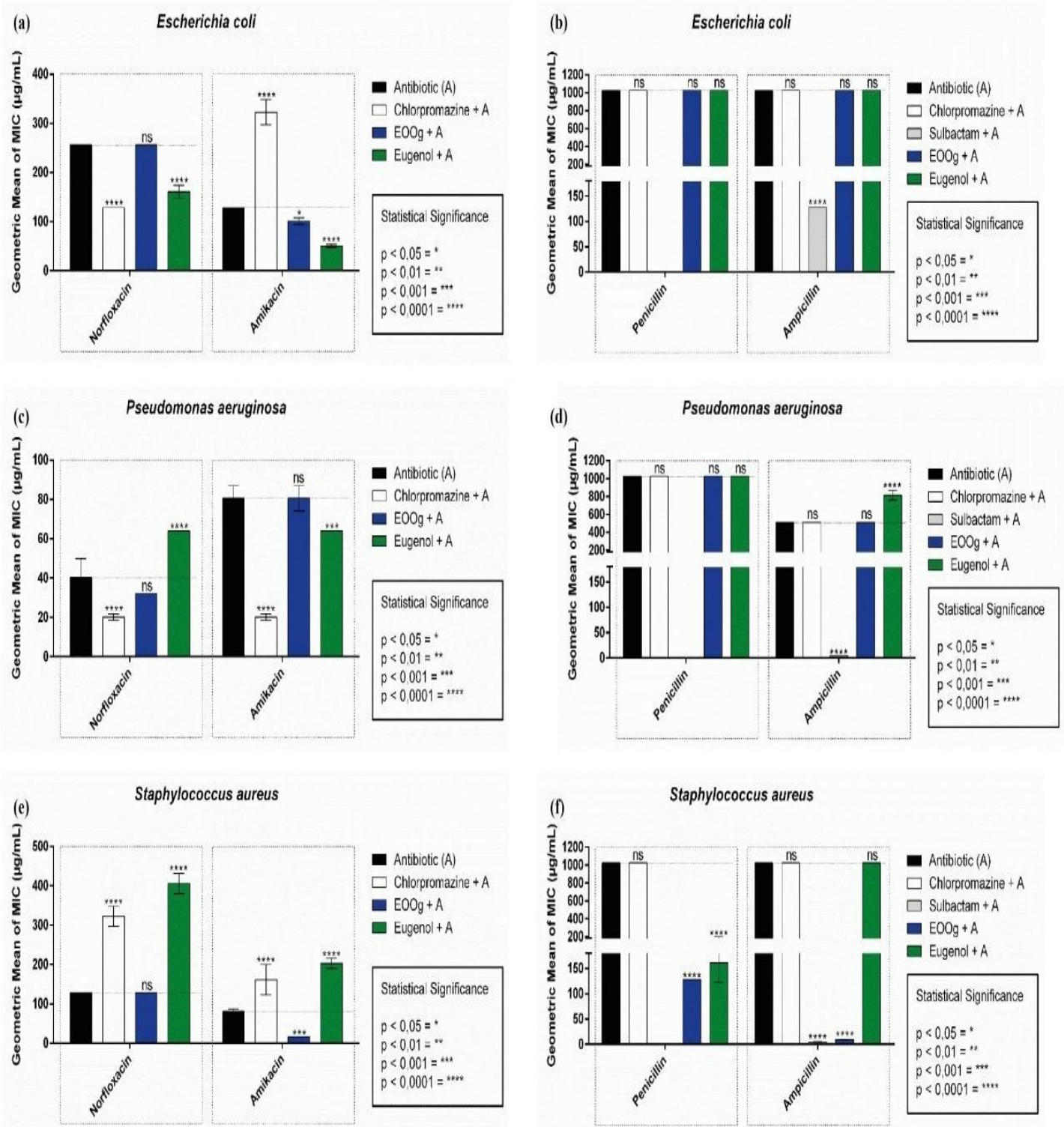


Fig. 2. Evaluation of antibiotics (Amikacin, Ampicillin, Norfloxacin and Penicillin) modification by EUG and EOOg against bacterial strains (*Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Staphylococcus aureus* 10).

The *Drosophila melanogaster* model was chosen to assess the toxicity of EUG and EOOg. For both, concentrations of 1, 5 and 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ were used. EOOg presented EC_{50} equal to $2,677\mu\text{L}/\text{mL}$ after 6h of exposure. The concentration of 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ did not differ significantly when compared to the control. The concentration of 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ was more toxic after 48 hours of

contact. After 6 hours of exposure to a concentration of 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of EOOg, it started to increase significantly, demonstrating how toxic this concentration was. (Figure 3a).

Already, a variation in the mortality pattern was verified according to the EUG concentration used, which presented EC50 equivalent to 2,681 $\mu\text{L}/\text{mL}$, after 6h of exposure. Concentrations of 1 and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ showed a significant degree of mortality after 48 and 24 hours of exposure, respectively. The 10 μL concentration, on the other hand, differed from the control after 6 hours, thus being more toxic compared to the others (Figure 3b). Thus, EOOg was less offensive when compared to EUG.

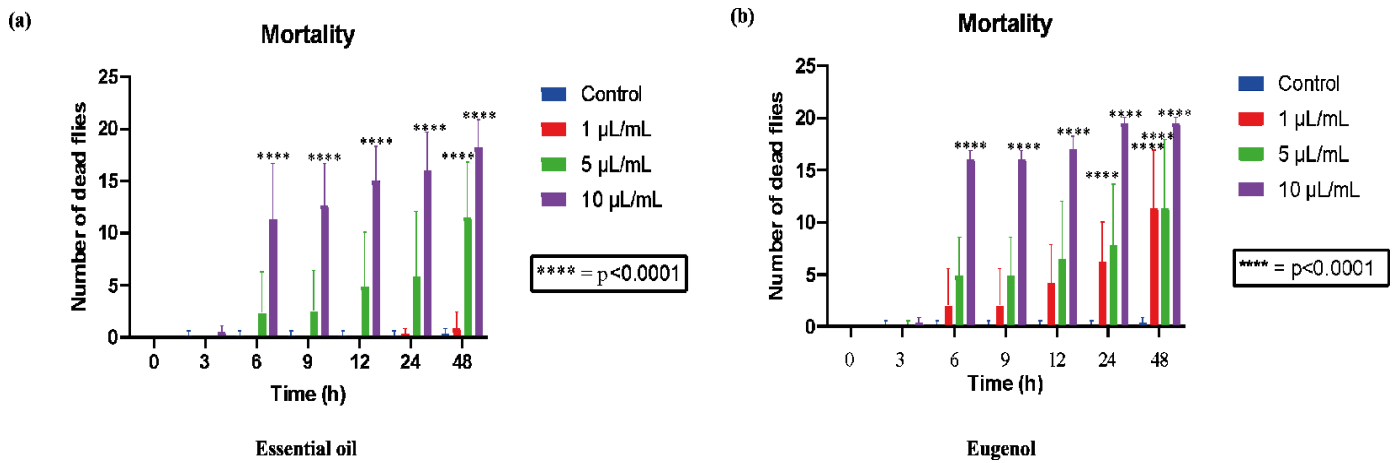


Fig. 3. Effect of Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (a) and Eugenol (b) on the mortality test of *Drosophila melanogaster* at different concentrations and time.

The concentration of 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of EOOg was not significant in the impairment of *Drosophila melanogaster* geotaxy. Fact that differs from that visualized for the concentration of 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, which caused an interference in the flight ability from 12 h of the beginning of the tests. The concentration of 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of EOOg caused the negative geotaxis of the fruit flies to be compromised right after the first 3 hours of testing, with a substantial degree of impairment (Figure 4a).

The Eugenol also affected the negative geotaxis of *Drosophila melanogaster*. Figure 4b shows how much each concentration varied compared to the control. In this case, it is verified that the exposure to 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the compound causes impairment of the mobility of the flies after 48 hours of exposure, while the concentration of 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ causes the same effect after 12h of contact. The previous exposure to 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of EUG was even more toxic, in view of the negative geotaxis impairment even in the first counting time.

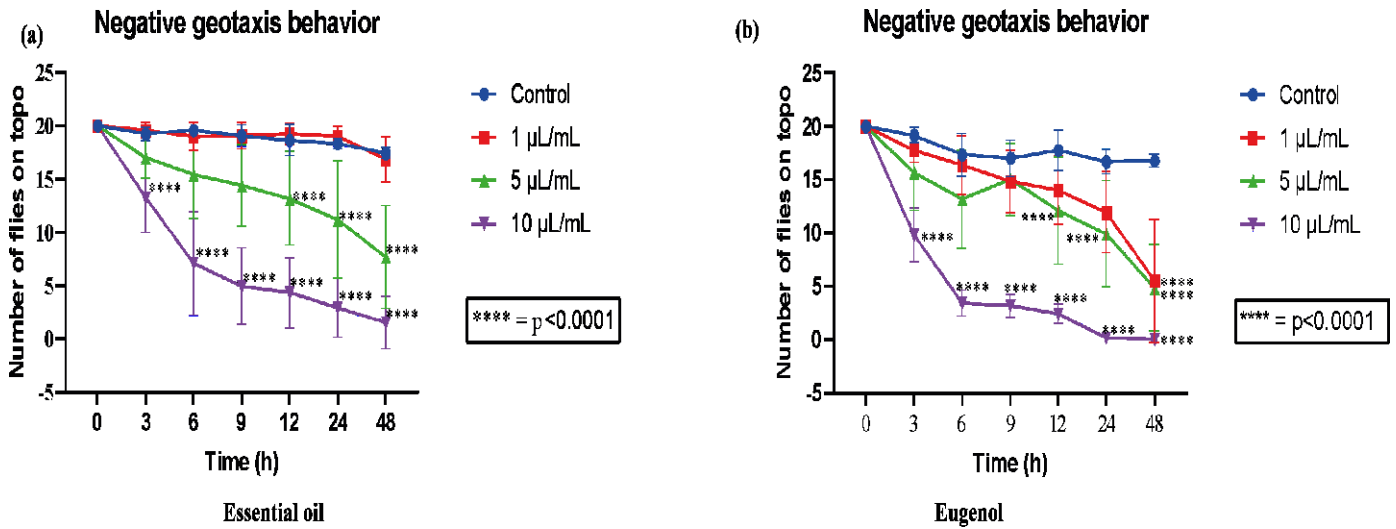


Fig. 4. Effect of the Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (a) and Eugenol (b) on the mortality of *Drosophila melanogaster*, in different concentrations and time.

4 Discussion

Pessoa *et al.* (2015) chemically characterized the essential oil of *Ocimum gratissimum* L., distinguishing the following compounds: Eugenol (67.30 to 74.99%), β -selinene (8.18 to 8.27%), β - ilangene (4.97 to 5.09%), Viridiflorene (3.38 -3.47%), 1,8-cineol (3.07 to 3.11%) and γ -himachalene (2.00 - 2.62 %). The relative composition of the EOOg presented in this study was similar to that presented by Pessoa *et al.* (2015), in view of the one presented for Eugenol (63.25%) and β -selinene (8.43%).

Catherine, Deepika and Negi (2012) mentioned the effectiveness of Eugenol against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The performance of Eugenol in the microtiter methodology was expressive, represented in the very low values of MIC for bacteria: *Bacillus cereus* (0,125 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (0,125 $\mu\text{g/mL}$), *Helicobacter pylori* (0,0312 $\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* (0,25 $\mu\text{g/mL}$) e *Streptococcus pyogenes* (0,5 $\mu\text{g/mL}$). A slightly higher MIC was obtained for *Pseudomonas aeruginosa* (8 $\mu\text{g} / \text{mL}$), although this is as significant as those of the strains mentioned (JEYAKUMAR; LAWRENCE, 2020).

Aguiar *et al.* (2015) examined the antibacterial action of EOOg against bacteria (standard and resistant) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In this analysis, only the standard *Staphylococcus aureus* MIC was significant. These data corroborate with this study, and it is useful to reinforce that EOOg showed equal effectiveness

in relation to the standard strains of *Klebsiella pneumoniae*, standard and resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, standard strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. In turn, Joshi (2013), concluded that the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. also has considerable activity against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, by dilution in tubes.

Jeyacumer and Lawrence (2020) suggest that the EUG causes a disturbance in the lipid fraction of the bacterial membrane, causing a change in permeability that facilitates the interaction of the compound with intracellular portions, thus justifying its effect. The mechanism of action of EOOg is related to its majority composition, with prevalence of Eugenol, as described by Joshi (2013).

The evaluation of the combined activity was performed for the antibiotics Amikacin, Ampicillin, Norfloxacin and Penicillin, aiming to evaluate the possibility of EUG and EOOg to intensify or not the action of these drugs. EUG is the major compound present in a chemotype of *Ocimum basilicum* L. Studies carried out with the latter have shown that the association of its essential oil with Neomycin and also with Amikacin generates a possible synergistic effect, evidenced by the reduction of MIC of these antibiotics, against *Staphylococcus aureus* (NUNES *et al.*, 2014). This information contrasts with what was verified in this study for EOOg and even for the EUG.

Aguiar *et al.* (2015) studied the direct modulating effect of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in association with the aminoglycosides Amikacin and Gentamicin. The significant results obtained in tests involving the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were possibly antagonistic. In this study, we present the possibility of synergism for Amikacin (against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), Norfloxacin (against *Pseudomonas aeruginosa*), Ampicillin and Penicillin (against *Staphylococcus aureus*).

The sequence inhibition of a common biochemical pathway, as well as enzymes that protect microorganisms, the combination of active agents in the cell wall or their association with components that act in other pathways, facilitating their entry into the cell, characterize the main reasons that trigger processes of potentiation of the action of drugs (SANTIESTEBAN-LOPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2007).

The factors that cause antagonism in the drug combination are still poorly understood. However, it is known that the association of bacteriostatic and bactericidal agents, the combined use of compounds that compete for the same target in a microorganism and the very molecular

interactions between different active components, are the main reasons behind the development of antagonistic processes (GÕNI *et al.*, 2009).

The effect of Eugenol, when combined with antibiotics, can be understood by what was explained by Debao *et al.* (2019). This phyto-compound acts by creating deformations in the bacterial membrane, such as that seen against *Escherichia coli*, damaging its integrity and morphology, thus causing an overflow of intracellular content and inactivation of the microorganism. Furthermore, there is also a predisposition of the EUG to bacterial genomic DNA, responsible for the aggregation of DNA molecules. Due to the lipophilic character of monoterpenes, such as EUG, the interaction with polysaccharides, fatty acids and lipids of the bacterial cell membrane is facilitated, thus causing a disturbance in the permeable barrier (LIMAVERDE *et al.*, 2017).

An analogous mechanism can be perceived in the performance of essential oils, capable of compromising the integrity of the bacterial membrane and the conformation of its cell wall, facilitating the influx of drugs (MATIAS *et al.*, 2011). The hydrophobic compounds of these oils, such as Eugenol, are able to adhere to both the plasma membrane and phospholipids and membrane proteins, thus promoting the assimilation of antibiotics (LUZ *et al.*, 2014;).

The conformation of the cellular envelope of microorganisms, induce variations in the effectiveness of chemical components against bacteria. The gram-positive peptidoglycan thick layers guarantee greater sensitivity to bioactive components, since they can interact with the bacterial envelope in different ways and degrees (REQUENA; VARGAS; CHIRALT, 2019). This phenomenon justifies the performance of EOOg by potentiating the action of Amikacin and Penicillin against *Staphylococcus aureus* 10 and EUG by intensifying the action of Penicillin against the same strain in this study.

Chlorpromazine, in non-antibacterial concentrations, has been used as an agent capable of inhibiting efflux pumps, Coutinho *et al.* (2010) discussed the effect of reducing the MIC of Chlorpromazine, concluding its activity for Amikacin, Kanamycin and Tobramycin, in addition to describing an antagonistic effect for Gentamicin and Neomycin, with data referring to tests with *Escherichia coli*.

Sulbactam is a semi-synthetic compound capable of inhibiting the beta-lactamase enzyme (KU; YU, 2021). The combination of SULB together with Ampicillin considerably expands the spectrum of action of the latter, against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, for example. The possible synergistic interactions, presented in this study, involving CPMZ and SULB, may be suggestive of efflux pump and beta-lactamase enzyme inhibition

processes, respectively. However, specific studies must be carried out to prove these mechanisms of action.

According to Zhang *et al.* (2016), oxygenated monoterpenes are agents of considerable toxicity against *Drosophila melanogaster*, which can be represented by the variation of LC₅₀ of 0.015 and 0.02 µl/L. This data is consistent with that presented to the EUG in this study, taking into account the EC₅₀ value equivalent to 2,681 µL/mL. The main factor behind this is associated with the specific characteristics of the EUG, such as: the presence of the hydroxyl group and its position, as well as the characteristic positioning of its double bonds, which can vary in a different way in the degree of mortality of fruit flies, as seen for α-pinene and β-pinene (XIE *et al.*, 2014, ZHANG *et al.*, 2016).

The toxicological response of essential oils is related to the additive and synergistic effects of different compounds (ESSOUNG *et al.*, 2020). Tests carried out with *Ocimum tenuiflorum* showed their fumigant capacity against *S. oryzae*, by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase (AChE). This action is represented by the LC₅₀ value of 479 µL/L (BHAVYA; CHANDU; DEVI, 2018).

A similar effect was evidenced for the EOOg in this study, whose mortality was similar to that of the EUG it self, which is justified, since the literature describes the EUG as a major compound of *Ocimum gratissimum* L. In particular, the compounds present in essential oils confer volatile characteristics, which facilitate their entry into the intracellular environment, the influx of terpenes, for example, can cause the formation of free radicals, death (HUA *et al.* 2018).

The toxicological effect on the negative geotaxis of *Drosophila melanogaster* was prominent for EUG and EOOg. As a survival strategy in adverse situations, fruit flies increase the activity levels of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), thus hydrolyzing acetylcholine and preventing it from accumulating in unfavorable environmental conditions or stress (HU *et al.*, 2019). Thus, it is suggested that the EUG and EOOg acted by inhibiting the action of AChE, allowing the stress of the flies with impairment of their locomotor system.

5 Conclusion

Eugenol is the most expressive component of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. The results obtained in the tests of antibacterial activity and combined with antibiotics were promising, demonstrating that both EUG and EOOg can be viable alternatives for reversing bacterial resistance. Even so, further studies should be carried out to better evaluate the

performance of the tested substances, as well as to delimit the toxicological effect in relation to other concentrations and also by using other model organisms.

Authorship contribution declaration

Júlio César Silva: Methodology and validation. **Raimundo Luiz Silva Pereira:** Methodology. **Thiago Sampaio de Freitas:** Software. **Janaína Esmeraldo Rocha:** Validation. **Nair Silva Macedo:** Methodology. **Carla de Fatima Alves Nonato:** Methodology. **Marina Leite Linhares:** Formal analysis. **Daniely Sampaio Arruda Tavares:** Formal analysis. **Francisco Assis Bezerra da Cunha:** Resources, Supervision. **Henrique Douglas Melo Coutinho:** Conceptualization, Supervision. **Sidney Gonçalo de Lima:** Resources, Supervision. **Francisco Nascimento Pereira Júnior:** Writing-review and editing. **Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues:** Conceptualization, Supervision. **George Joaquim Garcia Santos:** Conceptualization, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was funded by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

References

ACHMIT, M. *et al.* In vitro antibacterial and biofilm inhibitory activity of the sawdust essential oil of *Tetraclinis articulata* (Vahl) against catheter-associated *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Current Research in Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 1-5. 2021.

AGUIAR, J. J. S. *et al.* Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 7, n. 2, p. 151-156. 2015.

- BADKE, M. R. *et al.* Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. Escola Ana Nery Revista de Enfermagem, v. 15, n. 1, p. 132-139. 2011.
- BARRETO, F. S *et al.* Antibacterial activity of *Lantana camara* Linn. and *Lantana montevidensis* brig extracts from Cariri-Ceará, Brazil. Journal of Young Pharmacists, v. 2, n. 1, p. 42-44. 2010.
- BHAVYA, M. L.; CHANDU, A. G. S.; DEVI, S. S. *Ocimum tenuiflorum* oil, a potential insecticide against rice weevil with anti-acetylcholinesterase activity. Industrial Crops and Products, v. 126, n.1, p. 434-439. 2018.
- BIZZO, H. R. *et al.* Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 588-594. 2009.
- BORGES, A. M *et al.* Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 4, p. 656-665. 2012.
- CATHERINE, A.A.; Deepika, H. NEGI, P. S. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. Journal of Essential Oil Research, v. 24, n. 5, 481-486. 2012.
- COUTINHO, H. D. M. *et al.* In vitro additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phamaceutical biology, v. 48, n. 9, p. 1002-1006. 2010.
- CUNHA, F. A. B. *et al.* *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. Toxicology Research, v. 4, n.1, p. 634-644. 2015.
- DEBAO, N. *et al.* Multi-target antibacterial mechanism of eugenol and its combined inactivation with pulsed electric fields in a hurdle strategy on *Escherichia coli*. Food Control, v. 106, n. 1, p. 1-7. 2019.
- ESSOUNG, F. R. E *et al.* Repellence and fumigant toxicity of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Ocimum kilimandscharicum* on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Environmental Science and Pollution Research, v. 27, n. 1, p. 37963–37976. 2020.
- GALUCCI, M. N. *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Flavour and Frangance Journal, v. 24, n. 6, p. 348-354. 2009.
- GÕNI, P. *et al.* Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of Cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry, v. 116, n. 1, p. 982-989. 2009.
- HE, F. *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of essential oil from *Atractylodes lancea* rhizomes. Industrial Crops and Products, v. 153, n. 1, p. 1-8. 2020.
- HU, X. *et al.* Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 171, n. 1, p. 871-877. 2019.

- HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant(Review). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 3, p. 391-400. 2007.
- HUA, Q. *et al.* Allelopathic effect of the rice straw aqueous extract on the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicologia e Segurança Ambiental*, v. 148, n. 1, p. 953-959. 2018.
- JEYAKUMAR, G. E.; LAWRENCE, R. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*, v. 1, n. 1, p. 1-25. 2020.
- JOSHI, R. K. Chemical composition, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their major constituents. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, v. 74, n. 4, p. 457-462. 2013.
- KU, Y. H.; YU, W. L. Cefoperazone/sulbactam: New composites against multiresistant gram negative bacteria?. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 88, n. 1, p. 1-9. 2021.
- KUCUKBAY, F. *et al.* Chemical composition of the essential oils of three *Thymus* taxa from taxa from Turkey with antimicrobial and antioxidant activities. *Records of Natural Products*, v. 8, n. 2, p. 110-120. 2014.
- KUHN, D. *et al.* Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* O. Berg against microorganisms causing food borne diseases. *LWT - Food Science and Technology*, v. 108, n. 1, p. 247-252. 2019.
- LIMAVERDE, P. W. *et al.* Inhibition of the TetK efflux pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, n. 1, p. 957-961. 2017.
- LUZ, I. S. *et al.* Sublethal amounts of *Origaunm vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella Typhimurium* cultivated in a meat broth. *Foodborn and Pathogens Diseases*, v. 11, n.5, p. 357-361. 2014.
- MATIAS, E. F. F. *et al.* Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. *Biomedicine e Preventive Nutrition*, v. 1, n. 1, p. 57-60. 2011.
- MOHAMMADHOSSEINI, M. The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties and medicinal applications of essential oils and extracts of different *Ziziphora* species(Review). *Industrial Crops and Products*, v. 105, n. 1., p. 164-192. 2017.
- NUNES, A. S. F. *et al.* Efeito do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. na resistência aos aminoglicosídeos em *Staphylococcus aureus*. *Boletim Informativo Geum*, v. 5, n. 4, p. 31-37. 2014.
- OBEIDAT, M. *et al.*, Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Research Journal of Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 59-67. 2012.
- PESSOA, S. M. *et al.* Total biomass and essential oil composition of *Ocimum gratissimum* L. in response to broiler litter and phosphorus. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 17, n. 1, p. 18-25. 2015.

REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT*, v. 101, n. 1, p. 183-190. 2019.

RIMAWI, F. *et al.* Free radicals and enzymes inhibitory potentials of the traditional medicinal plant *Echium angustifolium*. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 38, n. 1, p. 1-6. 2020.

SANTIESTBAN-LOPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and ph. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 486-497. 2007.

SHARMA, V. *et al.* Comparative pharmacognostical and phytochemical evaluation (leaf) of different species of *Ocimum*. *International Journal of Phytopharmacology*, v. 1, n. 2. p. 43-49. 2011.

SWAMY, M. K. *et al.* Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, n. 3012462, p. 1-7. 2020.

XIE, Y. J. *et al.* Evaluation toxicity of monoterpenes to subterranean termite, *Reticulitermes chinensis Snyder*. *Industrial Crops and Products*, v. 53, n. 1, p. 163-166. 2014.

ZEMOLIN, A. P. P. *et al.* Toxicity induced by *Prasiola crispa* to fruit fly *Drosophila melanogaster* and cockroach *Nauphoeta cinerea*: evidence for bioinsecticide action. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 77, n. 3, p. 115-124. 2014.

ZHANG, X. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *BioMed Research International*, v. 2018, n. 1, p. 1-8. 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Industrial Crops and Products*, v. 81, n. 1, 147-15. 2016.

ZUHAIRI, J. J. M. J. K. A. *et al.* Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 38, n. 101192. 2020.

4.2 CAPÍTULO DE LIVRO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO

Capítulo de livro publicado na Editora Strictu Sensu: DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283297.03

***Ocimum gratissimum* L. NA PERSPECTIVA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: UMA REVISÃO**

Júlio César Silva ¹; Thais Pereira Lopes ¹; Daniely Sampaio Arruda Tavares ²; Carla Mikevely de Sena Bastos ³; Marina Leite Linhares ⁴; George Joaquim Garcia Santos ⁵; Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues ⁵

¹ Discente Universidade Regional do Cariri (URCA), Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais e Diversidade Biológica, Crato, Ceará Brasil.

² Discente da Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³ Discente Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

⁴Discente do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil

⁵Docente Universidade Regional do Cariri (URCA), Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais e diversidade biológica, Crato, Ceará Brasil.

RESUMO

No mundo todo, as plantas medicinais são o principal tipo de medicamento usado pela população, principalmente em países de clima tropical e emergentes. O manuseio dos recursos de origem vegetal para tratamento de doenças acompanha as civilizações desde o momento em que o homem despertou para consciência de que a natureza poderia ser manuseada conforme seus interesses. *Ocimum gratissimum* L., popularmente conhecida como alfavaca, faz parte da família Lamiaceae e do gênero *Ocimum*. O presente trabalho busca levantar informações a respeito da propriedade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L., dentro da perspectiva de utilização das plantas medicinais. Artigos foram selecionados obedecendo-se critérios de exclusão determinados e prezando-se pelas plataformas Scopus e Periódicos Capes. 156 artigos foram selecionados para fundamentação desta revisão. Após a filtragem, por meio dos critérios de exclusão, 72 artigos restaram e foram utilizados para embasamento teórico e apresentação dos dados da atividade antibacteriana. Evidencia-se por meio dos dados levantados que a espécie em questão apresenta considerável atividade antibacteriana. Estes dados incentivam a continuidade de estudos comparativos, testando-se a eficácia terapêutica dos produtos obtidos a partir da alfavaca, suas propriedades e também se estes são capazes de oferecer algum grau de toxicidade quando administrados.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum* L.; Atividade antibacteriana; Plantas medicinais.

ABSTRACT

Worldwide, medicinal plants are the main type of medicine used by the population, especially in countries with tropical weather and emerging. The handling of plant-based resources for the treatment of diseases follow civilizations from the moment that man awoke to the awareness that nature could be handled according to his interests. *Ocimum gratissimum* L., popularly known as alfavaca, is part of the Lamiaceae family and the genus *Ocimum*. The present work seeks to raise information about the antibacterial property of *Ocimum gratissimum* L., from the perspective of using medicinal plants. Articles were selected in accordance with certain exclusion criteria and valued by Scopus and Periódicos Capes platforms. 156 articles were selected to support this review. After filtering, through the exclusion criteria, 72 articles remained and were used for theoretical support and presentation of data on the antibacterial activity. It is evident from the data collected that the species in question has considerable antibacterial activity. These data encourage the continuity of comparative studies, testing the therapeutic efficacy of the products obtained from the alfavaca, their properties, and also if they are capable of offering some degree of toxicity when administered.

Keywords: *Ocimum gratissimum* L.; Antibacterial activity; Medicinal plants.

INTRODUÇÃO

O manuseio dos recursos de origem vegetal para tratamento de doenças acompanha as civilizações desde o momento em que o homem despertou para consciência de que a natureza poderia ser manuseada conforme seus interesses (GADELHA *et al.*, 2013). Enquanto os povos compreenderam sua função nas estratégias de sobrevivência e habilidade para suprimento de suas necessidades, por intermédio dos recursos naturais, papéis sociais específicos foram criados nas comunidades, entre eles os curandeiros, que introduziram junto às mulheres das tribos a prática de extração de ativos de plantas para cura de doenças (FRANÇA *et al.*, 2007).

Uma planta medicinal pode ser definida como toda e qualquer espécie vegetal que, relacionada a uma tradição e comunidade, possui a propriedade de oferecer tratamento, prevenção e cura das doenças (ANVISA, 2020). Essa definição não pode ser dissociada da relação de convívio do homem com o ambiente, que originou o senso observativo para apropriação dos benefícios disponibilizados pela natureza (CASTRO *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, muitas indústrias farmacológicas têm recorrido aos insumos vegetais para compor os seus medicamentos, buscando principalmente beneficiar uma vasta parcela da população e reduzir os custos vinculados à fabricação de produtos sintéticos (SILVA *et al.*, 2010). As plantas medicinais se destacam, nesse sentido, pelo seu significado como recurso biológico e por seu potencial genético, sendo assim uma alternativa na assistência em saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Um fator relevante para uso das plantas medicinais está nacionalmente associado à diversidade brasileira, que devido a sua riqueza tem incentivado espontaneamente o desenvolvimento de pesquisas de fitofármacos, de ampla relevância em um cenário científico global (GADELHA *et al.*, 2013). No mundo, estima-se que cerca de 25% dos atuais medicamentos disponíveis no mercado sejam originados diretamente de princípios vegetais (WHO, 2011).

Os fatores descritos corroboram com as práticas associadas à medicina tradicional, com o seu desenvolvimento e influência nos hábitos humanos, fomentando modelos alternativos pautados na dinâmica e compreensão cultural vinculada as muitas interações da espécie humana com os recursos naturais (PAZ *et al.*, 2015).

Ocimum gratissimum L. tem sua utilização associada às doenças do trato respiratório (PEREIRA *et al.*, 2004). As literaturas acadêmicas descrevem para essa espécie atividades antioxidantes, anestésicas, analgésicas dentárias, anticonvulsivantes, antibacteriana e antifúngica (SARTORATO *et al.*, 2004). Assim, o presente trabalho busca levantar informações a respeito da propriedade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L., dentro da perspectiva de utilização das plantas medicinais culturalmente.

REVISÃO DE LITERATURA

PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Estratégia de pesquisa de literatura

O nome da planta foi verificado nos sites www.theplantlist.org (The Plant List, 2013) e no www.ipni.org (International Plant Name Index). Foi considerada a nomenclatura *Ocimum gratissimum* L., aceita com três níveis de confiança. Para coleta de dados foi realizada uma pesquisa detalhada de artigos científicos prezando-se pela base de dados Scopus e Periódicos Capes. Os descritores selecionados para busca foram: metabólitos secundários; plantas

medicinais; bioprospecção ou bioprospecção molecular; *Ocimum gratissimum* L.; *Ocimum gratissimum* L. e atividade antibacteriana. Foram revisados estudos publicados entre 2000 a junho de 2020. Artigos em texto completo foram selecionados se o título, o resumo ou as palavras-chave incluíssem os descritores acima citados.

Critérios de exclusão e inclusão

Foram excluídos da revisão todos os trabalhos: [1] não classificados como estudos originais do tipo: cartas ao editor, prefácios, comentários, editoriais, teses e dissertações); [2] repetidos; [3] relatos de casos.

Os artigos foram selecionados com base em seu título, resumo e palavras-chave. Por fim, artigos completos foram analisados seguindo o critério [1] atividade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L. As informações gerais (plantas medicinais, metabólitos secundários, pesquisas bioprospectivas) atribuídas à temática foram apresentadas através de tópicos, que compuseram a fundamentação teórica desta produção.

Após as buscas nas bases de dados foram contabilizados o número de 156 trabalhos. Ao final de todas as etapas de seleção, por meio dos critérios de exclusão estabelecidos, foram selecionados 72 artigos (incluindo os artigos usados nos aspectos gerais e da atividade antibacteriana), os quais tiveram sua análise feita para extração de dados e interpretação de seus resultados. As informações e os dados analisados são discutidos nas seções abaixo.

PLANTAS MEDICINAIS

Aspectos gerais

Silva *et al.* (2010) associam o uso de plantas medicinais às civilizações pré-históricas, visto que os homens primitivos ingeriram plantas para satisfazer suas necessidades nutricionais, pela indisponibilidade de caça para captura, conseguindo distinguir o que possuía efeito terapêutico, tóxico, alucinógeno ou ainda alimentício.

O papel atribuído aos indígenas nessa relação é inegável, tendo em vista a intuição originada a partir desses povos, que norteou a disseminação de saberes a partir do entendimento de que as plantas poderiam fornecer artificios essenciais para cura e alívio (PAZ *et al.*, 2015). Por outro lado, a herança cultural e religiosa das matrizes africanas é preponderante ainda hoje,

como consequência da disseminação de práticas que remontam o período colonial (MOTA; TRAD, 2011).

A institucionalização do Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da promulgação da Constituição de 1988, inseriu as primeiras transformações que serviram como passo inicial para implementação de práticas complementares nos serviços de assistência em saúde no Brasil (IBIAPINA *et al.*, 2014). A fitoterapia, no que lhe concerne, tem favorecido maior conexão da população com fatores históricos, assim como o resgate de sua cultura e costumes tradicionais (MATTOS *et al.*, 2018).

No mundo todo, as plantas medicinais estão na categoria de medicamentos usados pela população, principalmente em países de clima tropical e emergentes (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019). A utilização de plantas medicinais nos últimos anos é perceptível na fitoterapia, em virtude da intensificação de pesquisas bioprospectivas, que identificaram compostos ativos em muitos produtos de origem natural (CUNHA *et al.*, 2016).

Bioprospecção de produtos vegetais

O Brasil é o único país que possui seu nome originado de uma espécie de planta, comprovando que historicamente os produtos vegetais sempre tiveram um papel de destaque para economia do país (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010). O uso dos recursos naturais pelo homem não é um evento recente, a natureza sempre foi utilizada como detentora de recursos para usos medicamentosos, alimentício, suplementar, cosméticos e inseticidas (BERLINCK, 2012).

Define-se como bioprospecção o conjunto de práticas explorativas destinadas à extração de valores da biodiversidade, incluindo a busca sistemática de genes, enzimas, compostos e processos que possam gerar valor econômico ou o desenvolvimento de um produto (JUNIOR, 2011). Para Berlinck (2012), a bioprospecção é algo inerente à cultura brasileira, visto que os indígenas já usavam plantas em seus costumes, além de usá-las também para construção de moradia e de canoas.

Estima-se que 15-25% de todas as espécies vegetais estão dispersas nos biomas brasileiros e que estas foram estudadas sob os aspectos químicos, biológicos e farmacológicos (JOLY *et al.*, 2011). Existe atualmente uma infinidade de metodologias destinadas à síntese e descoberta de novos fármacos e ao longo dos anos as moléculas foram avaliadas e modificadas com o propósito de induzirem respostas específicas (JUNIOR, 2011).

As espécies vegetais de interesse clínico podem ser analisadas seguindo duas vias: a investigação para isolamento de produtos químicos sintéticos para fabricação de fármacos e o uso de suas partes para fabricação de extratos padronizados, visando à avaliação de suas atividades biológicas (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Segundo Silva, Miranda e Conceição (2010), muitas espécies vegetais carecem de estudos relacionados aos seus constituintes químicos. Sob a lógica desses pesquisadores, a fitoquímica apresenta-se como metodologia relevante para o conhecimento das substâncias bioativas presentes nos produtos naturais, fomentando a necessidade de estudos pautados nessa abordagem. Os estudos bioprospectivos voltados para análise química de plantas medicinais, no que lhe concerne, visam a identificação dos compostos obtidos de extratos vegetais, originados de estruturas distintas, tais como: raízes, caule, galhos, folhas, sementes, flores e inflorescências (FILHO; CASTRO, 2019).

No Brasil, os estudos envolvendo a bioprospecção molecular de plantas medicinais ganhou respaldo pela acessibilidade com que esses recursos são encontrados, por sua baixa toxicidade quando comparado com os medicamentos industrializados e como alternativa promissora ao encarecimento e inacessibilidade de muitos medicamentos comercializados atualmente (ZENI; BOSIO, 2011).

Metabólitos secundários de plantas medicinais

O investimento em pesquisas que envolvem os produtos naturais e suas bioatividades tem aumentado nas últimas décadas. Os constituintes ativos existentes na composição destes produtos além de se apresentar como ferramenta para produção de derivados medicamentosos têm demonstrado baixa toxicidade, menores custos e discretos efeitos adversos, sendo em sua grande maioria mais acessíveis (NEWMAN; GRAGG, 2012).

A bioatividade descrita acima é garantida através dos metabólitos secundários, moléculas existentes nos produtos naturais, associadas a processos adaptativos, sem possuir relação com o metabolismo associado ao crescimento ou desenvolvimento (DASH *et al.*, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Em concordância com o afirmado por Fumagali *et al.* (2008), apesar do pleno desenvolvimento da química sintética, a maioria dos metabólitos disponíveis no mercado foram originados do cultivo de plantas medicinais.

Nesse sentido, muitas técnicas foram desenvolvidas nos últimos anos para identificar os metabólitos secundários advindos de espécies vegetais, tanto por sua bioatividade e principalmente pelo retorno econômico que estes oferecem para o ramo farmacológico

(SOBRINHO *et al.*, 2011). Metodologias prospectivas demonstraram que muitas espécies de uso popular possuem metabolismo ativo, o que lhe confere propriedades antibacterianas, anti-helmínticas, antifúngica, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (MURAINA; PICARD; ELOFF, 2009; CHIN *et al.*, 2006).

Testes de bioprospecção molecular, como a fitoquímica, além de acessíveis apresentam excelente custo-benefício, propiciando a identificação dos principais grupos de metabólitos, incluindo flavonóides, alcalóides, taninos, cumarínicos, glicosídeos e cardiotônicos, altamente benéficos para tratamento de muitas complicações de importância clínica (SILVA; MIRANDA E CONCEIÇÃO, 2010).

Ocimum gratissimum L.

Generalidades

Nas últimas décadas, estudos foram realizados na tentativa de se encontrar bioativos capazes de tratar as doenças e amenizar os seus sintomas, sendo as plantas de uso popular as fontes mais usadas para essa finalidade (SILVA *et al.*, 2010). A atividade biológica dos produtos vegetais é uma característica comum a mais de 50 famílias catalogadas, como a Asteraceae e Lamiaceae, largamente conhecidas pelo seu valor industrial e medicinal (VIGAN, 2010).

Ocimum gratissimum L., popularmente conhecida como alfavaca, faz parte da família Lamiaceae e do gênero *Ocimum* (PEREIRA; MAIA, 2007). A princípio, a família Lamiaceae é constituída de plantas arbóreas e também arbustivas, contendo cerca de 258 gêneros e 7193 espécies catalogadas, de origem cosmopolita e originadas das porções subtropicais ou montanhosas do Oriente Médio (HARLEY, 2012; TRINDADE *et al.* 2016). Blank *et al.* (2010) apontam que o gênero *Ocimum* compreende um total de 3200 espécies nativas do sudeste asiático e da África Central, altamente adaptáveis ao solo brasileiro.

A alta distribuição e adaptabilidade da alfavaca nacionalmente se dar por sua capacidade de ajustar características fisiológicas, ultraestruturais e anatômicas às variações ambientais e a alternância de luminosidade (FERNANDES *et al.*, 2014). Existe ainda uma grande variação na morfologia da espécie associada à interferência antrópica no cultivo e a processos de seleção ou hibridação de gênero (LABRA *et al.*, 2004).

A alfavaca é um subarbusto aromático de até 1 metro de altura, de folhas ovaladolaceoladas ricas em compostos químicos, flores pequenas de aspecto roxo e tom pálido

e de frutos em formato de cápsulas (LORENZI; MATOS, 2000). Borges *et al.* (2012) distinguiram a presença de eugenol de maneira preponderante (87,38%) e do timol (6,27%) em folhas frescas coletadas desta espécie.

Atividade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L.

Os resultados para atividade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L. foram descritos na tabela 1. Nesta foi apresentado um resumo do levantamento dos dados obtidos na pesquisa, considerando o ano dos artigos, o título vinculado ao objeto de estudo, o método empregado para análise, as cepas testadas, inibidas e o tipo de produto (extrato, óleo essencial) utilizado nos testes apresentados por cada autor revisado.

Quadro 1: Atividade antibacteriana de *Ocimum gratissimum* L., de acordo com a literatura de 2000 a 2020.

AUTOR	TÍTULO DO ARTIGO	MÉTODO EMPREGADO	CEPA TESTADA	PRODUTO
ORAFIDIYA <i>et al.</i> (2001)	The formulation of an effective topical antibacterial product containing <i>Ocimum gratissimum</i> leaf essential oil.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo Essencial
NGASSOUM <i>et al.</i> (2003)	Antimicrobial study of essential oils of <i>Ocimum gratissimum</i> leaves and <i>Zanthoxylum xanthoxyloides</i> fruits from Cameroon.	Difusão	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>C. glutamicum</i> <i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i>	Óleo Essencial
ACOSTA <i>et al.</i> (2003)	Composición química de los aceites esenciales de <i>Ocimum basilicum</i> L. var <i>basilicum</i> , <i>O. basilicum</i> L. var <i>purpurensens</i> , <i>O. gratissimum</i> L., y <i>O. tenuiflorum</i> L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Óleo Essencial

ADEBOLU; OLADIMEJI (2005)	Antimicrobial activity of leaf extracts of <i>Ocimum gratissimum</i> on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Extrato
MBATA; SAIKIA (2005)	Antibacterial activity of essential oil from <i>Ocimum gratissimum</i> on <i>Listeria monocytogenes</i> .	Difusão	<i>Listeria monocytogenes</i>	Óleo Essencial
JUNAID et al. (2006)	The antimicrobial properties of <i>Ocimum gratissimum</i> extracts on some selected bacterial gastrointestinal isolates.	Difusão	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Escherichia. Coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrato
ORAFIDIYA et al. (2006)	The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of <i>Ocimum gratissimum</i> Linn. against common wound-infecting organisms.	Difusão	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Óleo Essencial
FRANCO et al. (2007)	Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>Aloysia gratissima</i> (gillies & hook) trunc. (alfazema), <i>Ocimum gratissimum</i> L. (alfavaca-cravo) e <i>Curcuma longa</i> L. (açafreão).	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Escherichia coli</i>	Óleos Essenciais
MATASYOH et al. (2007)	Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of <i>Ocimum gratissimum</i> L. growing in Eastern Kenya.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Óleo Essencial
ORAFIDIYA et al. (2007)	A study on the composition, autoxidation and antimicrobial activity of the leaf	Difusão	<i>Neisseria sicca</i>	Óleo Essencial

	essential oil of <i>Ocimum gratissimum</i> Linn. against <i>Helicobacter pylori</i> and <i>Neisseria sicca</i> .			
MATASYOH <i>et al.</i> (2008)	Antimicrobial activity of essential oils of <i>ocimum gratissimum</i> L. from different populations of Kenya.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus spp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Samonella typhi</i> <i>Klebisiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Óleo Essencial
AHONKHAI <i>et al.</i> (2009)	Antimicrobial activities of the volatile oils of <i>Ocimum bacilicum</i> L. and <i>Ocimum gratissimum</i> L. (<i>Lamiaceae</i>) against some aerobic dental isolates.	Difusão e Microdiluição	<i>Strept. viridans</i> <i>K. pneumoniae</i>	Óleo Essencial
OBOH; MASODJE; ENABULELE (2009)	Nutritional and antimicrobial properties of <i>Ocimum gratissimum</i> leaves.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Extrato
PASSOS; CARVALHO; WIEST (2009)	Inibição e inativação <i>in vitro</i> de diferentes métodos de extração de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - <i>Labiatae</i> (<i>Lamiaceae</i>), frente a bactérias de interesse em alimentos.	Tubos múltiplos	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	Extrato
FERREIRA <i>et al.</i> (2010)	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de <i>Croton campestris</i> A., <i>Ocimum gratissimum</i> L. e <i>Cordia verbenacea</i> DC.	Microdiluição	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato
OSUAGWU; EDEOGA (2010)	Effect of fertilizer treatment on the antimicrobial activity of the leaves of <i>Ocimum gratissimum</i> (L.) and <i>Gongronema latifolium</i> (Benth).	Difusão	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhi</i> ; <i>Streptococcus faecalis</i>	Extrato

SILVA et al. (2010)	Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em <i>Artemia salina</i> do óleo essencial das inflorescências de <i>Ocimum gratissimum</i> L., <i>Lamiaceae</i> .	Microdiluição	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Óleo Essencial
BRAGA et al. (2011)	Potential of in vitro antibiotic activity by <i>Ocimum gratissimum</i> L.	Microdiluição	<i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato
GEROMINI et al. (2012)	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais.	Difusão em ágar	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Óleo Essencial
KPOVIESSI et al. (2012)	Chemical variation of essential oil constituents of <i>Ocimum gratissimum</i> L. from benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against <i>Artemia salina</i> leach.	Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Óleo Essencial
MANN (2012)	Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of <i>Clove basil (Ocimum gratissimum</i> L.) grown in Nigeria.	Diluição em ágar	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Vibrio cholerae</i>	Extrato
AMENGIALUE; EDOBOR; EGHAREVBA (2013)	Antibacterial activity of extracts of <i>Ocimum gratissimum</i> on bacteria associated with diarrhoea.	Difusão em ágar	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Shigella sp.</i> ; <i>Salmonella sp.</i>	Extrato
JOSHI (2013)	Chemical Composition, <i>in vitro</i> Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of <i>Ocimum Gratissimum</i> , <i>O. Sanctum</i> and their major constituents.	Diluição em tubo	<i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Óleo Essencial
STEFAN et al. (2013)	The composition and antibacterial activity of essential oils in three <i>Ocimum</i> species growing in Romania.	Difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Óleo Essencial

PEREIRA et al. (2014)	Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> .	Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas vulgaris</i> <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Óleo Essencial
STANLEY et al. (2014)	The antibacterial activity of leaf extracts of <i>Ocimum gratissimum</i> and <i>Sida acuta</i> .	Difusão	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Peudomonas aeruginosa</i>	Extrato
AGUIAR et al. (2015)	Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of <i>Ocimum gratissimum</i> L. and <i>Plectranthus amboinicus</i> L.	Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo Essencial
EVWIERHURHOMA et al. (2015)	Antibacterial evaluation of aqueous and ethanol extracts of <i>Ocimum gratissimum</i> and <i>Carica papaya</i> .	Difusão	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. typhi</i> <i>S. pyogenes</i>	Extrato
OMODAMIRO; JIMOH (2015)	Antioxidant and antibacterial activities of <i>Ocimum gratissimum</i> .	Difusão	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp.</i>	Extrato
BONOU et al. (2016)	Composition chimique et influence de différents tweens sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Laurus nobilis</i> et <i>Melaleuca quinquenervia</i> .	Microdiluição	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo Essencial
IGBINOSA; IDEMUDIA (2016)	Anti-vibrio potentials of acetone and aqueous leaf extracts of <i>Ocimum gratissimum</i> (Linn).	Microdiluição	Cepas de <i>Vibrio</i>	Extrato
BANDEIRA JR. et al. (2017)	Potential uses of <i>Ocimum gratissimum</i> and <i>Hesperozygis ringens</i> essential oils in aquaculture.	Microdiluição	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas veronii</i>	Óleo Essencial

			<i>Citrobacter freundii</i> <i>Raoltella ornithinolytica</i>	
CHIMNOI et al. (2018)	Characterization of essential oil from <i>Ocimum gratissimum</i> leaves: antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens.	Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexner</i>	Óleo Essencial
MELO et al. (2019)	Chemical composition and antimicrobial effectiveness of <i>Ocimum gratissimum</i> L. essential oil against multidrug-resistant isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> .	Difusão e Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Óleo Essencial
SHARMA et al. (2020)	Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds.	Microdiluição	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>M. luteus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Óleo Essencial

Fonte: Dados da pesquisa

CONCLUSÃO

As plantas medicinais continuam sendo ferramentas importantes para terapêutica das doenças, tendo seu uso popular encorajado o desenvolvimento de pesquisas prospectivas, que se aperfeiçoaram com o passar dos anos. Através de testes bioprospectivos, tornou-se possível conhecer bem mais sobre os efeitos bioativos das espécies vegetais, garantidos em sua maioria através de moléculas conhecidas como metabólitos secundários, comuns nas plantas medicinais.

Os resultados apresentados, por meio do levantamento de dados das literaturas, demonstram o potencial antibacteriano da alfavaca. Embora promissoras estas informações devem incentivar a continuidade de estudos comparativos, capazes de oferecer a percepção da eficácia terapêutica dos produtos obtidos a partir de *Ocimum gratissimum* L., além disso pesquisas toxicológicas devem ser realizadas, de modo a evidenciar também possíveis reações tóxicas associadas à prática tradicional de seu uso.

CONFLITOS DE INTERESSE

Confirmamos que não há conflito de interesse associado a este trabalho e que não houve qualquer apoio financeiro que tenha influenciado os resultados apresentados.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. *et al.* Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. **Revista de la facultad de farmacia**, v. 45, n. 1, p. 19-24. 2003.
- ADEBOLU, T. T.; OLADIMEJI, S. A. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. **African journal of biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 682-684. 2005.
- AGUIAR, J. J. S. *et al.* Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European journal of integrative medicine**, v. 7, n. 2, p. 151-156. 2015.
- AHONKHAI, I. *et al.* Antimicrobial activities of the volatile oils of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. (*Lamiaceae*) against some aerobic dental isolates. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 22, n. 4, p. 405-409. 2009.
- AMENGIALUE, O. O.; EDOBOR, O.; EGHAREVBA, A. P. Antibacterial activity of extracts of *Ocimum gratissimum* on bacteria associated with diarrhoea. **Bayero journal of pure and applied sciences**, v. 6, n. 2, p. 143 – 145. 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>> Acesso em 29 julho 2020.
- BANDEIRA JR., G. *et al.* Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 484-491. 2017.
- BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e cultura**, v. 64, n. 3, p. 27-30. 2012.
- BLANK, A. F. *et al.* Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. **Horticultura brasileira**, v. 28, n. 3, p. 305-310. 2010.
- BONOU, J. *et al.* Composition chimique et influence de différents tweens sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Ocimum gratissimum*, *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis* et *Melaleuca quinquenervia*. **European scientific journal**, v. 12, n. 27, p. 1-15. 2016.
- BORGES, A. M. *et al.* Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 4, p. 656-665. 2012.

BRAGA, L. K. A. Potentiation of in vitro antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v. 5, n. 19, p. 2145-2149. 2011.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, B. E. B. S.; CARDOSO, F. C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132. 2019.

CASTRO, A. P. *et al.* Os Sistemas Agroflorestais como Alternativa de Sustentabilidade em Ecossistemas de Várzea no Amazonas. **Acta Amazônia**, v. 39, n. 2, p. 279-288. 2009.

CHIMNOI, N. *et al.* Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. **Microb Pathog.**, v. 118, p. 290–300. 2018.

CUNHA, A. L. *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas jornal**, v. 1, n.2, 175-181. 2016.

DASH, B.K. *et al.* Antibacterial Activities of Methanol and Acetone Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). **Life Sciences and Medicine Research**, v.2011, n.27, p.1-8, 2011.

EVWIERHURHOMA, E. *et al.* Antibacterial evaluation of aqueous and ethanol extracts of *Ocimum gratissimum* and *Carica papaya*. **Annual research & review in biology**, v. 7, n. 1, p. 54-60. 2015.

FERNANDES, V. F. *et al.* Anatomia e ultraestrutura foliar de *Ocimum gratissimum* sob diferentes níveis de radiação luminosa. **Ciência rural**, v. 44, n. 6, p. 1037-1042. 2014.

FERREIRA, F. S. *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **R. bras. Bioci.**, v. 8, n. 3, p. 294-298. 2010.

FILHO, A. C. P. M.; CASTRO, C. F. S. identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. **Estação científica UNIFAP**, v. 9, n. 1, p. 89-101. 2019.

FRANÇA, I. S. X. *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208. 2008.

FRANCO, A. L. P. *et al.* Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafrão). **Revista eletrônica de farmácia**, v. 4, n. 2, p. 208-220. 2007.

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641. 2008.

GADELHA, C. S. *et al.* Estudo bibliográfico do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista verde (Mossoró- RN)**, v. 8, n. 5, p.208-2012. 2013.

GEROMINI, K. V. N. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 15, n. 2, p. 127-131. 2012.

HAYLEY, C. A. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144. 2012.

IBIAPINA, W. V. *et al.* Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Ciência Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 58-68. 2014.

IGBINOSA, E. O.; IDEMUDIA, O. G. Anti-vibrio potentials of acetone and aqueous leaf extracts of *Ocimum gratissimum* (Linn). **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 15, n. 4, p. 743-750. 2016.

JOLY, C. A. *et al.* Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP, São Paulo**, v. 1, n. 89, p. 114-133. 2011.

JOSHI, R. K. Chemical Composition, in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their Major Constituents. **Indian J Pharm Sci.**, v.75, n.4, p. 457-462. 2013.

JUNAID, S. A. *et al.* The antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* extracts on some selected bacterial gastrointestinal isolates. **African journal of biotechnology**, v. 5, n. 22, p. 2315-2321. 2006.

JUNIOR, N. L. S. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente e sociedade**, v. 14, n. 1, 229-244. 2011.

KPOVIESSI, B. G. H. *et al.* Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* leach. **Chemistry and biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 139-150. 2012.

LABRA, M. Morfological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v. 167, p. 725-731. 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, 2002. P. 512.

MANN, A. Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of Clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) grown in Nigeria. **International journal of plant research**, v. 2, n. 1, p. 51-58. 2012.

MATASYOH, L. G. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L. from different populations of Kenya. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**, v. 5, n. 2, p. 187-193. 2008.

MATASYOH, L. G. *et al.* 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.

- MATTOS, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência e saúde coletiva**, v. 23, n. 11, p.3735-3744. 2018.
- MBATA, T. I.; SAIKIA, A. Antibacterial activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Safety**, v. 5, n. 7, p. 15-19. 2005.
- MELO, R. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules.**, v. 24, n. 21, p. 1-17. 2019.
- MOTA, C. S.; TRAD, L. A. B. A gente vive pra cuidar da população: estratégias de cuidado e sentidos para a saúde, doença e cura em terreiros de candomblé. **Saúde e sociedade**, v. 20, n. 2, p. 325-337. 2011.
- MURAINA, I. A.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organismo. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 262-264. 2009.
- NGASSOUM, M. B. *et al.* Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 284-287. 2003.
- NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Produtos naturais como fontes de novas drogas de 1981 a 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661. 2016.
- OBOH, F. O. J.; MASODJE, H. I.; ENABULELE, S. A. Nutritional and antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* leaves. **Journal of biological sciences**, v. 9, n. 4, p. 377-380. 2009.
- OLIVEIRA, M. J. R. *et al.* Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 8, n. 2, p. 39-41. 2006.
- OMODAMIRO, O. D.; JIMOH, M. A. Antioxidant and antibacterial activities of *Ocimum gratissimum*. **American journal of phytomedicine and clinical therapeutics**, v. 3, n. 01, p. 010-019. 2015.
- ORAFIDIYA, L. O. *et al.* A study on the composition, autoxidation and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against *Helicobacter pylori* and *Neisseria sicca*. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 103-109. 2007.
- ORAFIDIYA, L. O. *et al.* The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against common wound-infecting organisms. **The international journal of aromatherapy**, v. 16, n. 2, p. 57-62. 2006.
- ORAFIDIYA, L. O. *et al.* The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International journal of pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 177-183. 2001.

OSUAGWU, G. G. E.; EDEOGA, H. O. Effect of fertilizer treatment on the antimicrobial activity of the leaves of *Ocimum gratissimum* (L.) and *Gongronema latifolium* (Benth). **African journal of biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8918-8922. 2010.

PASSOS, M. G.; CARVALHO, H.; WIEST, J. M. Inibição e inativação *in vitro* de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. ("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") - Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Rev. bras. plantas med.**, v. 11, n. 1, p. 71-78. 2009.

PAZ, C. E. *et al.* Plantas medicinais no candomblé como elemento de resistência cultural e cuidado à saúde. **Revista cubana de plantas medicinais**, v. 20, n. 1, p. 25-37. 2015.

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.). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632. 2007.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p. 146-52, 2012.

PEREIRA, R. S. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de saúde pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328. 2004.

PEREIRA, V. S. *et al.* Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. **Revista interfaces: saúde, humanas e tecnologia.**, v. 2, n. Esp, p. 1-5. 2014.

SARTORATO, A. *et al.* Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280. 2004.

SHARMA, K. *et al.* Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. **Industrial crops and products**, v. 154, p. 1-14. 2020.

SILVA, L. L. *et al.* 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.

SILVA, M. A. *et al.* Levantamento das Plantas Espontâneas e suas Potencialidades Fitoterapêuticas: Um Estudo no Complexo Aluizio Campos-Campina Grande – PB. **Revista brasileira de informação científica**, v. 1, n.1, p. 52-66. 2010.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas do Cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n.3, p. 1-17. 2010.

SOBRINHO, A. L. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of our *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310-2316. 2011.

STANLEY, M. C. *et al.* The antibacterial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* and *Sida acuta*. **IOSR - Journal of dental and medical sciences**, v. 13, n. 6, p. 80-85. 2014.

STEFAN, M. *et al.* The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. **Cent. Eur. J. Biol.**, v. 8, n. 6, p. 600-608. 2013.

TRINDADE, E. L. *et al.* Levantamento de dados das Plantas medicinais recorrentes no estado de Mato Grosso presentes no herbário UFMT Campus de Cuiabá-MT. **Biodiversidade**, v. 15, n. 2, p. 183-190. 2016.

VIGAN, V. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 685-692. 2010.

WHO, WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. 2011.

ZENI, A. L. B.; BOSIO, F. O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica- Nova Rússia, SC. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6, n. 1, p. 55-63. 2011.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428. 2010.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados apresentados por meio do capítulo de revisão publicado (Seção 2), além de demonstrarem o potencial de *Ocimum gratissimum* L. contra agentes bacterianos incitaram também a continuidade dos estudos com esta espécie, desta vez através de ensaios *in vitro*. Com isso, a avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição, comparativamente, demonstrou que tanto o óleo essencial de alfavaca, quanto o Eugenol, são componentes químicos promissores para reversão de resistência aos antibióticos, haja vista a atividade intrínseca e combinada com estes fármacos. Considerando as respostas toxicológicas dos compostos de interesse neste estudo, frente a *Drosophila melanogaster*, tanto o óleo essencial de alfavaca como o Eugenol ofereceram um dano a geotaxia e mortalidade das moscas-da-fruta que não foram proeminentes, porém, comparativamente, pode-se deduzir através do apresentado na seção 4, que o Eugenol foi menos tóxico em comparação com o óleo essencial.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, B. E. B. S.; CARDOSO, F. C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132. 2019.
- CARNEIRO, F. M *et al.* Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75. 2014.
- CHENG, S. S. *et al.* Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4395-4400. 2004.
- COUTINHO, H. D. M. *et al.* In vitro additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 9, p. 1002-1006. 2008.
- COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 48, p.10993-10998. 2004.
- CUNHA, F. A. B. *et al.* *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n.1, p. 634-644. 2015.
- DUARTE, A. F. S. *et al.* O uso de plantas medicinais durante a gravidez e amamentação. **Visão acadêmica**, v. 18, n. 4, p. 126-139. 2017.
- FERNANDES, V. F. *et al.* Anatomia e ultraestrutura foliar de *Ocimum gratissimum* sob diferentes níveis de radiação luminosa. **Ciência rural**, v. 44, n. 6, p. 1037-1042. 2014.
- FREITAS, R. F. *et al.* Perfil fotoquímico, ensaio microbiológico e toxicidade frente a artemia salina do extrato da entrecasca da *Myracrodruon urundeuva* A. **Biota Amazônia**, v. 8, n. 3, p. 24-27. 2018.
- GALUCCI, M. N. *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Frangance Journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354. 2009.
- KPOVIESSI, B. G. H. *et al.* Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* leach. **Chemistry and biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 139-150. 2012.
- KU, Y. H.; YU, W. L. Cefoperazone/sulbactam: New composites against multiresistant gram negative bacteria?. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 88, n. 1, p. 1-9. 2021.

LANINI, J. *et al.* “O que vêm da terra não faz mal” - Relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 121-129. 2009.

LIMAVERDE, P. W. *et al.* Inhibition of the TetK efflux pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food and chemical toxicology**, v. 109, n. 1, p. 957-961. 2017.

MESSIAS, M. C. T. B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: Um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 76-104. 2015.

NUNES, A. S. F. *et al.* Efeito do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. na resistência aos aminoglicosídeos em *Staphylococcus aureus*. **Boletim informativo Geum**, v. 5, n. 4, p. 31-37. 2014.

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.). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632. 2007.

REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. **LWT**, v. 101, n. 1, p. 183-190. 2019.

RIMAWI, F. *et al.* Free radicals and enzymes inhibitory potentials of the traditional medicinal plant *Echium angustifolium*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, n. 1, p. 1-6. 2020.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e contexto-enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 64-70. 2004.

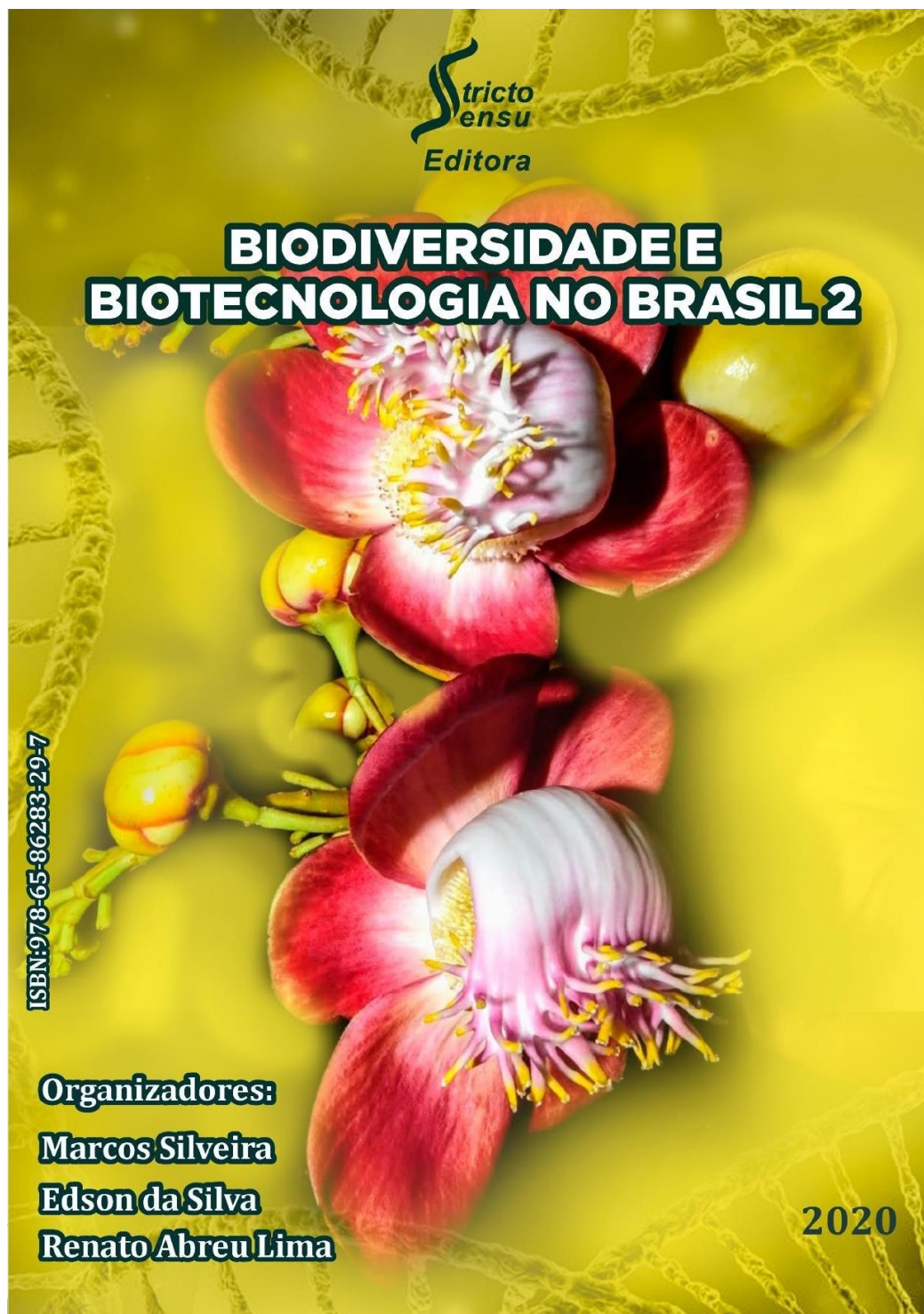
SOUSA, I. J. O. *et al.* A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista Uningá**, v. 31, n. 1, p. 35-39. 2017.

ZHANG, X. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 1-8. 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, v. 81, n. 1, 147-15. 2016.

ANEXOS

ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO CAPÍTULO DE LIVRO (SEÇÃO 2), NA REVISTA STRICTO SENSU, COM DOI: 10.35170/SS.ED.9786586283297.03



SUMÁRIO

CAPÍTULO. 1.....12

ÔMICAS DESVENDANDO A DIVERSIDADE MICROBIANA NOS BIOMAS BRASILEIROS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Priscila Jane Romano Gonçalves Selari (Instituto Federal Goiano)

Sarina Tsui (Universidade de São Paulo)

Tiago Tognolli de Almeida (Universidade Católica Dom Bosco)

Luiz Ricardo Olchanheski (Universidade Estadual de Ponta Grossa)

Manuella Nóbrega Dourado (Universidade de Sorocaba)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283297.01

CAPÍTULO. 2.....30

BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS NO CONTROLE DE LARVAS DE MOSQUITOS

Fábio Medeiros da Costa (Oikos Consultoria e Projetos)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283297.02

CAPÍTULO. 3.....42

Ocimum gratissimum L. NA PERSPECTIVA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: UMA REVISÃO

Júlio César Silva (Universidade Regional do Cariri)

Thais Pereira Lopes (Universidade Regional do Cariri)

Daniely Sampaio Arruda Tavares (Universidade Federal do Ceará)

Carla Mikevely de Sena Bastos (Universidade Regional do Cariri)

Marina Leite Linhares (Centro Universitário Doutor Leão Sampaio)

George Joaquim Garcia Santos (Universidade Regional do Cariri)

Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues (Universidade Regional do Cariri)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283297.03

CAPÍTULO. 4.....60


OBTENÇÃO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS PARA A INDÚSTRIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA – IMPORTÂNCIA DA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Carromberth Carioca Fernandes (Universidade Federal do Acre)

ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO “EVALUATION OF ANTIBACTERIAL AND TOXICOLOGICAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL OF *Ocimum gratissimum* L. AND ITS MAJOR CONSTITUENT EUGENOL” (SEÇÃO

4)

25/06/2021 E-mail de Webmail da URCA - Please verify your contribution to Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential o...



Júlio César Silva <juliocesar.silva@urca.br>

Please verify your contribution to Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent Eugenol

1 mensagem

em@editorialmanager.com <em@editorialmanager.com> 1 de junho de 2021 22:24
 Responder a: support@elsevier.com
 Para: Julio Cesar Silva <juliocesar.silva@urca.br>

This is an automated message.

Journal: Food Chemistry
 Title: Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent Eugenol
 Corresponding Author: Mrs JANAINA ROCHA
 Co-Authors: Julio Cesar Silva; Raimundo Luiz Silva Pereira; Thiago Sampaio de Freitas; Nair Silva Macedo; Carla de Fatima Alves Nonato; Marina Leite Linhares; Daniely Sampaio Arruda Tavares; Francisco Assis Bezerra da Cunha; Henrique Douglas Melo Coutinho; Sidney Gonçalo de Lima; Francisco Nascimento Pereira-Junior; Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues; George Joaquim Garcia Santos
 Manuscript Number:

Dear Julio Cesar Silva,

The corresponding author Mrs JANAINA ROCHA has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Food Chemistry.

Submission Title: Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent Eugenol

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:
<https://www.editorialmanager.com/foodchem/l.asp?i=1233353&l=R2PLO4IL>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at janainaesmeraldo@gmail.com.

Thank you,

Food Chemistry

More information and support
 FAQ: What is copyright co-author verification?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/30181/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>
 FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by

<https://mail.google.com/mail/u/1?ik=d67009b776&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1701416341492148248&simpl=msg-f%3A1701416...> 1/2