

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Flávia Costa de Moraes

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Ocimum americanum, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi* FRENTE A
BACTÉRIAS AERÓBIAS PREVALENTES EM ÚLCERAS DE DECÚBITO**

Juiz de Fora

2014

FLÁVIA COSTA DE MORAES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Ocimum americanum, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi* FRENTE A
BACTÉRIAS AERÓBIAS PREVALENTES EM ÚLCERAS DE DECÚBITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto

Juiz de Fora

2014

FLÁVIA COSTA DE MORAES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Ocimum americanum, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi* FRENTE A
BACTÉRIAS AERÓBIAS PREVALENTES EM ÚLCERAS DE DECÚBITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de mestre.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Celia Hitomi Yamamoto – Orientadora
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico à minha família, pela motivação,
apoio e incentivo para superar as dificuldades
e conquistar mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e me dar força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Sara Maria da Costa Alves de Moraes e Edson Alves de Moraes, por me propiciarem todo apoio para seguir adiante, por meio de dedicação e compreensão.

Aos meus irmãos, Gláucia Costa de Moraes e Edgar Costa de Moraes, por me inspirarem na busca por maiores desafios. Também ao meu sobrinho, Matheus Foroni de Moraes, por seu sorriso que me acalma a alma e o coração.

Ao meu noivo, Leonardo de Paiva Belo, pela amizade, amor, carinho e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto, pela disponibilidade e acolhimento no Laboratório de Controle de Qualidade, pelo apoio e confiança para realizar este projeto.

Ao Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta e à Flávia, do Departamento de Botânica do ICB-UFJF, pela contribuição na extração dos óleos essenciais.

À Profa. Dra. Cláudia M. Rezende e ao doutorando Rafael Ferreira da Silva, do Laboratório de Análise de Aromas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela análise dos óleos essenciais por CG-MS.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia Jéssus e Éder pela atenção e dedicação aos cuidados com o Horto da Faculdade de Farmácia da UFJF.

Aos amigos do mestrado, Valéria de Mello, Gustavo Bellei e Isabela Baumgratz pelos momentos divididos juntos.

Aos meus ex-professores Dr. Luiz Elidio Gregório e Dra. Cristiane Fernanda Fuzer Graef, que através de seus ensinamentos me despertaram o interesse pela área de plantas medicinais.

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação das cepas de micro-organismos utilizadas nas análises.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos
para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

Augusto Cury

RESUMO

Úlceras de decúbito são lesões que desenvolvem-se nas interfaces das proeminências ósseas de sustentação do corpo. As lesões favorecem a colonização microbiana, dificultando a cicatrização e podendo estabelecer uma infecção. Os óleos essenciais de plantas medicinais têm demonstrado ser uma importante fonte para obtenção de novos compostos antimicrobianos. Neste estudo, foi avaliado o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi*. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em ágar e microdiluição, frente a bactérias aeróbias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) prevalentes nas lesões. As variações na concentração e presença de biocompostos nos óleos essenciais influenciaram diretamente na capacidade antibacteriana. As espécies foram identificadas através da análise das composições químicas dos óleos pelo método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas CG-MS. Os quimiotipos identificados foram: *O. americanum* linalol-1,8cineol-cânfora; *O. gratissimum* eugenol e *O. selloi* metil-chavicol, tendo como referência os quimiotipos descritos em artigos científicos. O óleo essencial de *O. selloi* não apresentou atividade antibacteriana significativa; o óleo de *O. americanum* apresentou atividade contra *S. aureus*, com CIM de 625 µg/mL; o óleo de *O. gratissimum* exibiu atividade antibacteriana promissora – apresentando CIM 625 µg/mL – para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* podendo constituir um antisséptico para úlceras de decúbito.

Palavras-chave: úlcera de decúbito, antibacteriano, óleos essenciais, *Ocimum*

ABSTRACT

Decubitus ulcers are lesions developed on interfaces of bony prominences of the body support, reaching bedridden or immobilized patients. Lesions favor microbial colonization, difficult healing, and may establish an infection. The essential oils of medicinal plants have been shown to be an important source for obtaining new antimicrobial compounds. In this study, we evaluated the antimicrobial activity of essential oils of *O. americanum*, *O. gratissimum*, and *O. selloi*. The antibacterial activity was determined by the method of agar diffusion and microdilution against Gram-positive aerobic bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) prevailing in lesions. The variations in concentration and presence of biocompounds in essential oils have directly influenced the antibacterial capacity. Species were identified by analyzing the chemical composition of the oils by the method of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry GC-MS. There were identified the chemotypes: *O. americanum* linalool-1, β -cineol-camphor; *O. gratissimum* eugenol and *O. selloi* methyl-chavicol, with reference in chemotypes described in scientific articles. The essential oil of *O. selloi* did not show significant antibacterial activity; the oil of *O. americanum* showed activity against *S. aureus* with MIC of 625 $\mu\text{g/mL}$; the oil of *O. gratissimum* exhibited promising antibacterial activity, with MIC 625 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli*. which may constitute an antiseptic for decubitus ulcers.

Keywords: decubitus ulcers, antibacterial, essential oils, *Ocimum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Evolução da úlcera de decúbito.....	17
Figura 2 –	Paredes celulares bacterianas.....	22
Figura 3 –	Classificação dos terpenos.....	26
Figura 4 –	<i>Ocimum americanum</i> (manjeriço branco).....	29
Figura 5 –	Substâncias predominantes encontradas nos óleos essenciais dos diferentes quimiotipos de <i>Ocimum americanum</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>Ocimum selloi</i>	31
Figura 6 –	<i>Ocimum gratissimum</i> (alfavaca-cravo).....	32
Figura 7 –	<i>Ocimum selloi</i> (alfavaca-anis).....	34
Figura 8 –	Esquema da distribuição dos testes na análise da CIM em placa de 96 poços.....	41
Figura 9 –	Esquema de diluições sucessivas nos poços no teste de microdiluição em placas.....	42
Figura 10 –	Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie <i>O. americanum</i> obtido por hidrodestilação.....	45
Figura 11 –	Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie <i>O. gratissimum</i> obtido por hidrodestilação.....	47
Figura 12 –	Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie <i>O. selloi</i> obtido por hidrodestilação.....	49
Figura 13 –	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar contra bactérias Gram-positivas.....	51
Figura 14 –	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar contra bactérias Gram-negativas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>O.americanum</i> obtido por CG-MS.....	46
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>O.gratissimum</i> obtido por CG-MS.....	48
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>O.selloi</i> obtido por CG-MS.....	50
Tabela 4 – Inibição do crescimento bacteriano dos óleos essenciais de <i>O. americanum</i> , <i>O. gratissimum</i> e <i>O. selloi</i> frente a diferentes micro-organismos pelo método de difusão em ágar.....	52
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos óleos essenciais de <i>O.americanum</i> , <i>O.gratissimum</i> e <i>O.selloi</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L- microlitro

ATCC – American Type Culture Colection

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

CBM – concentração bactericida mínima

CESJ – Herbário Leopoldo Krieger

CG–MS – Cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

h- hora

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRL cal – Índice de Retenção Linear calculado

IRL lit. – Índice de Retenção Linear da literatura

mL – mililitro

mm – milímetro

°C – grau Celsius

TSA – agar triptona de soja

UD`s- úlceras de decúbito

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	ÚLCERA DE DECÚBITO.....	16
2.1.1	Definição e classificação	16
2.1.2	Prevenção e Tratamento	17
2.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.3	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	23
2.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	24
2.5	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
2.6	GÊNERO <i>Ocimum</i>	28
2.6.1	<i>Ocimum americanum</i>	29
2.6.2	<i>Ocimum gratissimum</i>	31
2.6.3	<i>Ocimum selloi</i> Benth	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	37
4.2	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
4.3	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS).....	37
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Ocimum americanum</i> , <i>O.gratissimum</i> e <i>O.selloi</i>	38
4.4.1	Micro-organismos padrões	38
4.4.2	Padronização da suspensão bacteriana	39
4.4.3	Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em ágar	39

4.4.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS).....	44
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	50
5.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	54
6	CONCLUSÃO	59
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	APENDICE	69

1. INTRODUÇÃO

A úlcera de decúbito ou de pressão, popularmente conhecida como escara, é definida como qualquer lesão causada por uma pressão não aliviada, sendo frequentemente localizada na região de proeminências ósseas (MEDEIROS et al 2009). A pressão compromete a circulação, impedindo a oferta de sangue, o que conseqüentemente diminui a oxigenação e disponibilidade de nutrientes para a pele, ocorrendo quando o paciente está confinado ao leito ou imobilizado (JARVIS, 2012). Pressões entre 60 a 580 mmHg no período de 1 a 6 horas podem ocasionar uma úlcera. Além da pressão, forças de cisalhamento e fricção podem agir sinergicamente no desenvolvimento de uma ferida. As úlceras de pressão podem se desenvolver em 24 horas ou levar até 5 dias para sua manifestação (COSTA et al, 2005).

O emprego de medidas profiláticas por meio da redução da pressão, força de cisalhamento e fricção podem prevenir o estabelecimento de úlcera, que se não for tratada, pode aumentar em tamanho e profundidade (TERRA e DORNELLES, 2003). As úlceras propiciam um ambiente favorável ao crescimento microbiano. A microbiota bacteriana é variada, sendo mais comuns os organismos aeróbicos como *S. aureus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (NETO et al, 2007).

A presença de micro-organismos na ferida dificulta a cicatrização, facilita a evolução da úlcera, possibilita a ocorrência de infecção e septicemia (THOMAS, 2013). A existência de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis na clínica têm sido motivo de preocupação para infecções nosocomiais. Por este motivo, as pesquisas de novos agentes antimicrobianos têm despertado grande interesse.

Os óleos essenciais e extratos vegetais possuem atividade antibacteriana, antifúngica e propriedades antivirais e têm sido rastreados como potencial fonte de novos compostos antimicrobianos para doenças infecciosas. Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de plantas. Há hidrofobicidade dos óleos permiti a partição dos seus constituintes com

os lipídeos da membrana celular bacteriana, tornando-as mais permeáveis (SANTOS e NOVALES, 2012).

O gênero *Ocimum*, pertencente à família *Lamiaceae*, ocorre naturalmente na América, África e Ásia. As espécies pertencentes a este gênero possuem importância econômica e medicinal. Entre as propriedades medicinais destacam as ações repelente, antimicrobiana, anti-séptica, carminativa, estimulante, antiespasmódica, anti-oxidante e antipirética (HILTUNEN e HOLM, 2005; PADALIA et al, 2013).

As espécies de *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum* e *O. selloi* tem se destacado pelo seu uso medicinal. A espécie de *Ocimum americanum*, conhecido como manjeriço branco, é usado na medicina tradicional chinesa para tratar conjuntivite, malária e dores de cabeça (SILVA et al, 2003). Estudos realizados com as folhas de *Ocimum gratissimum*, popularmente chamado de manjeriço, descreveram atividades biológicas atribuídas a esta espécie como ações anestésica, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana contra bactérias e fungos (FRANCO et al 2007; PEREIRA e MAIA, 2007; DAMBOLENA et al, 2010; PRAKASH et al, 2011; PAULA-FREIRE et al, 2013). As folhas de *Ocimum selloi*, conhecido como elixir paregórico e alfavaquinha, é popularmente utilizado em afecções gastrointestinais, estudos demonstraram atividade antibacteriana, antifúngica e redução dos espasmos intestinais (FRANCA et al, 2008; NASCIMENTO et al, 2011; VIEIRA et al, 2014).

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Ocimum americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi* frente às bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas prevalentes em úlceras de decúbito.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÚLCERA DE DECÚBITO

2.1.1 Definição e classificação

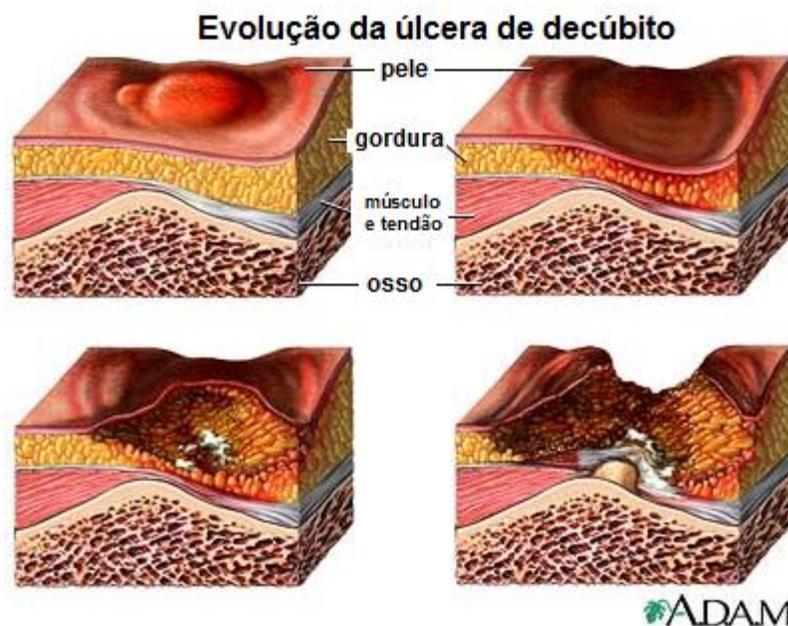
As úlceras de decúbito (UDs) desenvolvem-se nas interfaces das proeminências ósseas de sustentação do corpo. Dessa forma, forças de compressão e cisalhamento, que atuam devido à imobilidade do paciente, causam uma isquemia tecidual, podendo comprometer a epiderme, derme, hipoderme, músculos, tendões, nervos e ossos (WOLFF e JOHNSON, 2011; LOPES, 2006).

Embora o termo úlcera de pressão tenha sido empregado, úlcera de decúbito seria um termo mais adequado. A úlcera de decúbito é o resultado da combinação de fatores ambientais, bioquímicos e fisiológicos (PARISH e WITKOWSKI, 2004). Conseqüentemente, as UD's causam morbidade significativa, mortalidade e alto custo econômico para sistemas de saúde, principalmente em pacientes de países em desenvolvimento, devido às baixas condições socioeconômicas (BRAGA et al, 2013; ZEEGELAAR et al, 2006).

As UD's são classificadas em etapas definidas pelas camadas visíveis de tecido danificado a partir da superfície para o osso (THOMAS, 2013). Segundo o protocolo para a prevenção de úlcera de pressão, existem quatro estágios de classificação. O primeiro estágio consiste em uma pele intacta com vermelhidão não branqueável; o segundo, é definido pela perda parcial da espessura da derme apresentando uma úlcera aberta rasa; no terceiro ocorre perda total da espessura do tecido e a gordura subcutânea pode ser visível; no quarto estágio, há perda completa da espessura do tecido, com exposição óssea do tendão ou músculo (JARVIS, 2012). A Figura 1, ilustra a evolução e estágios da úlcera de decúbito (A.D.A.M, 2013).

A úlcera de decúbito é um dos diagnósticos mais malignos feitos na medicina contemporânea (PARISH e WITKOWSKI, 2004). Esse tipo de úlcera possui prevalência que varia entre populações clínicas específicas, que são distribuídas em dois grupos. Um grupo mais jovem, na sua maioria, pessoas com deficiência neurológica; e outro formado por pessoas idosas. A maior incidência ocorre em unidades de cuidado intensivo após cirurgia vascular e lesão ortopédica (WHITNEY et al, 2006; EBRIGHT, 2005).

Figura 1 – Evolução da úlcera de decúbito



Parte superior, da esquerda para a direita, estão representados o primeiro e segundo estágios; na parte inferior, estão presentes o terceiro e quarto estágios (Fonte: A.D.A.M., 2013).

2.1.2 Prevenção e Tratamento

Whitney et al (2006) estabeleceram seis procedimentos de tratamento de úlceras de decúbito. A superfície de posicionamento e o apoio do paciente devem ser

avaliados a fim de reduzir a pressão do osso em tecidos moles; o estado nutricional deve possuir proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais necessários para a cicatrização de feridas; o tratamento de infecções contribui para melhorar a cicatrização e possibilita a reparação cirúrgica; a preparação do leito da ferida acelera a cicatrização e facilita a eficácia de outras medidas terapêuticas; os curativos devem proteger o local contra atrito, irritação e manter um ambiente úmido, facilitando a cicatrização com epitelização mais rápida, a utilização de pensos oclusivos pode ser útil; a intervenção cirúrgica é a última escolha, removendo o tecido necrosado que é inviável para a cicatrização de feridas, e é um ambiente favorável para o crescimento bacteriano, a remoção facilita a exposição do tecido a agentes de tratamento.

Todas as feridas crônicas são colonizadas por bactérias representando uma contaminação. A colonização pode ser estabelecida sem qualquer efeito adverso, mas a infecção pode danificar o tecido e retardar a cicatrização (THOMAS, 2013). As infecções ocorrem especialmente nas fases III e IV, sendo mais comumente invadidos o leito da ferida e tecidos adjacentes (EBRIGHT, 2005).

A presença de micro-organismos na ferida dificulta a cicatrização por mecanismos, incluindo-o: retardo da cicatrização por micro-organismo específico como *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* propiciando consequências patológicas; a existência de infecções polimicrobianas incluindo bactérias anaeróbias; a alta densidade microbiana; resposta inflamatória subclínica do paciente apresentando ausência de fatores de crescimento como fibroblastos e excesso de citocinas (EBRIGHT, 2005).

O processo lento de cicatrização aumenta a morbidade e o custo de tratamento das úlceras. Muitos pacientes com dificuldades no fechamento de feridas são negligenciados não havendo um diagnóstico ou avaliação clínica adequados e contribuindo para o uso irracional de antibióticos orais (THOMAS, 2013; OIEN, 2014).

O diagnóstico de infecção requer dois critérios essenciais como a presença de bactérias na ferida e evidência de danos ao tecido sob a forma de resposta inflamatória (THOMAS, 2013). A evidência clínica de infecção pode ser baseada na presença de sinais e sintomas como abscesso, celulite, pus, retardo na cicatrização, dor e sinais sistêmicos envolvendo febre e leucocitose (BRAGA et al, 2013). O odor

desagradável é, muitas vezes, relatado como sinal clínico, mas nem sempre é verdadeiro, podendo ser proveniente da compressa, ao invés da ferida em si, e a ausência de odor se deve a presença de micro-organismos anaeróbios (THOMAS, 2013).

A localização da úlcera é um fator crítico para o desenvolvimento de necrose tecidual, havendo maior possibilidade de infecção fecal quando localizada na região coccígena (MIZOKAMI et al, 2014). Em um estudo realizado por Brook (1991), foi relatada a presença de *S. aureus* como o aeróbio mais prevalente recuperado na maioria das regiões atingidas, predominando nas lesões de mãos e pernas, enquanto nas úlceras presentes próximas às nádegas, houve predominância de *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*. Bactérias anaeróbicas estiveram presentes em mucosas. Desta maneira, foi possível correlacionar a localização anatômica da úlcera com a colonização microbiana. Além disso, alguns micro-organismos aeróbios isolados são capazes de causar sepse, incluindo *Proteus*, *E. coli*, *Enterobacter spp*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, estreptococos e leveduras. Assim, o manejo das lesões envolve terapia antimicrobiana adequada (BROOK, 2004).

A antibioticoterapia sistêmica é necessária no tratamento de UD's quando há possibilidade de septicemia. No entanto, não diminuem os níveis de bactérias em feridas, contudo a aplicação tópica oferece bons resultados (BROOK, 2004; WHITNEY et al, 2006). Agentes antimicrobianos tópicos, como preparações sintéticas de iodeto, sulfadiazina de prata e biguanida polihexametileno (PHMB) são eficazes (O'NIEN, 2014).

A microbiota bacteriana encontrada na superfície cutânea está representada por micro-organismos Gram-positivos não patogênicos como *Staphylococcus epidermidis*, *S. albus* e *S. aureus*. Os micro-organismos Gram-negativos são menos habituais, sendo os do gênero *Proteus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, os mais frequentes (CUNHA et al, 2004).

A microbiota normal beneficia o hospedeiro ao impedir o crescimento de micro-organismos patogênicos. No entanto, sob certas condições, a relação pode mudar. Um organismo mutualístico como a *E. coli* pode tornar-se prejudicial. A *E. coli* geralmente é inofensiva enquanto permanece no intestino delgado de seu

hospedeiro, mas, ao acessar outras regiões do corpo, como o trato urinário, pulmões, medula espinhal ou feridas, causam infecções (TORTORA, 2010).

Estudos microbiológicos das lesões identificaram bactérias predominantes nas lesões, como os estafilococos, *S. aureus* e *S. epidermidis*, bacilos Gram-negativos incluindo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e bactérias anaeróbias nas mucosas (BROOK, 1991; BROOK, 2004; HEYM et al, 2004; EBRIGHT, 2005; ZEEGELAR et al, 2006; BRAGA, et al 2013). Desta maneira, observando-se uma microbiota bacteriana predominante e, caso o paciente encontre-se com o sistema imune debilitado, estará sujeito a uma infecção.

O uso racional de antimicrobianos de amplo espectro para tratar infecções diminui a mortalidade, porém contribui para a existência de cepas resistentes. A administração de antimicrobianos pode ser, inicialmente, guiada pela localização da úlcera devido à presença predominante da flora bacteriana (BROOK, 2004; MIZOKAMI et al, 2014). O uso tópico consisti em um “padrão ouro” (melhor terapia) para o tratamento local (OIEN, 2014).

Considerando a resistência microbiana aos antibióticos, plantas medicinais têm sido extensivamente estudadas como tratamento alternativo (NIYOMKAM et al., 2010). As plantas produzem metabólitos secundários com atividades farmacológicas possibilitando a investigação de novos agentes ativos contra micro-organismos patogênicos ao organismo. Dentre os metabólitos secundários, óleos essenciais de plantas medicinais têm sido tradicionalmente utilizados como antibacterianos (POTHITIRAT et al, 2010, LUANGNARUMITCHAI et al, 2007).

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS

Desde os tempos imemoriais, o homem busca, na natureza recursos que melhorem sua condição de vida com objetivo de aumentar sua chance sobrevivência em função da melhoria de sua saúde (BRASIL, 2006). Dentre as práticas mais difundidas pela cultura popular, as plantas sempre tiveram fundamental importância,

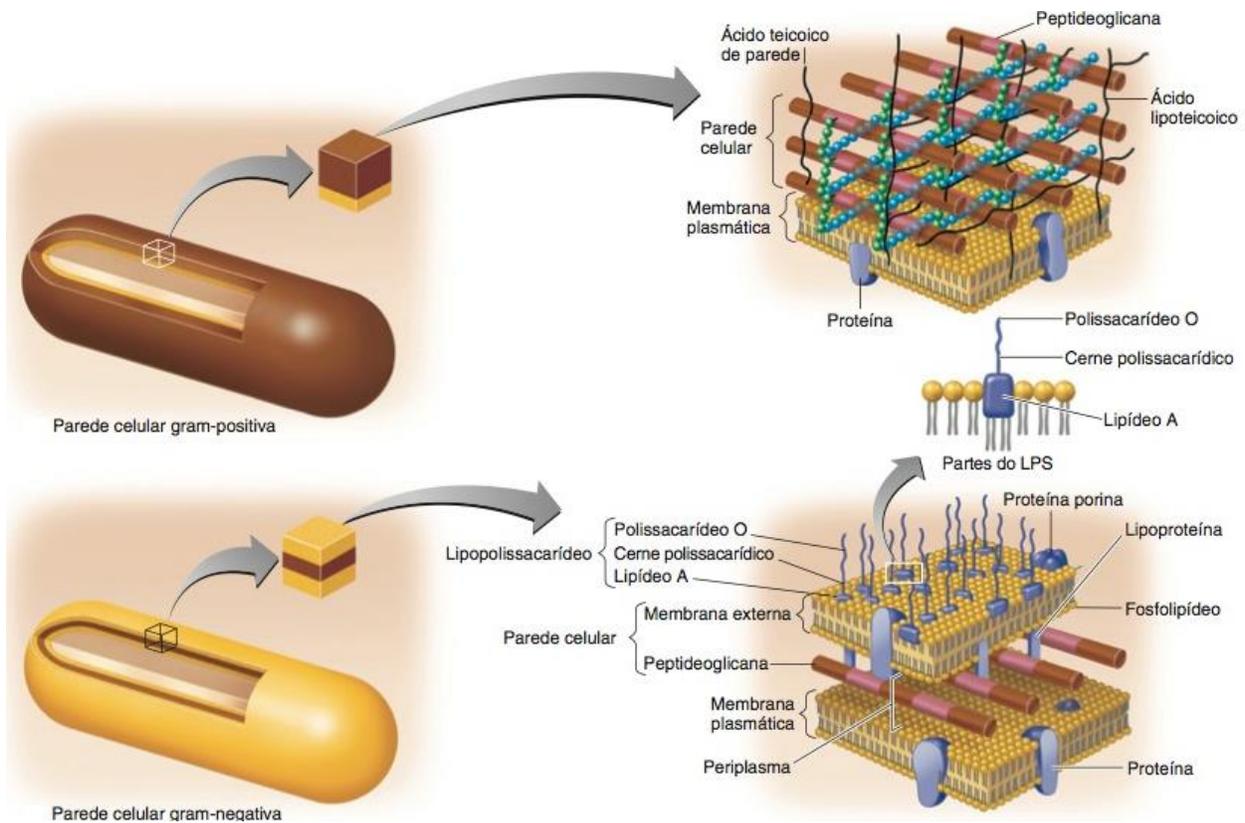
por inúmeras razões, sendo salientadas as suas potencialidades terapêuticas aplicadas ao longo de gerações (BADKE et al, 2012). Algumas plantas devem aos óleos essenciais as ações antissépticas, anti-inflamatória, suavizante e cicatrizante. Uma das ações mais estudada é a antisséptica, que tem sido verificada não só sobre bactérias patogênicas variadas, mas também sobre fungos (CUNHA et al, 2004).

Devido ao aumento da resistência dos micro-organismos às muitas substâncias químicas antimicrobianas, despertou-se a pesquisa por novas fontes de biocidas de amplo espectro. Os óleos essenciais (OEs) e seus componentes têm uma variedade de alvos na parede celular e citoplasma das células. Geralmente, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a OEs do que as bactérias Gram-positivas, por apresentar maior complexidade da parede celular (NAZZARO et al, 2013).

Paredes celulares de bactérias Gram-positivas consistem em muitas camadas de peptidoglicana e ácidos teicóicos. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta de lipopolissacarídeo-lipoproteína-fosfolípídeo, circundando uma fina camada de peptidoglicana (Figura 2). Parte da permeabilidade da membrana externa é devido a porinas, proteínas transmembranas, que atuam como canais iônicos, permitindo a passagem de moléculas como nucleotídeos, dissacarídeos, peptídeos, aminoácidos, vitaminas B₁₂ e ferro (TORTORA et al, 2010).

A diferença estrutural das paredes bacterianas entre Gram-negativas e Gram-positivas influenciam na sensibilidade das bactérias aos diferentes antibióticos. A estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas possui característica hidrofóbica facilitando a penetração de substâncias apolares pela membrana e citoplasma. Bactérias Gram-negativas são mais resistentes a antibióticos e substâncias tóxicas hidrofóbicas, no entanto, a presença de porinas na membrana facilitam a permeação de pequenos solutos hidrofílicos (TORTORA, 2010; NAZZARO et al, 2013).

Figura 2 – Paredes celulares bacterianas



A estrutura da parede em bactérias Gram-positivas consiste em muitas camadas de peptidoglicano com ácido teicóico. A estrutura da parede de bactérias Gram-negativas é mais complexa, com uma membrana externa com porinas, uma fina parede de peptidoglicano e membrana plasmática (Fonte: adaptado de TORTORA, 2010).

Os óleos essenciais possuem atividade antisséptica, sendo descrita ação bactericida e bacteriostática de seus constituintes (COSTA, 2002). Os terpenóides apresentam atividade antibacteriana atribuída a sua estrutura apolar que compromete a integridade da função da membrana celular, permitindo o extravasamento dos componentes intracelulares. E, os fenilpropanóides possuem atividade antimicrobiana relevante, demonstrando um amplo espectro de atividade (CUNHA et al, 2004; NAZZARO et al, 2013).

O mecanismo de ação dos OEs depende da sua composição química. A atividade antimicrobiana não é atribuível a um único mecanismo, mas a uma cascata de reações que envolvem toda a célula bacteriana, incluindo degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática e às proteínas de membrana, e coagulação do citoplasma (NAZZARO et al, 2013).

2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diversos ensaios *in vitro* têm sido citados para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais dentre eles, destacam os métodos de difusão em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (OSTROSKY et al, 2008).

No ensaio utilizando difusão em ágar, uma placa de Petri é utilizada contendo um meio de ágar sólido com toda sua superfície sendo uniformemente inoculada com uma quantidade padronizada do micro-organismo a ser testado (TORTORA, 2013). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão, são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

Os tamanhos das zonas de inibição do crescimento variam de acordo com as características moleculares dos antimicrobianos. Assim, diferentes substâncias não podem ser comparáveis para um mesmo micro-organismo (JAWETZ et al, 2012). Drogas que apresentam baixa solubilidade, apresentam uma zona de inibição menor do que a zona gerada por uma droga que é mais solúvel e se difunde melhor no ágar (TORTORA, 2010).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição. A macrodiluição é realizada em tubo de ensaio, com volume variando de 1 a 10 mL. A

midrodiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume variando entre 0,1 e 0,2 mL (NASCIMENTO et al, 2007).

Um método de diluição em meio líquido é útil para determinar a CIM e também a concentração bactericida mínima (CBM) de uma droga antimicrobiana. A CIM é determinada pela preparação de concentrações decrescentes da droga em meio líquido, seguida da inoculação com a bactéria a ser testada. As amostras que não apresentam crescimento podem ser cultivadas em outro caldo ou placas de ágar estéreis. Se o crescimento ocorrer, significa que a CIM da droga não era bactericida (TORTORA, 2010).

Pesquisas relacionadas a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais têm sido prejudicadas pela ausência de métodos padronizados, dificultando a comparação entre estudos e inviabiliza a reprodutibilidade dos testes. Desta maneira, fatores que influenciam os resultados devem ser mencionados durante os resultados, como linhagem do micro-organismo testado, período de incubação, utilização de controles, o uso e quantidade de emulsificador, obtenção e composição do óleo essencial (NASCIMENTO et al, 2007).

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, também designados como essências, são constituídos por uma mistura de compostos voláteis, apresentando insolubilidade na água e solubilidade em solvente orgânico (CUNHA et al, 2004; COSTA, 2002). Dentre as principais funções biológicas atribuídas aos óleos essenciais na planta, incluem atração de agentes polinizadores, defesa contra herbívoros, reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica no solo e como agentes antimicrobianos. A polinização contribui com a geração de um grande número de sub-espécies que diferem em sua composição química e morfológica, resultando na ocorrência de quimiotipos (SIMÕES et al, 2000; MATASYOH et al, 2006; PEREIRA e MOREIRA, 2011).

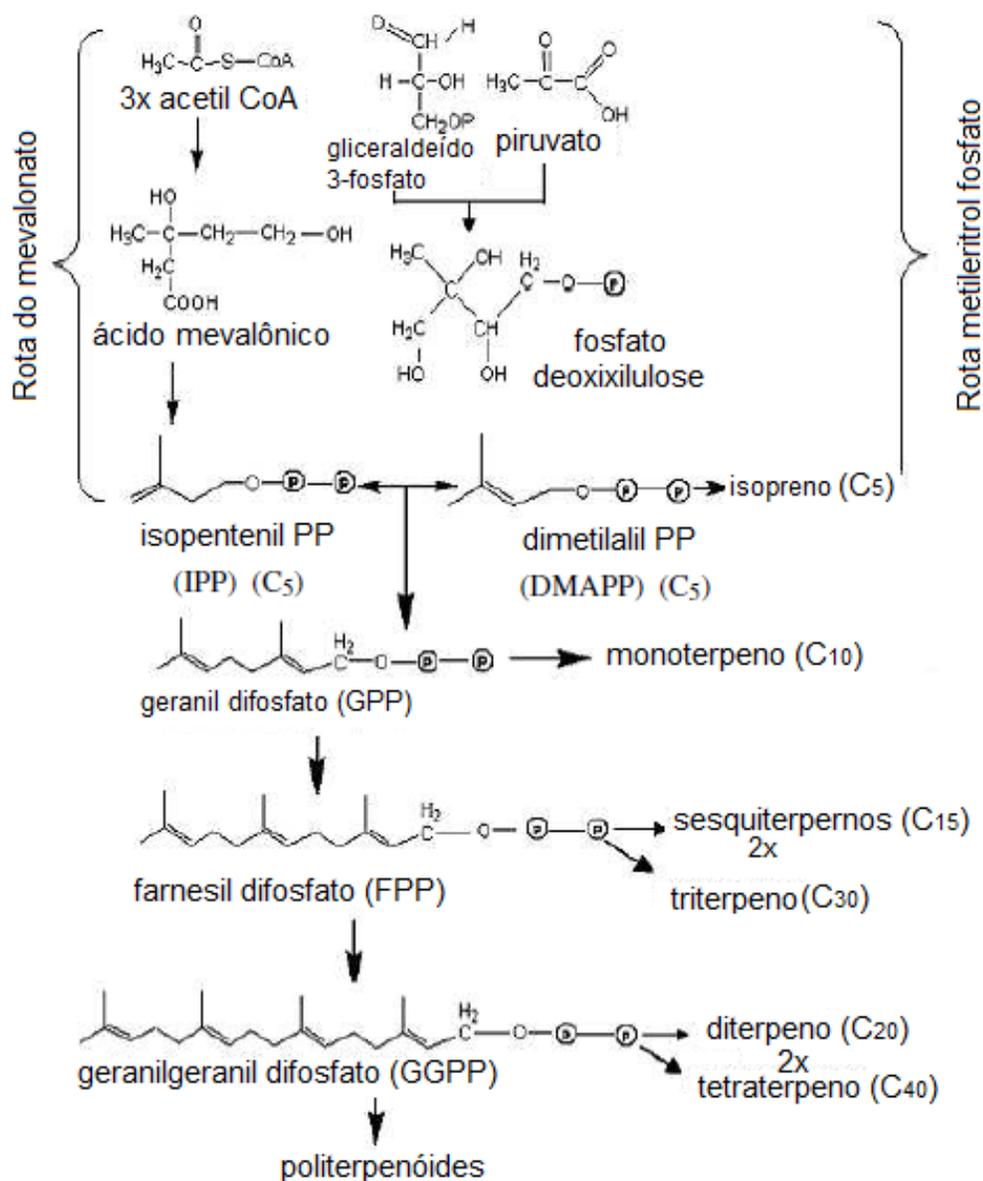
O estudo da composição química dos óleos essenciais é uma das mais antigas áreas de pesquisa de química orgânica (CAREY, 2008). A cromatografia gasosa é a técnica analítica de escolha para determinar a composição química dos OEs devido à sua sensibilidade, eficácia e rapidez para análise, identificação e isolamento de óleos essenciais (COSTA, 2002).

Os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais pertencem a dois grupos, os derivados terpênicos e os de natureza fenólica, classificados conforme sua estrutura química (CUNHA et al 2004; CAREY, 2008; ATKINS e JONES, 2010).

Os compostos terpênicos formam uma família com diversas estruturas de derivados de unidades de isopreno, geralmente são insolúveis em água e apresentam baixo peso molecular (DEWICK, 2002; TAIZ e ZEIGER, 2002). Os derivados terpênicos são biossintetizados a partir do acetato por um processo que envolve a formação de ácido mevalônico, difosfato de isopentila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAP), sendo que estas duas últimas são complementares, de forma que podem reagir entre si, formando o difosfato de geranila (duas unidades de isopreno). O difosfato de geranila, ao ser desprotonado, pode reagir com (IPP) formando o difosfato de farnesila. Este composto também poderá ser desprotonado e reagir com IPP e, originar o geranilgeraniol, como esquematizado na Figura 3 (CAREY, 2008).

Os diferentes terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que possuem (CANHOTO, 2010): hemiterpenos (C_5), monoterpeno (C_{10}), sesquiterpeno (C_{15}), diterpeno (C_{20}), sesterterpeno (C_{25}), triterpeno (C_{30}), tetraterpeno (C_{40}). Os terpenos superiores são formados, não pela adição de unidade C_5 , mas, sim pelo acoplamento de terpenos mais simples (DEWICK, 2002). Os terpenos voláteis (monoterpenos e sesquiterpenos) são designados como componentes de óleos essenciais (CANHOTO, 2010), possuindo intensa propriedade aromatizante, sendo utilizados como matéria-prima na produção de fragrâncias para as indústrias de perfumaria, cosmética, higiene, alimentos e medicamentos.

Figura 3 – Biossíntese dos terpenos



Fonte: TAIZ e ZEIGER, 2002

Os fenóis possuem em sua estrutura anel de benzeno ligado ao grupo hidroxila (-OH). Constituem um grupo heterogêneo do ponto de vista metabólico, no qual estão implicadas duas rotas bioquímicas básicas – a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico – podendo levar à formação de muitos fenóis, incluindo os fenilpropanóides simples (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Vários pigmentos comuns nas plantas são de natureza fenólica, responsáveis pela coloração de flores e frutos, os fenóis possuem atividade antioxidante, sendo extremamente importantes do ponto de vista alimentar (CANHOTO, 2010).

O gênero *Ocimum* é rico em óleo essencial e tem sido objeto de numerosos estudos químicos.

2.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O rendimento e a composição química dos óleos essenciais variam sob a influência de numerosos fatores: origem específica, clima, região da planta, época da colheita e métodos extrativos usados. A secagem modifica as essências, devido as perdas por volatilização e transformações dos constituintes fundamentais, como hidrólise, oxidações e polimerizações (COSTA, 2002).

A obtenção clássica do óleo essencial é realizada pelo método de hidrodestilação, devido a sua facilidade e economia. No método de hidrodestilação o material a ser destilado está em contato direto com a água e quando entra em ebulição, faz com que o vapor de água arraste os componentes aromáticos da planta. O vapor passa por um condensador apropriado formando uma mistura heterogênea de duas fases, devido a diferença de polaridade (CUNHA et al, 2004; SIMÕES et al, 2000).

Na extração por solventes voláteis, o material vegetal é convenientemente dividido e misturado com um solvente ideal. O solvente deverá apresentar baixo ponto de ebulição e ser de fácil recuperação por rotaevaporação. O inconveniente é que de acordo com o solvente utilizado podem ser extraídos ceras, glicerídeos e hidrocarbonetos que podem modificar as composições químicas das essências (COSTA, 2002; CUNHA et al, 2004; SIMÕES et al, 2000).

O método de *enfleurage* tem sido utilizado a milênios, e as pétalas de flores são colocadas em caixilhos de vidro contendo gordura aquecida que irá impregnar os compostos aromáticos da planta. A gordura impregnada é denominada pomada e

pode ser utilizada diretamente em produtos cosméticos. Devido ao seu alto custo final praticamente não tem sido utilizado (CUNHA et al, 2004).

A expressão é realizada pela compressão através de prensas, sob pequeno atrito, e os tricomas rompem-se com facilidade separando assim o conteúdo integral, inalterado, que escorre para o exterior. Tem sido empregado para obtenção de essências de flores e frutos (SIMÕES et al, 2000).

Os óleos essenciais obtidos podem ser isolados e seus constituintes identificados por diversas análises cromatográficas. A cromatografia gasosa tem revelado ser uma extraordinária técnica para isolamento, identificação e dosagem de substâncias facilmente vaporizáveis, sólidas ou líquidas. Devido sua elevada sensibilidade, eficácia e rapidez (COSTA, 2002).

A vantagem do acoplamento de um cromatógrafo gasoso e um espectrômetro de massas possibilita a análise de misturas complexas, através da interpretação do espectro dos componentes separados individualmente e esta técnica apresenta elevada sensibilidade para aquisição e processamento de dados (BASER e BUCHBAUER, 2010).

2.6 GÊNERO *Ocimum*

O gênero *Ocimum*, pertence à família Lamiaceae, consiste em uma importante fonte de óleos essenciais e de produtos químicos aromáticos utilizados nas indústrias de alimentos, produtos de perfumaria e cosméticos (PADALIA et al, 2013).

É constituído por aproximadamente 60 espécies e numerosas variedades. Espécies de *Ocimum* sofrem abundante polinização cruzada, resultando em um grande número de sub-espécies e variedades, que diferem na composição do óleo essencial e características morfológicas (MATASYOH et al, 2006).

2.6.1 *Ocimum americanum*

Ocimum americanum L. (sin. *O. canum* Sims) é popularmente conhecido como manjeriçãõ branco (Figura 4). É um arbusto resistente à maioria das pragas de plantas (MATASYOH et al, 2006). É usado na medicina tradicional chinesa para tratar conjuntivite, malária e dores de cabeça; nos alimentos e perfumaria, é empregado pelo seu aroma frutado com notas de cânfora (SILVA et al, 2003; JIROVETZ et al, 2003). *Ocimum americanum* apresentou uma promissora atividade antibacteriana em um estudo realizado por Carovic´-Stanko et al (2010), onde foram avaliados óleos essenciais de sete espécies do gênero *Ocimum* como conservantes naturais na indústria alimentícia.

Figura 4 – *Ocimum americanum* (manjeriçãõ branco)



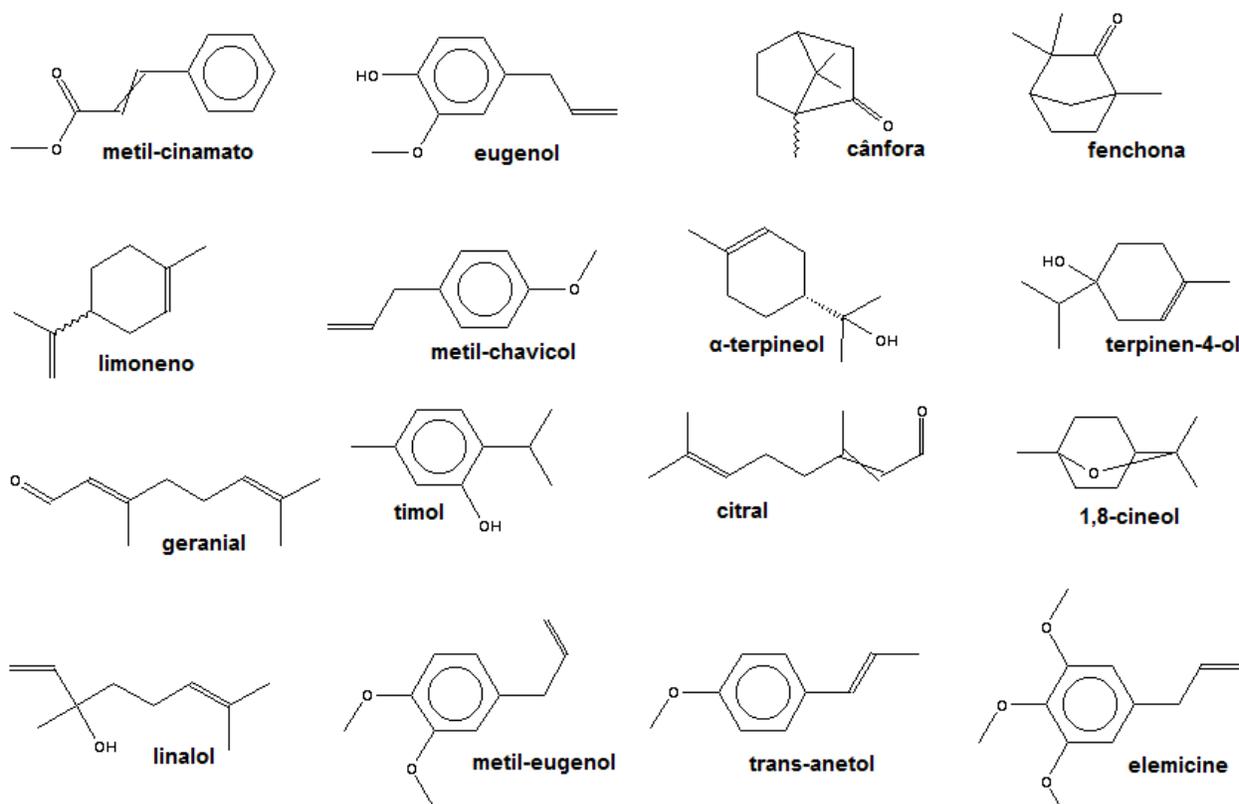
Cultivado no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Estudos fitoquímicos sobre esta planta relataram a presença de quimiotipos da espécie em decorrência das diferenças qualitativas e quantitativas na composição química dos óleos essenciais obtidos de *O. americanum*. O óleo essencial do quimiotipo da África, Ilhas Comodoro e Congo Francês possuem como constituinte majoritário metil-cinamato, enquanto que o óleo de plantas que crescem nos EUA e Nigéria apresentou teores elevados de eugenol, e o óleo de plantas da Somália, Zimbabwe e Índia tem a cânfora como constituinte principal. Outros quimiotipos de *americanum* contêm, principalmente, fenchona, limoneno, metil-chavicol e α -terpineol (SILVA et al, 2003; KHALID, 2006; UPADHYAY et al 1991; PADALIA et al, 2013) (Figura 5).

Matasyoh et al (2006) relataram a presença do quimiotipo de *O. americanum* terpinen-4-ol no oeste do Kenya, e o óleo essencial obtido apresentou coloração amarelo pálido. Este quimiotipo parece ter sido observado no Togo.

Carovic´-Stanko et al (2010) ao avaliarem a composição química do *O. americanum* obtido na Alemanha, constataram que o constituinte que apresentou maior concentração foi o geranial.

Figura 5 – Substâncias predominantes encontradas nos óleos essenciais dos diferentes quimiotipos de *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum selloi*



2.6.2 *Ocimum gratissimum*

Ocimum gratissimum é popularmente conhecido como alfavaca ou manjeriço. *O. gratissimum* é classificado em três quimiotipos através da concentração de timol, eugenol e citral (HILTUNEN e HOLM, 2005) (Figura 6). A espécie tipo eugenol é facilmente distinguível pelo aroma picante de cravo, que lembra o aroma de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Tumb) sendo conhecida como alfavaca-cravo (Figura 5) (JIROVETZ et al, 2003; FRANCO et al, 2007).

Figura 6 – *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo)

Cultivado no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As folhas de alfavaca-cravo são usadas popularmente na forma de infusão para tratamento de resfriados e como diurético (DUARTE et al 2007). Estudos demonstraram uma potencial atividade anestésica, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana contra bactérias e fungos (FRANCO et al 2007; PEREIRA e MAIA, 2007; DAMBOLENA et al, 2010; PRAKASH et al, 2011; PAULA-FREIRE et al, 2013). Em relação à atividade antimicrobiana, verificou-se que extratos hexânico e metanólico apresentaram sinergismo com antimicrobianos sintéticos contra cepas resistentes de *E. coli* e *S. aureus* (MATIAS et al, 2011). As atividades biológicas estão principalmente associadas à presença de eugenol.

Estudos realizados com a alfavaca-cravo indicaram alterações na composição e rendimento do óleo essencial de acordo com o horário da coleta e tempo de secagem.

Silva et al (1999) avaliaram a composição química dos óleos essenciais em diferentes horários de colheita, variando de 8h às 18h. O conteúdo de eugenol variou de 90,6 a 98%, de 11h as 13h, e a colheita às 12h apresentou maior concentração. A concentração de 1,8-cineol também teve variação com maior concentração nas coletas realizadas às 8h, 15h e 17h.

Luz et al (2009) realizaram um estudo para verificar a influência do horário de colheita e tempo de secagem e verificaram que não ocorreu influência significativa no teor de constituintes com o horário de colheita. No entanto, a secagem diminuiu os teores de eugenol e metil-chavicol e aumentou as concentrações de linalol e 1,8 cineol.

Borges et al (2012) verificaram uma maior concentração de eugenol na planta fresca, contudo, a planta seca apresentou maior teor de óleo essencial.

2.6.3 *Ocimum selloi* Benth

Ocimum selloi Benth. é conhecida como “elixir paregórico” nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, e como “anis” ou “alfavaquinha” em Minas Gerais (NASCIMENTO et al, 2011)(Figura 7). Popularmente, suas folhas são utilizadas em afecções gastrointestinais.

Atualmente, já foram relatados diferentes quimiotipos da espécie de acordo com a concentração de substâncias majoritárias presentes no óleo essencial. Martins et al (1997) relataram a existência de dois quimiotipos de espécies coletadas no estado de Minas Gerais – uma coletada em Viçosa e outra em Tiradentes – que apresentaram como constituintes majoritários metil-chavicol e metil-eugenol, respectivamente. Moraes et al (2002) identificaram uma espécie coletada no estado de São Paulo que apresentou como constituinte majoritário o trans-anetol, substância

responsável pelo aroma de anis. David et al (2006) identificaram um quimiotipo cuja substância majoritária é elemicina. Nascimento et al (2011), em um estudo conduzido na Bahia, identificaram um quimiotipo diferente dos relatados, com concentrações elevadas de eugenol e 1,8-cineol.

Figura 7 – *Ocimum selloi* (alfavaca-anis)



Cultivado no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As atividades biológicas apresentadas por *Ocimum selloi*, podem estar correlacionadas com o quimiotipo. *O. selloi* tipo metil-chavicol apresentou redução de sintomas e dor visceral associada com a diarreia e espasmos intestinais (FRANCA et

al, 2008). A espécie pertencente ao quimiotipo trans-anetol apresentou atividade antifúngica contra *Candida spp.*, sendo a *C. parapsilosis* a mais susceptível (VIEIRA et al, 2014). *O. selloi* com concentração elevada de eugenol, apresentou atividade contra *S. aureus*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais das espécies de *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a fim de verificar uma possível aplicabilidade antisséptica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Identificar o quimiotipo das espécies de *Ocimum* estudadas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi* pelo método de difusão em ágar e microdiluição em caldo, contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As espécies de *Ocimum* utilizadas neste estudo foram coletadas no mês de fevereiro de 2014, no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As folhas de *Ocimum americanum* e *O. selloi* foram coletadas às 8 horas da manhã, e as folhas de *O. gratissimum* foram coletadas às 11 horas. As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Leopoldo Krieger, sob os números: CESJ 56684- *Ocimum americanum* L.; CESJ 48248- *Ocimum gratissimum* L. e CESJ 50050-*Ocimum selloi*.

4.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram extraídos no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, sob a orientação do Professor Dr. Daniel Sales Pimenta. As amostras (400 g) de material fresco foram extraídas por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado, durante duas horas. O rendimento do óleo foi calculado em relação ao peso do material fresco.

4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS)

Os óleos essenciais foram analisados por CG-MS no laboratório de Análise de Aromas da UFRJ, sob a orientação da professora Dra. Cláudia M. Rezende. Os OEs foram diluídos em diclorometano a 1% (v/v) e, em seguida, 1,0 µL da solução obtida foi injetada, com divisão de fluxo (1:20) em um cromatógrafo a gás, modelo Agilent 6890N equipado com detector de massas Agilent 5973N (CG-MS), coluna capilar tipo DB-5. O hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/minuto. A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C em uma taxa de aquecimento de 3 °C/ minuto. O detector de massa foi operado no modo de ionização de elétrons (70 eV). A composição percentual dos compostos foi obtida por normalização, integração das áreas dos picos cromatográficos.

A identificação das substâncias foi realizada por comparação dos espectros de massas experimental com o da base Pherobase (2014) e NIST databases (NIST Chemistry Webbook, 2013), bem como de seu índice de retenção linear, calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963), após injeção de uma série homóloga de n-alcenos (C₇ – C₂₆), nas mesmas condições supracitadas e comparadas com as informações da literatura (ADAMS, 2007).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi*

4.4.1 Micro-organismos padrões

Para os testes de avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas duas cepas de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, e duas cepas de bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Escherichia coli* ATCC 8739, adquiridas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz.

4.4.2 Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão do inóculo foi padronizada pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010) com algumas modificações. Foi realizado um repique do micro-organismo em tubo de ensaio contendo meio de cultura (TSA) inclinado. O tubo foi incubado por 16 horas em estufa (FANEN®) a 35 ± 2 °C – após o período de incubação as células foram suspensas em solução fisiológica estéril, para obtenção de transmitância 25% a 580nm medida em espectrofotômetro modelo SP 432 (FENTO®).

A partir da suspensão preparada com 25% de transmitância foram realizadas diluições decimais seriadas utilizando solução fisiológica estéril como diluente, até a diluição 10^{-7} . Das três últimas diluições, ou seja, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , foi transferido 1 mL para placa de *Petri* e em seguida adicionado 20 mL do meio TSA (procedimento realizado em duplicata). As placas foram incubadas por 24 horas. Após este período foi realizada a contagem das colônias em cada placa, sendo determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL da suspensão microbiana. Desta maneira foi determinada que a transmitância de 25% apresentou 10^8 UFC/mL, sendo a diluição utilizada para a realização dos testes de atividade antibacteriana.

4.4.3 Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em ágar

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi empregada metodologia descrita na International Pharmacopoeia (WHO, 2013). Placas de *Petri* foram preparadas com duas camadas distintas de ágar Difco™ Antibiotic Medium 1, a inferior possuindo 15 mL de ágar estéril e a superior contendo 5 mL de ágar inoculado com 1% do inóculo, contendo 10^8 UFC/mL. Sobre a superfície do meio inoculado foi inserido um cilindro estéril com 10 mm de altura, 8 mm de diâmetro externo e 6 mm

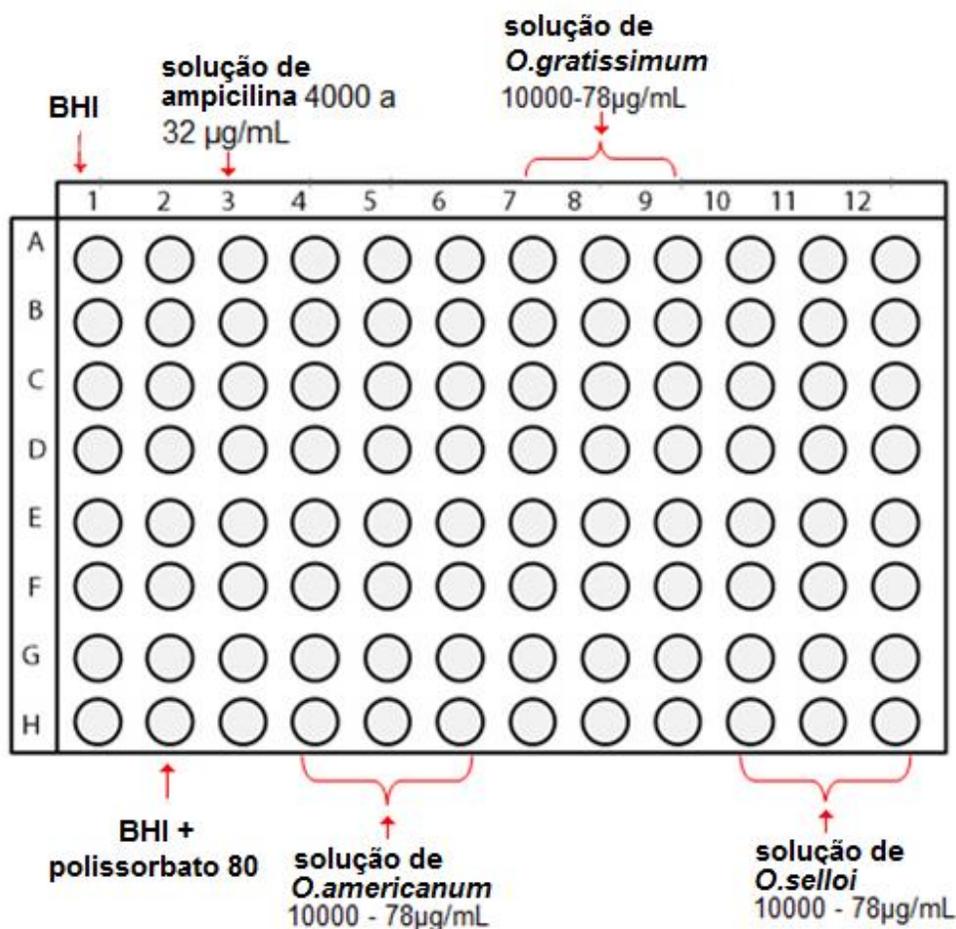
de diâmetro interno. No interior do cilindro foi adicionado 20 µL do óleo essencial a ser testado. Discos de papel impregnados com tetraciclina (30 µg) - Laborclin® - foi utilizado como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata.

Após incubação das placas por cerca de 24h, em estufa 35 ± 2 °C, foi realizada a medida dos halos de inibição de crescimento em milímetros. O resultado foi mensurado considerando: > 15 milímetros zona de inibição fortemente inibidora; 10-15 mm zona de inibição moderadamente inibitória e <10 mm não inibitório (CAROVIC-STANKO et al, 2010).

4.4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A CIM foi determinada utilizando o método de microdiluição descrito pela Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2006. Foi utilizada uma microplaca estéril de 96 poços com fundo em U, em todos os poços foram adicionados 100 µL de caldo BHI. As colunas 1, 2 e 3 foram destinadas a controle de esterilidade do meio, controle de crescimento do micro-organismo e controle positivo (ampicilina), respectivamente. Para a análise do óleo em triplicata foram destinadas as colunas: 4, 5 e 6 para *O. americanum*; 7, 8 e 9 para *O. gratissimum*; 10,11 e 12 para *O. selloi* (Figura 8).

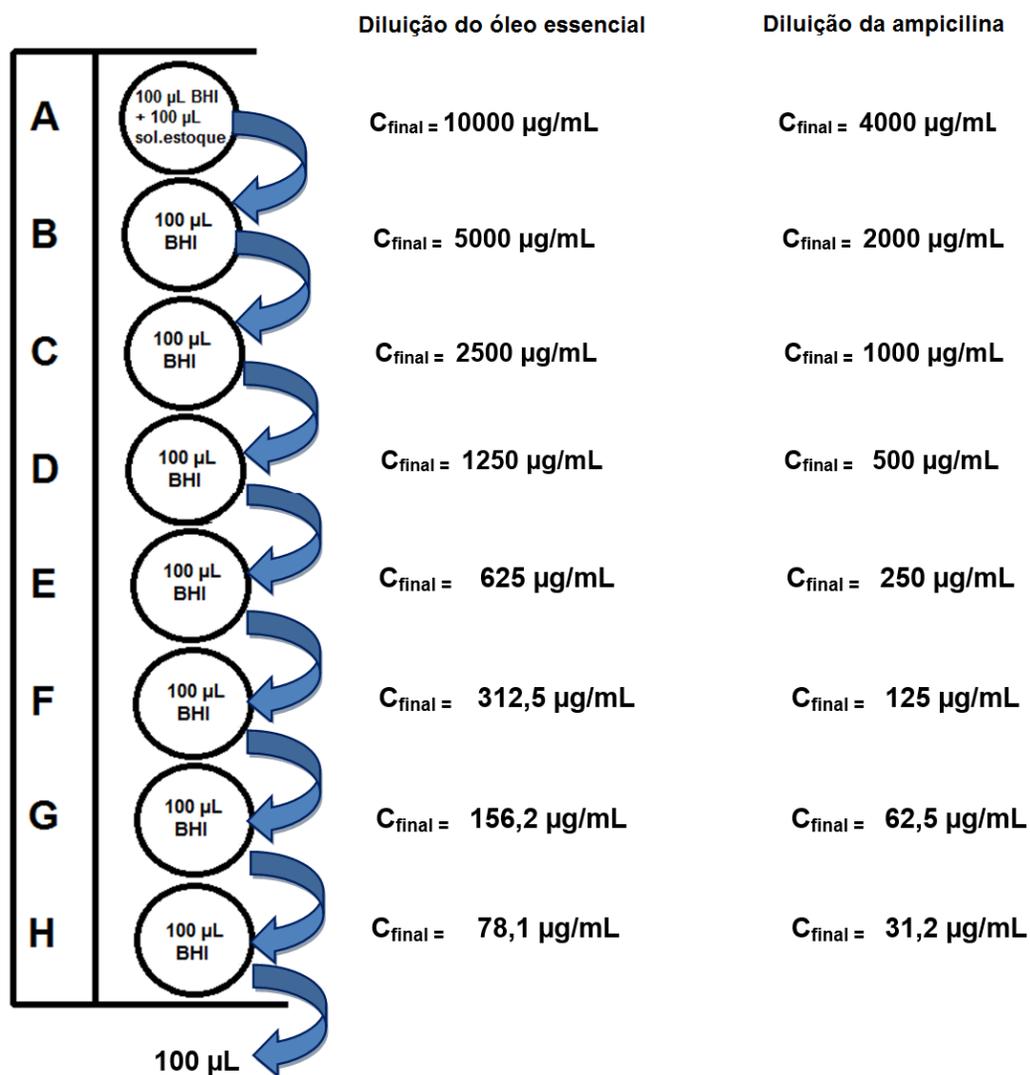
Figura 8 – Esquema da distribuição dos testes na análise da CIM em placa de 96 poços.



Para a adição dos óleos essenciais foi necessário realizar uma prévia diluição dos óleos em caldo BHI estéril contendo 0,2% de polissorbato 80, obtendo-se uma solução estoque com concentração de 20 mg/mL. Diluições sucessivas a partir da solução estoque foram realizadas nas microplacas, obtendo concentrações de 10000 a 78 µg/mL. Assim, foram transferidos 100 µL da solução estoque para os poços da fileira A (A3-A12). Depois de homogeneizar a solução estoque com o caldo BHI, retirou-se 100 µL e transferiu-se para o poço da fileira B, e assim sucessivamente, até o poço da fileira H, onde foram descartados os 100 µL restantes (Figura 9). Desta maneira, foram testadas as concentrações de 10000 µg/mL a 78 µg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado para a adição de ampicilina. No entanto, esta foi previamente preparada com água destilada estéril a uma concentração de 8,0 mg/mL.

Figura 9 – Esquema de diluições sucessivas nos poços no teste de microdiluição em placas



Para adicionar a concentração apropriada do inóculo, realizou-se a diluição da suspensão bacteriana padronizada em solução fisiológica estéril, a fim de obter uma

concentração de 10^5 UFC/mL, e em seguida foram adicionados 20 μ L nos poços das colunas 2 a 12.

Em seguida, a microplaca foi incubada de acordo com as condições necessárias para o crescimento dos micro-organismos teste. Após o período de incubação a inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20 μ L de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) (5% v/v em água destilada), foram observados poços com alteração da coloração para vermelho, indicativo de crescimento bacteriano. Poços em que não houve alteração da cor correspondeu à ausência de crescimento microbiano.

Para determinar a concentração bactericida mínima – menor concentração do antibiótico que mata 99,9% do inóculo original (CBM) – após a análise da CIM foi realizada uma subcultura de cada microplaca, adicionou-se 10 μ L dos poços em que houve inibição do crescimento bacteriano em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas. A concentração bactericida mínima foi, então, observada pela ausência ou presença de crescimento bacteriano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS)

As folhas frescas das espécies estudadas foram submetidas ao processo de hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais e foram obtidos rendimento de 0,37%, 0,53% e 0,60% para *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi*, respectivamente. O rendimento foi significativo, sendo que a maioria das espécies vegetais apresentam em média 0,1% (CUNHA et al, 2004).

A composição química dos óleos essenciais foi avaliada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS). O estudo do perfil químico das espécies facilita a identificação dos quimiotipos existentes e conseqüentemente possibilita correlacionar com a atividade biológica. Uma vez que o número e a diversidade de constituintes químicos presentes nas essências conduzem, também, à atividade farmacológica (CUNHA et al, 2004; COSTA, 2002).

No óleo essencial de *O. americanum* foram identificados quinze compostos (Figura 10). Os constituintes majoritários foram linalol (29,0%), 1,8-cineol (28,9%) e cânfora (14,7%), sendo considerado do tipo linalol – 1,8-cineol – cânfora, Tabela 1. A composição química encontrada nesta espécie foi semelhante a encontrada por Sanson (2009), sendo observados a presença de linalol (30,3%), 1,8-cineol (19,91%) e cânfora (14%). Acredita-se que esta espécie estudada seja um provável híbrido de *O. basilicum* x *O. americanum*, correspondendo a uma forma intermediária das duas espécies (SANSON, 2009).

Figura 10 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie *O. americanum* obtido por hidrodestilação

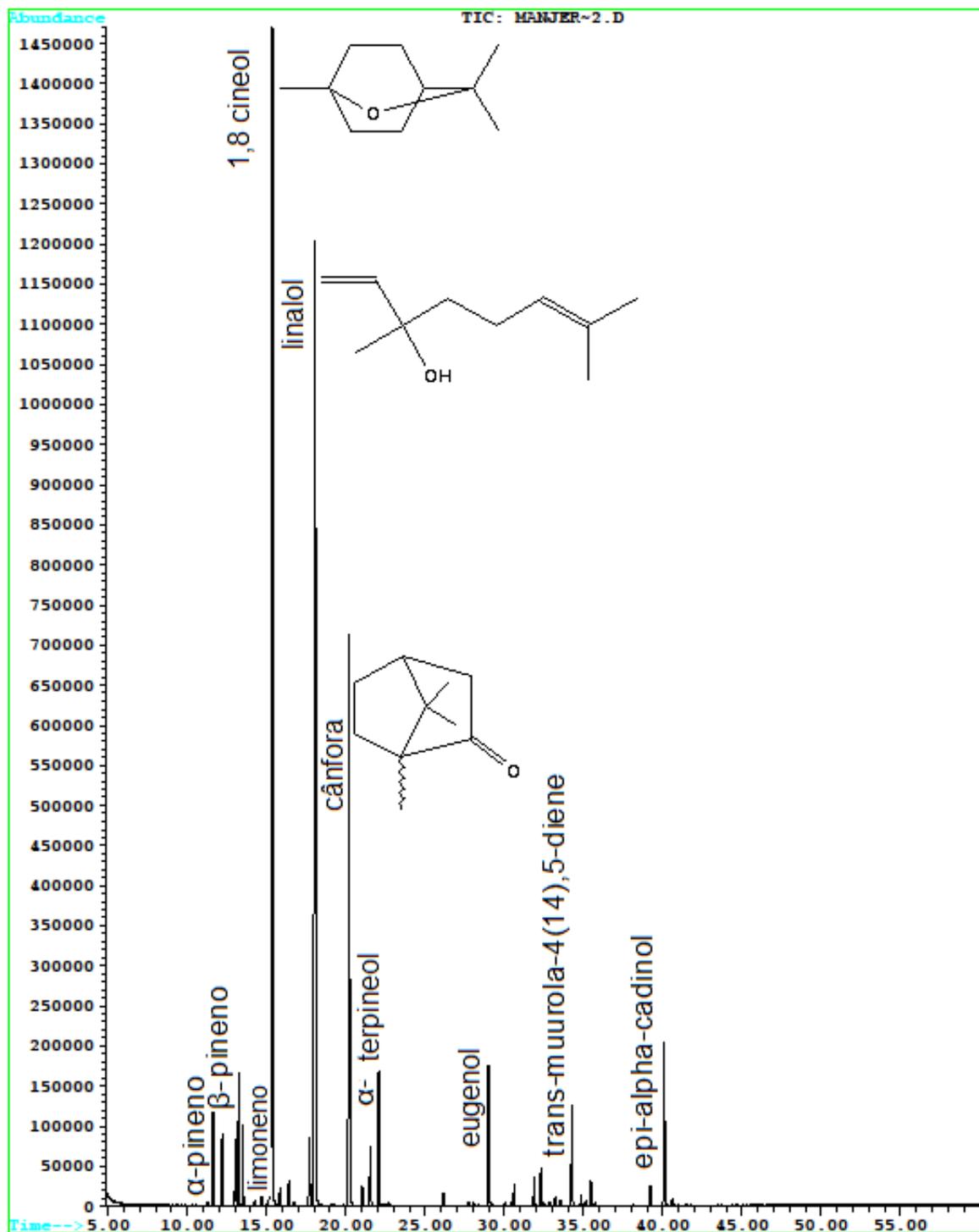


Tabela 1 – Composição química obtida do óleo essencial das folhas de *O. americanum* obtido por CG-MS

Pico	IRL _{cal.}	IRL _{lit.}	Substância	Concentração (%)	Classificação
1	938	939	α-pineno	2,1	Monoterpeno
2	954	954	Campfeno	1,5	Monoterpeno
3	977	975	β-tujeno	1,4	Monoterpeno
4	982	979	β-pineno	2,9	Monoterpeno
5	990	991	Mirceno	1,6	Monoterpeno
6	1032	1029	Limoneno	2,5	Monoterpeno
7	1036	1031	1,8-cineol	28,9	monoterpeno oxigenado
8	1092	1087	Fenchona	1,9	monoterpeno oxigenado
9	1101	1098	Linalol	29,0	monoterpeno oxigenado
10	1153	1146	cânfora	14,7	monoterpeno oxigenado
11	1183	1177	terpinen-4-ol	1,4	monoterpeno oxigenado
12	1196	1189	α-terpineol	3,1	monoterpeno oxigenado
13	1356	1359	Eugenol	3,2	Fenilpropanóide
14	1492	1493	trans-muuro-la-4(14),5-diene	2,2	Sesquiterpeno
15	1650	1646	epi-α-cadinol	3,6	sesquiterpeno oxigenado

IRL_{cal.}: Índice de Retenção Linear experimental

IRL_{lit.}: Índice de Retenção Linear literatura

A identificação dos compostos do óleo essencial de *O. gratissimum* levou à seis compostos (Figura 11), dentre os quais o eugenol (75,5%) que foi determinado como o constituinte majoritário (Tabela 2). Segundo Pereira e Maia (2007), o teor de eugenol no óleo essencial de alfavaca cravo é muito variável, que depende de uma série de fatores, como, por exemplo, da região geográfica onde a planta foi colhida (PEREIRA e MAIA, 2007). De acordo com Silva et al (1999), a alfavaca cravo possui maior teor de eugenol quando coletada de 11 às 13h, variando entre 90,6 a 98%. O resultado encontrado neste trabalho foi inferior a descrita pelos autores citados, porém apresentou um teor considerável de eugenol na composição do óleo essencial.

Figura 11 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie *O. gratissimum* obtido por hidrodestilação

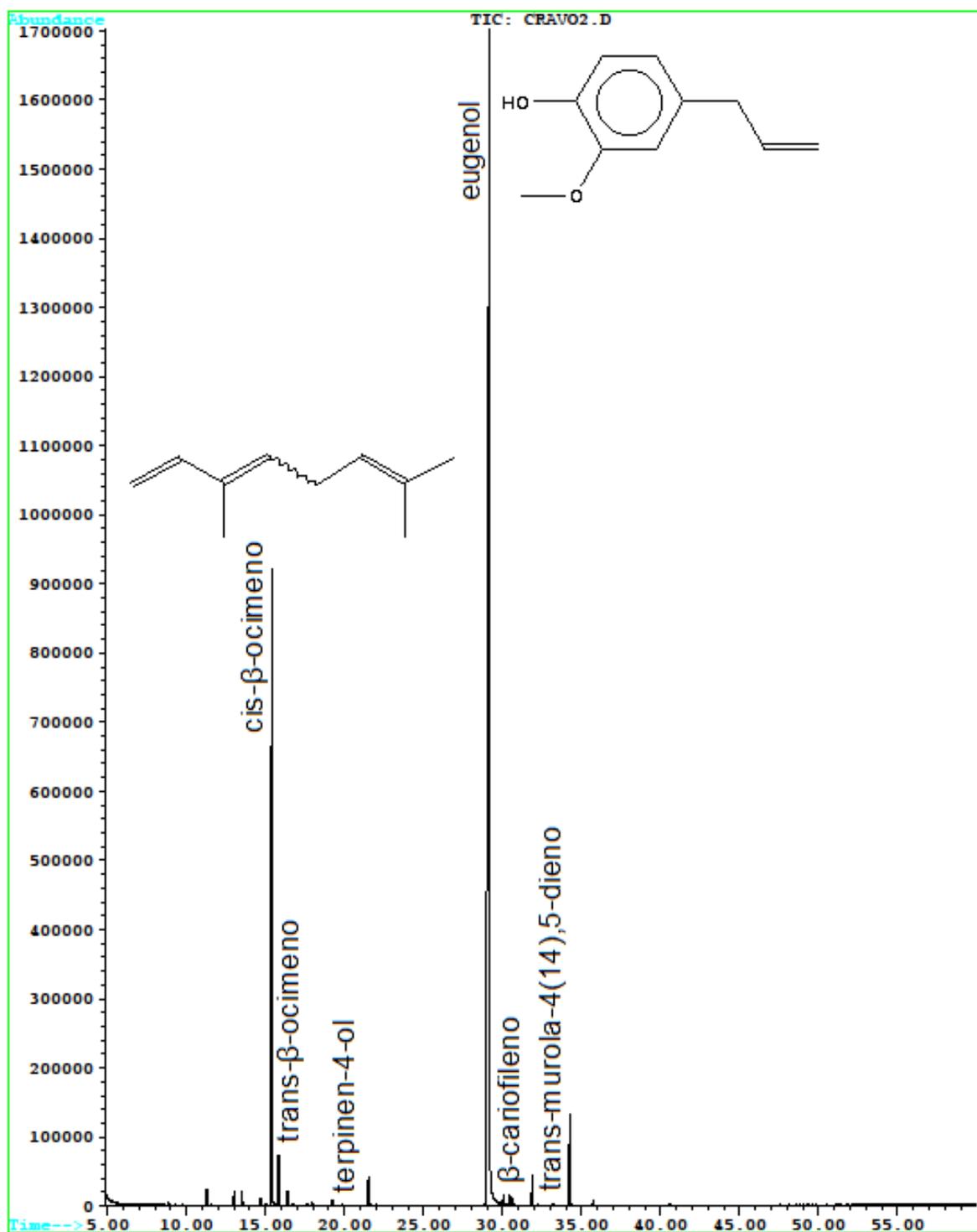


Tabela 2 – Composição química obtida do óleo essencial das folhas de *O. gratissimum* obtido por CG-MS

Pico	IRL _{cal.}	IRL _{lit.}	Substância	Concentração (%)	Classificação
1	1036	1037	cis- β -ocimeno	18,7	Monoterpeno
2	1048	1050	trans- β -ocimeno	1,3	Monoterpeno
3	1183	1177	terpinen-4-ol	0,8	Monoterpeno oxigenado
4	1360	1359	Eugenol	75,5	Fenilpropanóide
5	1431	1419	β -cariofileno	0,9	Sesquiterpeno
6	1492	1494	trans-murolo-4(14),5-dieno	3,5	Sesquiterpeno

IRL_{cal.}: Índice de Retenção Linear experimental

IRL_{lit.}: Índice de Retenção Linear literatura

A determinação da composição do óleo essencial de *O. selloi* estudado levou à identificação de dois constituintes (Figura 12), metil-chavicol (99,09%) e biciclogermacreno (Tabela 3). Costa et al (2009), avaliaram a variação na composição química do óleo essencial das folhas secas de *Ocimum selloi*, inteiras e moídas sob diferentes períodos de armazenamento, e verificou que o constituinte majoritário foi o metil-chavicol. Foi observado também um comportamento de decréscimo do teor ao longo do tempo de armazenamento e aumento principalmente da concentração de biciclogermacreno. Foi encontrado um maior teor de metil-chavicol nas folhas frescas inteiras e moídas, com concentração de 93,9% e 97,9%, respectivamente.

Figura 12 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da espécie *O. selloi* obtido por hidrodestilação

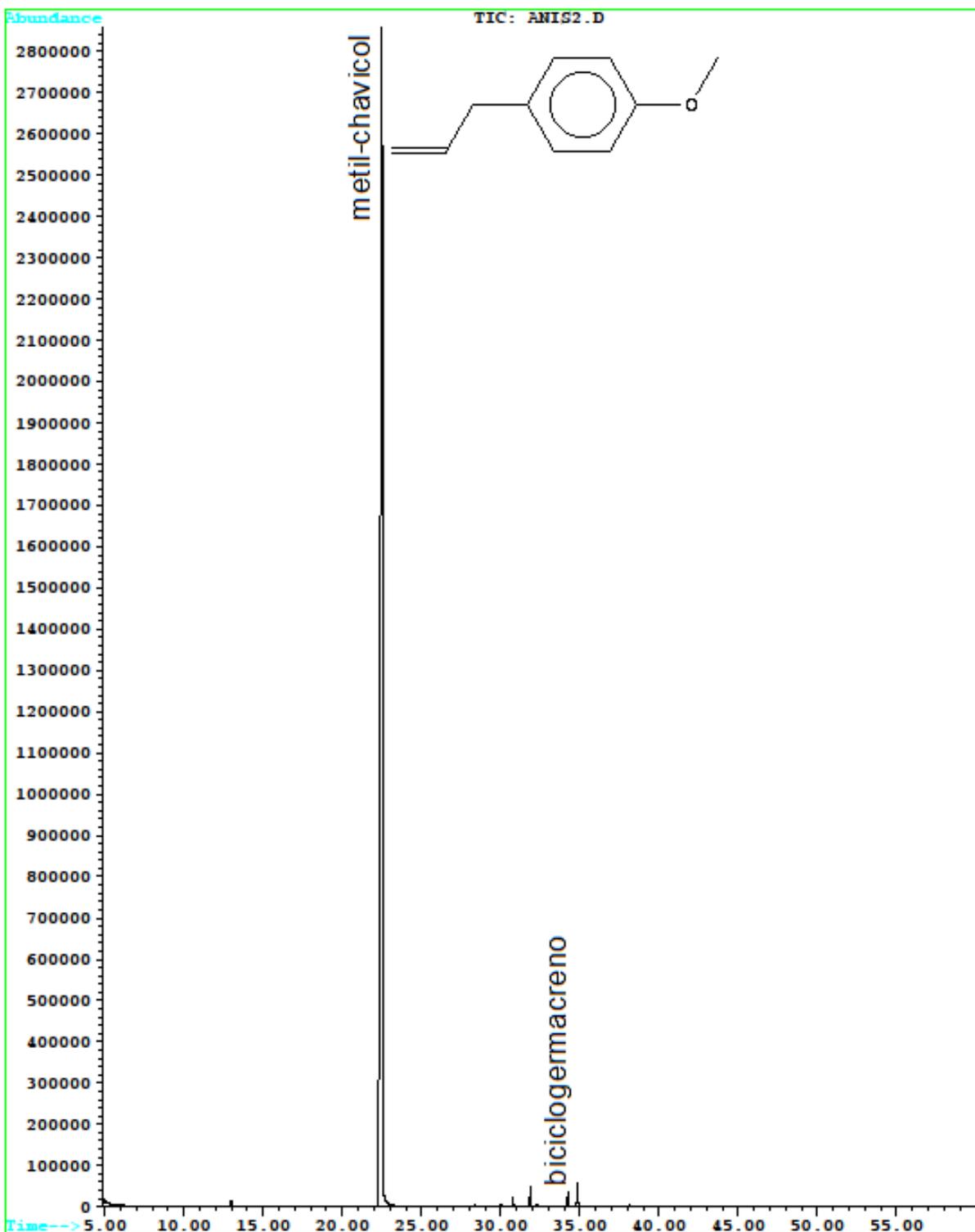


Tabela 3 – Composição química obtida do óleo essencial das folhas de *O. selloi* obtido por CG-MS

Pico	IRL _{cal.}	IRL _{lit.}	Substância	Concentração (%)	Classificação
1	1204	1196	metil-chavicol	99,09	Fenilpropanóide
2	1508	1500	Biciclogermacreno	0,91	Sesquiterpeno

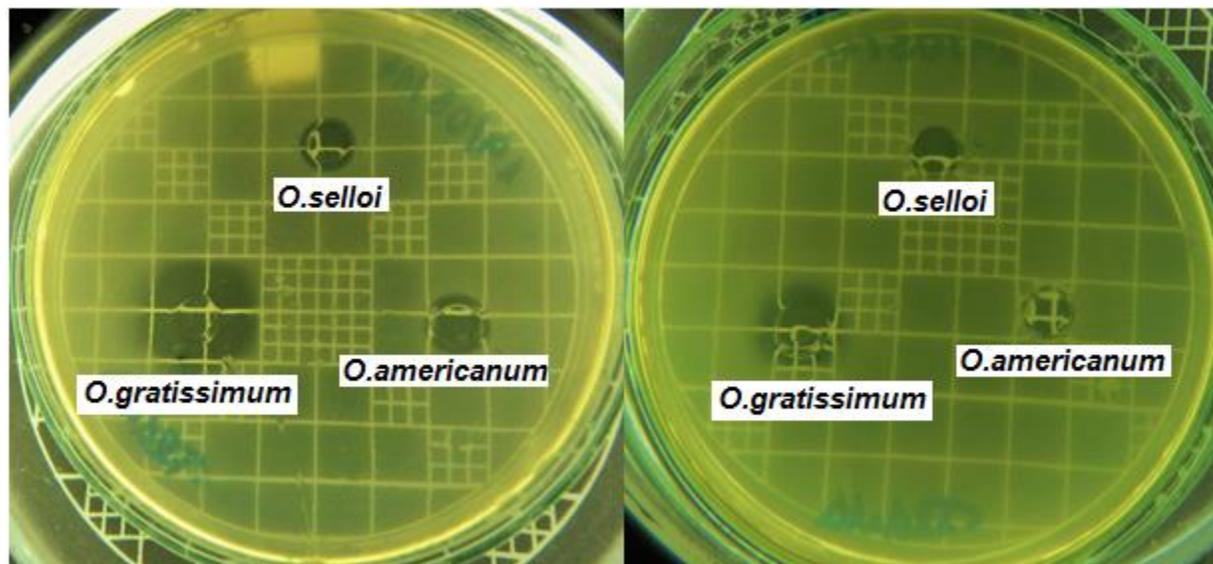
IRL_{cal.}: Índice de Retenção Linear experimental

IRL_{lit.}: Índice de Retenção Linear literatura

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar utilizando cilindros de aço, demonstrou que todos os óleos essenciais formaram halo de inibição de crescimento contra as bactérias Gram-positivas testadas (Figura 13), sendo os halos de inibição mais relevante frente *S. aureus*. O óleo essencial de *O. gratissimum* foi o que formou maior halo de inibição em relação aos demais óleos testados, enquanto o óleo de *O. selloi* foi o que apresentou menor halo.

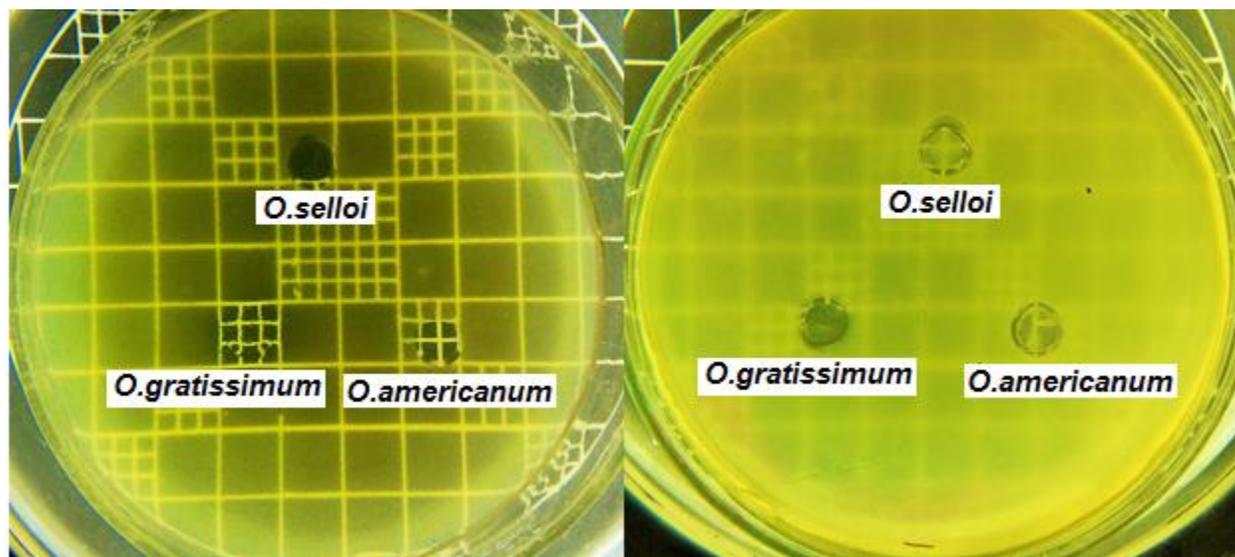
Figura 13 – Atividade antibacteriana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar contra bactérias Gram-positivas



Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* (da esquerda para direita) na parte superior da placa encontra-se o resultado da difusão do óleo de *O. selloi*, na parte inferior das placas encontra-se os óleos de *O. gratissimum* e *O. americanum* (da esquerda para direita)

Em relação a avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas, os óleos essenciais formaram halo de inibição de crescimento contra *E. coli*. Os óleos de *O. americanum* e *O. selloi*, foram inativos para *P. aeruginosa*, não formando halo de inibição. O óleo de *O. gratissimum* formou halo de inibição de crescimento para ambas bactérias testadas, sendo mais evidente contra *E. coli* (Figura 14).

Figura 14 – Atividade antibacteriana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar contra bactérias Gram-negativas



Escherichia coli e *Pseudomonas aeruginosa* (da esquerda para direita) na parte superior da placa encontra-se o resultado da difusão do óleo de *O. selloi*, na parte inferior das placas encontra-se os óleos de *O. gratissimum* e *O. americanum* (da esquerda para direita).

Os resultados do teste de difusão em ágar com as medidas do tamanho dos halos de inibição de crescimento estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Inibição de crescimento bacteriano dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi* frente a diferentes micro-organismos pelo método de difusão em ágar

Microorganismo	Diâmetro dos halos de inibição (mm)			
	<i>O. americanum</i>	<i>O. gratissimum</i>	<i>O. selloi</i>	tetraciclina (30µg)
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	14,33 ± 1,15	21,33 ± 1,15	9,33 ± 0,58	29,66 ± 1,15
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	8,33 ± 0,58	13,66 ± 1,15	7,66 ± 0,58	25,33 ± 1,52
<i>E.coli</i> ATCC 8739	8,33 ± 0,58	12,67 ± 0,58	7,66 ± 0,58	23,33 ± 0,58
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 15442	-	8,67 ± 0,58	-	18 ± 0,58

O teste foi realizado em triplicata. Os valores representam a média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm) ± SD (desvio padrão); (-) Ausência de halo de inibição.

Segundo o critério de avaliação da ação antimicrobiana relacionada ao tamanho do halo de inibição de crescimento estabelecido por Carovic'-Stanko et al. (2010), o óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou atividade fortemente inibitória para *S. aureus*, atividade moderada para *E. coli* e *S. epidermidis* e, não inibitória para *P. aeruginosa*. O óleo de *O. americanum* apresentou apenas atividade moderada frente a *S. aureus*, o óleo de *O. selloi* não apresentou atividade para nenhuma das bactérias testadas.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os dados encontrados na literatura. No entanto, as variações no diâmetro do halo de inibição podem estar relacionadas as diferentes concentrações de componentes dos óleos essenciais dos quimiotipos de *Ocimum*.

Em estudo realizado por Carovic'-Stanko et al. (2010) com o óleo essencial de *O. americanum* foram descritos halos de inibição com diâmetros superiores aos encontrados nesta pesquisa, para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* O157:H7. Contudo, através da análise por CG-MS, foi possível verificar que as espécies estudadas não pertenciam ao mesmo quimiotipo. No estudo de Carovic'-Stanko, a espécie pertence ao quimiotipo geranial e neste estudo a espécie de *O. americanum* é do quimiotipo linalol -1,8-cineol - cânfora.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. selloi*, foi descrita por Farago et al (2004) e Nascimento et al (2011). Farago et al (2004) testou os óleos de *O. selloi*, pertencente ao quimiotipos metil-chavicol e eugenol, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A atividade antibacteriana foi verificada contra *S. aureus* e *E. coli*, os óleos essenciais formaram halo de inibição do crescimento com cerca de 9 mm e, ausência de halo para *P. aeruginosa*. No estudo realizado por Nascimento et al (2011) a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. selloi* quimiotipo eugenol apresentou halo de inibição de 8 mm para *S. aureus* ATCC 25923 e ausência de halo para *E. coli* ATCC 25922.

Franco et al (2007) testaram o óleo essencial de *O. gratissimum* quimiotipo eugenol contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC

10708 e *Escherichia coli* O:158, os halos de inibição de crescimento foram 22, 20 e 25 mm, respectivamente.

Os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar demonstram que as bactérias Gram-positivas foram mais susceptíveis a inibição do crescimento pelos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas avaliadas.

As bactérias Gram-negativas são mais resistentes à atividade dos óleos essenciais e seus componentes. A parede celular de bactérias Gram-negativas não permite a entrada de moléculas hidrofóbicas tão prontamente como bactérias Gram-positivas. Assim, os óleos essenciais são menos capazes de afetar o crescimento celular das bactérias Gram-negativas (NAZZARO et al, 2013).

A técnica de difusão em ágar para avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais constitui um ensaio qualitativo. No entanto, possui vantagem limitada à geração de dados preliminares, devido à natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas, uma vez que essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar (NASCIMENTO et al, 2007).

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Através da técnica de microdiluição foi possível obter dados quantitativos da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais frente aos micro-organismos empregados no estudo. A técnica de microdiluição em placa de Elisa com fundo em U, permitiu visualização nítida do crescimento bacteriano facilitando a leitura dos resultados, após a adição de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). O TTC é um corante de oxidação-redução utilizado para detectar o crescimento microbiano; é incolor na forma oxidada, indicando ausência de micro-organismo, e, na presença de micro-organismo, é reduzido formando o trifenil formazan, assumindo uma coloração avermelhada.

Considerando a natureza lipofílica do óleo essencial, este foi diluído em meio de cultura BHI (Difco®) contendo 0,2% de polissorbatos 80, obtendo uma

concentração inicial do óleo essencial de 20 mg/mL. Afim de verificar que a concentração do polissorbato não interferiu no crescimento bacteriano foi testado emulsificador + caldo BHI + inóculo, na coluna 2, verificando que não houve interferência no crescimento de nenhum dos microorganismos testados, Apêndice A.

Diluições sucessivas da solução estoque foram realizadas nas microplacas contendo caldo BHI, iniciando no primeiro poço de cada fileira, assim as amostras foram testadas nas concentrações de 10000 µg/mL a 78 µg/mL. Os resultados da CIM e CBM encontram-se na Tabela 5.

A ampicilina é uma penicilina que possui atividade antimicrobiana ampliada, é bactericida tanto para Gram-positivas quanto Gram-negativas. A CIM é, em média de 1,5 µg/mL. Apesar da maioria das cepas de *E. coli* ter sido altamente sensível à ampicilina quando lançada em 1960, cerca de 30 a 50% são atualmente insensíveis. A maioria das cepas de *Pseudomonas* exibe resistência a essa penicilina (GOODMAN e GILMAN, 2007). A concentração de ampicilina como controle positivo variou de 32 a 4000 µg/mL. A concentração de 32 µg/mL corresponde à primeira faixa de resistência estabelecida pela CLSI.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos óleos essenciais de *O.americanum*, *O.gratissimum* e *O.selloi*

Microorganismo	<i>O. americanum</i>		<i>O.gratissimum</i>		<i>O.selloi</i>		Ampicilina
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	625	1250	625	1250	2500	5000	< 32
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	5000	5000	625	1250	–	–	< 32
<i>E.coli</i> ATCC 8739	5000	5000	625	1250	–	–	32
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 15442	–	–	5000	>10000	–	–	2000

O teste de microdiluição evidenciou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais testados frente as bactérias prevalentes em úlceras de decúbito. O óleo

essencial de *Ocimum americanum* apresentou melhor atividade antibacteriana para bactérias *S. aureus*, apresentando CIM de 625 µg/mL, fraca atividade para *E. coli* CIM de 2500 µg/mL e inativo para *P. aeruginosa*. O óleo de *O. selloi* não apresentou atividade significativa frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas. A melhor atividade foi verificada por *O. gratissimum* frente as bactérias testadas apresentando CIM de 625 µg/mL e CBM 1250 µg/mL para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. No entanto, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. gratissimum* contra *P. aeruginosa* não foi relevante.

Juiz (2013) avaliou através do método de microdiluição determinou a CIM e CBM do óleo de *O. americanum* contra *S. aureus* CCMB262 (resistente a estreptomicina e dihidroestreptomicina), *S. aureus* CCMB263 (resistente a novobiocina) e *E.coli*. A CIM e CBM foi de 1,56 e 50 mg/mL para o *S. aureus* CCMB262. Para *S.aureus* CCMB263 a CIM e CBM foi de 12,5 e 50 mg/mL. Os resultados para *E. coli* foi de 50 e 100 mg/mL. Todos os resultados apresentados foram superiores aos encontrados neste estudo, podendo a diferença ser atribuída ao quimiotipo. O autor em seu estudo utilizou o *O. americanum* metil-cinamato, diferente do quimiotipo definido nesta pesquisa.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. gratissimum* foi a mais relevante, dentre os demais óleos testados, contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. A CIM encontrada para *E. coli* ATCC8739, foi semelhante a obtida com o extrato metanólico em uma pesquisa realizada por Djeussi et al, 2013. Prasannabalaji et al (2012) também avaliou a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *O. gratissimum*, contra cepas de isolados clínicos, encontrando CIM de 0,078 e 0,625 mg/mL para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. No entanto, em ambas as pesquisas não foi relatado a qual quimiotipo pertencia a espécie.

Martini (2011) em seu estudo avaliou a CIM pelo método de diluição em caldo do óleo essencial de *O. selloi* quimiotipo metilchavicol contra: *Candida albicans* tipo B ATCC 36802, *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB9393), *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus Níger* e *Trychophyton rubrum*. A CIM encontrada foi de: 625 µg/mL para *S. aureus* e *C. albicans*; 1250 µg/mL para *L. casei*, *S. mutans* e *A. niger*; e > 2500 µg/mL para *E. coli*. O resultado foi semelhante ao

encontrado neste trabalho para *O. selloi* quimiotipo metil-chavicol, demonstrando apresentar ausência de atividade antimicrobiana. No entanto, para o trabalho realizado por Martini (2011) a atividade contra *S. aureus* foi mais promissora, contudo, as cepas trabalhadas nas pesquisas foram diferentes.

A atividade antibacteriana de uma espécie vegetal pode variar com o método de extração, devido a variação da composição química do extrato obtido. O mecanismo de ação antibacteriano é dependente de alguns componentes. Os terpenóides causam uma perturbação na membrana plasmática. Os fenilpropanóides possuem atividade antimicrobiana relevante demonstrando um amplo espectro de atividade (NAZARRO et al, 2013).

A composição do óleo obtido de *O. selloi* apresentou alta concentração de fenilpropanóides, porém não obteve atividade antibacteriana frente as bactérias testadas.

O óleo de *Ocimum gratissimum* destacou-se por apresentar atividade frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, muitos autores consideram a capacidade antimicrobiana desta espécie a presença de eugenol. A presença de eugenol tem atribuído ação antibacteriana e antifúngica em extratos e óleos essenciais de espécies vegetais (COSTA, 2002; CUNHA et al, 2004). O eugenol altera a membrana microbiana, afeta o transporte de íons e ATP e muda o perfil de ácidos graxos de diferentes bactérias (NAZARRO et al, 2013).

No entanto, não deve descartar a presença de sinergismo entre os compostos presentes no óleo de *Ocimum gratissimum*. Uma vez que o β -ocimeno possui atividade antimicrobiana e sinergismo com outros constituintes, e apresentou um teor significativo no óleo obtido (RODRIGUES et al, 2011). E, nos estudos realizados com o *O. selloi* quimiotipo eugenol, a atividade antibacteriana não apresentou diferença significativa quando comparado ao *O. selloi* quimiotipo metil-chavicol, utilizado neste estudo.

A resistência bacteriana tem sido atribuída a mecanismos de mutações nos alvos dos antibióticos, devido à terapia antimicrobiana irracional, consistindo em um importante problema de saúde pública, principalmente em relação a infecções nosocomiais, limitando as possibilidades terapêuticas e contribuindo para a existência

de cepas resistentes. Os metabólitos vegetais, exercem atividade protetora contra insetos, fungos e predadores. Desta forma, têm sido extensamente estudados para obtenção de novos agentes antimicrobianos. Dentre as substâncias vegetais os óleos essenciais vêm se destacando pela capacidade antisséptica.

Em relação às particularidades dos óleos essenciais, algumas pesquisas a respeito de sua composição mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo presente nos óleos, podendo provocar alterações na atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al, 2007). Isto pode ser observado ao comparar os resultados dos óleos essenciais do quimiotipos das espécies do gênero *Ocimum* avaliadas neste estudo com os dados de outras pesquisas.

O óleo de *O. americanum* quimiotipo linalol-1,8-cineol-cânfora avaliado neste estudo obteve melhor atividade antibacteriana do que o relatado pelo quimiotipo metil-cinamato. No entanto, o óleo de *O. selloi* quimiotipo metil-chavicol não apresentou diferença significativa quando comparado ao quimiotipo eugenol. Em relação a espécie de *O. gratissimum* quimiotipo eugenol, não foi possível correlacionar sua CIM com a de outras pesquisas, devido à ausência de dados químicos.

As pesquisas sobre atividade antimicrobiana têm sido dificultadas pela ausência de métodos padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos além de inviabilizar sua reprodutibilidade. Os métodos diferem largamente e fatores importantes que influenciam os resultados são freqüentemente negligenciados (NASCIMENTO et al, 2007).

Corroborando com os testes de atividade antimicrobiana de plantas medicinais, os resultados demonstraram atividade antibacteriana do óleo essencial de: *O. americanum* quimiotipo linalol-1,8-cineol-cânfora contra as bactérias Gram-positivas; *O. gratissimum* quimiotipo eugenol contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.

6. CONCLUSÃO

A obtenção dos resultados da análise da composição química dos óleos essenciais por CG-MS, permitiu a identificação do quimiotipo pertencente das espécies analisadas como: *O. americanum* linalol-1,8cineol-cânfora; *O. gratissimum* eugenol e *O. selloi* metil-chavicol.

O perfil químico dos óleos essenciais possibilitou correlacionar as atividades antimicrobianas com a presença dos componentes majoritários.

Verificou-se que o óleo de *O. americanum* foi eficaz para inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 12228 com CIM de 625 µg/mL.

O óleo de *O. gratissimum* foi o que apresentou atividade antimicrobiana mais relevante apresentando CIM de 625 µg/mL para *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *E. coli* ATCC 8739.

Desta maneira, os resultados indicaram uma atividade significativa do óleo essencial de *O. gratissimum* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas prevalentes em úlceras de decúbito.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O direcionamento de estudos pode ser útil para aplicabilidade do óleo como antibacteriano, destacando-se:

- avaliar o óleo essencial frente a bactérias anaeróbias prevalentes em úlceras de decúbito e isolados clínicos das lesões;
- verificar a atividade antimicrobiana do eugenol e dos demais componentes isolados e combinados a fim de identificar se há existência de sinergismo;
- associar o óleo essencial com antimicrobianos utilizados na clínica e avaliar se a atividade foi potencializada pela redução da Concentração Inibitória Mínima;
- analisar se os componentes do óleo apresentam atividade cicatrizante.
- propor uma formulação para contribuir para a cicatrização e antissepsia das úlceras de decúbito, eficaz para UD's de grau I e II, evitando a proliferação bacteriana e evolução da úlcera

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.D.A.M. **Institute for Healthcare Improvement**. How-to-Guide: Prevent Pressure. Disponível em: <https://adamimages.com/>. Acesso em: 14 jun. 2014.

ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.

ATKINS, P; JONES, Loretta. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BADKE, Marcio Rossato; BUDÓ, Maria de Lourdes Denardin; ALVIM, Neide Aparecida Titonelli; ZANETTI, Gilberto Dolejal; HEISLER, Elisa Vanessa. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto Enfermagem**. v. 21, n. 2, p. 363-70. 2012.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2010.

BORGES, A.M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.G.; ALVES, J.A.; LUCENA, E.M.P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu. v. 14, n. 4, p. 656-665. 2012.

BRAGA, I.A.; PIRETT, C.C.N.S.; RIBAS, R.M.; GONTIJO FLHO, P.P.;DIOGO FILHO, A. Bacterial colonization of pressure ulcers: assessment of risk for bloodstream infection and impact on patient outcomes. **Journal of Hospital Infection**. v. 83, p. 314-320. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. v.1. 5. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais na Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BROOK, Itzhak. Microbiological studies of decubitus ulcers in children. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 26, n. 2, p. 207-209. 1991.

BROOK, Itzhak. Microbiology and Management of Decubitus Ulcers in Children. **Journal of Developmental and Physical Disabilities**. v. 16, n. 3, p. 297-505. 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

CANHOTO, Jorge M. **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010.

CAREY, Francis . A. **Química Orgânica**. v. 2, 7. ed. Porto Alegre: McGraw-Bookman, 2008.

CAROVIC´-STANKO, Klaudija; ORLIC´, Sandi; POLITEO, Olivera; STRIKIC´, Frane; KOLAK, Ivan; MILOS, Mladen; SATOVIC, Zlatko. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**. v. 119, p. 196–201. 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard—Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7: Pennsylvania, 2006.

COSTA, Aloísio Fernandes. **Farmacognosia**. v. 1, 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVES, P.B.; EVANGELINO, T.S. Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atroveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu. v. 11, n. 1, p. 43-48. 2009.

COSTA, Márcio Paulino; STURTZ, Gustavo; COSTA, Fabio Paganini Pereira da; FERREIRA, Marcus Castro, & BARROS FILHO, Tarcísio E. P. Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 13, n. 3, p. 124-133. 2005.

CUNHA, A. Proença da; SILVA, Alda Pereira da; ROQUE, Odete Rodrigues; CUNHA, Eunice. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DAMBOLENA, José S.; ZUNINO, Maria P.; LÓPEZ, Abel G.; RUBINSTEIN, Héctor R.; ZYGALLO, Julio A.; MWANGI, Julius W.; THOITHI, Grace N.; KIBWAGE, Isaac O.; MWALUKUMBI, Josphat M.; KARIUKI, Samuel T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 11, p. 410–414. 2010.

DAVID, E. F. S; PIZZOLATO, M; FACANALI, R. MORAIS, L. A. S; FERRI, A. F; MARQUES, M. O. M. e MING, L. C. Influência da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu. v. 8, n. 4, p. 66-70. 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2nd. West Sussex: Wiley, 2002.

DJEUSSI E, Doriane; NOUMEDEM, Jaurès AK; A SEUKEP, Jackson; G FANKAM, Aimé; K VOUKENG, Igor; B TANKEO; HL NKUETE, Antoine HL and KUETE, Victor. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 13, n.164, p.1-8. 2013.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira; LEME, Ewerton Eduardo; DELARMELENA, Camila; SOARES, Andressa Almeida; FIGUEIRA, Glyn Mara; SARTORATTO, Adilson. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 197–201. 2007.

EBRIGHT, John R. Microbiology of Chronic Leg and Pressure Ulcers: Clinical Significance and Implications for Treatment. **Nursing Clinics of North America**. v. 40, p. 207-216. 2005.

FARAGO, Paulo Vitor; PAULA, Josiane Padilha de; BITTENCOURT, Jeanine Margraf; ZARPELLON, Vanessa e CHECCHIA, Lizianne Elisa Mikosz. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa. v. 10, n. 3/4, p. 59-63, set./dez. 2004.

FRANCA, Carolina S.; MENEZES, Fábila S.; COSTA, Larissa C.B.; NICOLAU, Edenilson S.; ALVES, Péricles B.; PINTO, José E.B.; MARÇAL, Rosilene M. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. **Fitoterapia**. v. 79, p. 569–573. 2008.

FRANCO, Ana L. P.; OLIVEIRA, Tiago B.; FERRI, Pedro H.; BARA, Maria Teresa F.; PAULA, José Realino de. Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L. al. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. IV, n. 2, p. 208-220. 2007.

HEYM, B; RIMAREIX, F; LORTAT-JACOB, A; NICOLAS-CHANOINE, M-H. Bacteriological investigation of infected pressure ulcers in spinal cord-injured patients and impact on antibiotic therapy. **International Spinal Cord Society**. v. 42, p. 230-234. 2004.

HILTUNEN, Raimo and HOLM, Yvonne. **Basil: The Genus Ocimum**. Department of Pharmacy. University of Helsinki. Finland: Taylor & Francis e-Library, 2005.

JARVIS, Carolyn. **Exame físico e avaliação de saúde para enfermagem**. 6.ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2012.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 25. ed. McGraw-Hill Companies, 2012.

JIROVETZ, Leopold; BUCHBAUER, Gerhard; SHAFI, Mohamed P. Shafi; KANIAMPADY, Molikutty M. Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **European Food Research Technology**. v. 217, p. 120-124. 2003.

JUIZ, Paulo José Lima. **Atividade apoptótica sobre osteoclastos, antimicrobiana e antitumoral de plantas medicinais no recôncavo baiano**. 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2013.

KHALID, Kh. A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**. v. 20. p. 289-296. 2006.

LOPES, Antonio Carlos. **Diagnóstico e tratamento**. v. 2. Barueri, SP: Manole, 2006.

LUANGNARUMITTHAI, S.; LAMLERTTHON, S.; TIYABOONCHAI, W. Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Five Strains of *Propionibacterium acnes*. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 34, n.1-4, p. 60-64. 2007.

LUZ, JMQ; EHLERT, PAD; INNECCO, R. 2009. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**. v. 27, p. 539-542. 2009.

MARTINS, Ernane R; CASALI, Vicente W. D.; BARBOSA, Luiz C. A.; CARAZZA, Fernando. Essential Oil in the Taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n.1, p. 29-32. 1997.

MARTINI, Márcia Guimarães. **Análise química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

MATASYOH, J.C.; BENDERA, M.M.; OGENDO, J.O.; OMOLLO, E.O.; DENG, A.L. Volatile leaf oil constituents of *Ocimum americanum* L. occurring in Western Kenya. **Chemical Society of Ethiopia**. v. 20, n. 1, p. 177-180. 2006.

MATIAS, Edinardo F.F.; SANTOS, Karla K.A.; ALMEIDA, Thiago S.; COSTA, José G.M.; COUTINHO, Henrique D.M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v. 1, p. 57–60. 2011.

MEDEIROS, Adriana Bessa Fernandes; LOPES, Consuelo Helena Aires de Freitas; JORGE, Maria Salete Bessa. Análise da prevenção e tratamento das úlceras por pressão propostos por enfermeiros. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. São Paulo. v. 43, n. 1, p. 223-228. mar., 2009.

MIZOKAMI, Fumihito; FURUTA, Katsunori; ISOgai, Zenzo. Necrotizing soft tissue infections developing from pressure ulcers. **Journal of Tissue Viability**. v. 23, p. 1-6. 2014.

MORAES, LILIA A.S. et al . Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro. v. 74, n. 1, p. 183-186. mar., 2002.

NASCIMENTO, Jeferson C.; BARBOSA, Luiz C.A.; PAULA, Vanderlucia F.; DAVID, Jorge M.; FONTANA, Renato; SILVA, Luiz A.M.; FRAN, S. Robson. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n. 3, p. 787-799. 2011.

NASCIMENTO, Paula F.C.; NASCIMENTO, Analuiza C.; RODRIGUES, Carolina S., ANTONIOLLI, Ângelo R.; SANTOS, Patrícia O.; BARBOSA JÚNIOR, Antônio Márcio, e TRINDADE, Rita. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 108-113. 2007.

NAZARRO, Filomena; FRATIANNI, Florinda; MARTINO, Laura De; COPPOLA, Raffaele; FEO, Vincenzo De. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**. v. 6, p. 1451-1474. 2013.

NETO, João Toniolo; PINTARELLI, Vitor Last, YAMATTO, Talita Hatsumi. **À beira do leito: geriatria e gerontologia na prática hospitalar**. Barueri, SP: Manole, 2007.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Chemistry Webbook**, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 14 jun. 2014.

NIYOMKAM, P.; KAEWBUMRUNG, S.; KAEWNPPARAT, S.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. **Pharmaceutical Biology**. v. 48, n. 4, p. 375–380, 2010.

OSTROSKY, Elissa A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E.L.; KANEKO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana O; FREITAS, Beatriz R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307. 2008.

ÖIEN RF; FORSELL HW. Ulcer healing time and antibiotic treatment before and after the introduction of the Registry of Ulcer Treatment: an improvement Project in a national quality registry in Sweden. **BMJ Open**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003091>. 2014>. Acesso em: 8 jun. 2014

PADALIA, R. C.; VERMA, R. S.; CHAUHAN, Amit; CHANOTIYA, C. S. Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum* taxa during plant ontogeny. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 35, p. 2567–2587. 2013.

PARISH, Lawrence Charles; WITKOWSKI, Joseph A. Controversies about the decubitus ulcer. **Dermatologic Clinics of North America**. v. 22, p. 87-91. 2004.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; MOLSKA, G. R.; KOHN, D. O.; CARLINI, E. L. A. Evaluation of the Antinociceptive Activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) Essential Oil and its isolated Active Principles in Mice. **Phytotherapy Research**. v. 27, p. 1220–1224. 2013.

PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci. MAIA, June Ferreira. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n.3, p. 624-632, jul. - set., 2007.

PEREIRA, Rita de Cassia Alves e MOREIRA, Ana Luiza Martins. **Manjeriço cultivado e utilização**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Agroindústria Tropical. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Fortaleza: Embrapa, 2011.

PHEROBASE. **Database of Insect Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: <<http://www.pherobase.com/database/kovatas/Kovats-index.php>>. 22 feb. 2014. Acesso em 14 jun. 2014.

POTHITIRAT, Werayut; CHOMNAWANG, Mullika Traidej; GRITSANAPAN, Wandee. Anti-Acne-Inducing Bacterial Activity of Mangosteen Fruit Rind Extracts. **Medical Principles and Practice**. v. 19, p. 281–286. 2010.

PRAKASH, Bhanu; SHUKLA, Ravindra; SINGH, Priyanka; MISHRA, Prashant Kumar; DUBEY, Nawal Kishore; KHARWAR, Ravindra Nath. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**. v. 44, p. 385–390. 2011.

PRASANNABALAJI, N; MURALITHARAN, G; SIVANANDAN, RN; KUMARAN, S and PUGAZHVENDAN, SR. Antibacterial activities of some Indian traditional plant extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. p. S291-S295. 2012.

RODRIGUES, Fabiola Fernandes Galvão; COUTINHO, Henrique Douglas Melo; CAMPOS, Adriana Rolim; LIMA, Sidney Gonçalo de; COSTA, José Galberto Martins da. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá. v. 33, n. 2, p. 141-144. 2011.

SANSON, Alessandra David de. **Morfologia, produção de biomassa e caracterização química do óleo essencial de seis acessos de *Ocimum* spp. comercializados em Salvador, BA e Brasília,DF**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2009.

SANTOS, Fortino Solórzano; NOVALES, Maria Guadalupe Miranda. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 23, p. 136–141. 2012.

SILVA, M. G. de Vasconcelos; SANTOS, R. N. Dos; MATOS, F. J. Abreu; MACHADO, M. I. L. Volatile constituents from leaf, inflorescence and root oils of *Ocimum americanum* L. grown in north-eastern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 18, p. 303-304. 2003.

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

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICCK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC/UFRGS, 2000.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. Castelló de la Plana: Universitat Jaume I, 2002.

TERRA, Newton Luiz e DORNELLES, Beatriz. **Envelhecimento bem-sucedido**. 2. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

THOMAS, David R. Clinical Management of Pressure Ulcers. **Clinics Geriatric Medicine**. v. 29, p. 397–413. 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

UPADHYAY, Ram K.; MISRA, Laxmi N.; SINGH, Gurdip. Sesquiterpene alcohols of the copane series from essential oil *Ocimum americanum*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 2, p. 691-693. 1991.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 11, p. 463-71. 1963.

VIEIRA, Priscila R.N.; MORAIS, Selene M; BEZERRA, Francisco H.Q.; TRAVASSO, Pablito Augusto; OLIVEIRA, Írvila R. and SILVA, Maria Goretti V. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**. v. 55, p. 267-271. 2014.

WHITNEY, JoAnne; PHILLIPS, Linda; ASLAM, Rummana; BARBUL, Adrian; GOTTRUP, Finn; GOULD, Lisa; ROBSON, Martin C.; RODEHEAVER, George; THOMAS, David; STOTTS, Nancy. Guidelines for the treatment of pressure ulcers. **Wound Repair and Regeneration**. v. 14, p. 663-679. 2006.

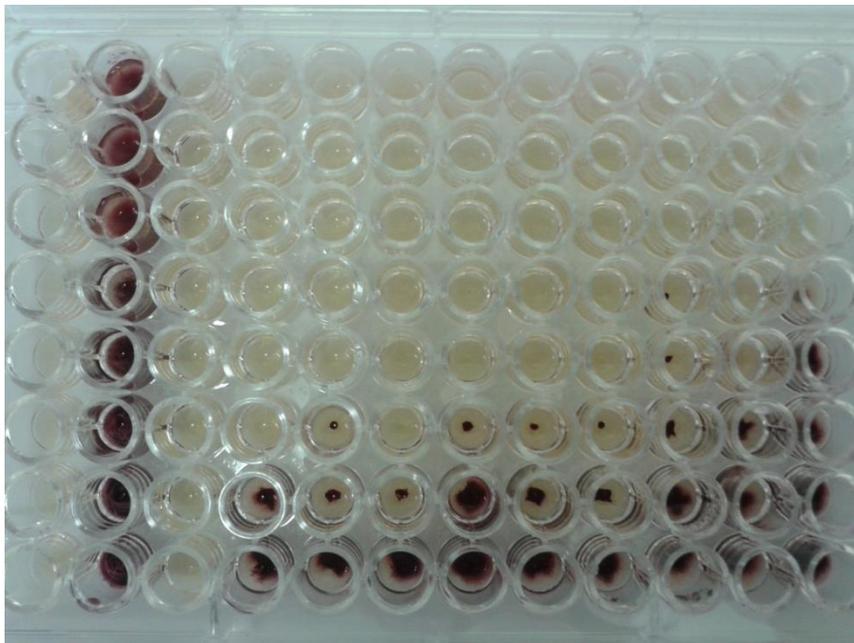
WOLFF, Klaus e JOHNSON, Richard Allen. **Dermatologia de Fitzpatrick**: atlas e texto. Porto Alegre: Artmed. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The International Pharmacopoeia**. 3rd. 4 ed. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em: 11 jun. 2014.

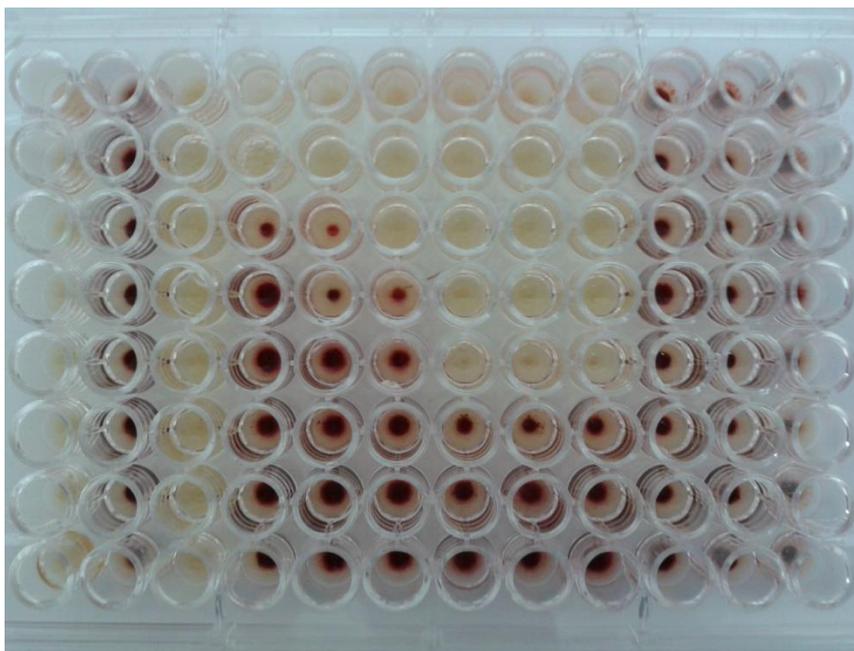
ZEEGELAAR, Jim E.; STROÏNK, Aimee C.; STEKETEE, Willemyrn H.; FABER, William R.; WAL, Allard C. van der; KOMOLAFE, Isaac O. O.; DZAMALALA, Charles; CHIBWANA, Cecilia; WENDTE, Johannes F.; ZIJSTRA, Eduard E. Etiology and incidence of chronic ulcers in Blantyre, Malawi. **International Journal of Dermatology**. v. 45, p. 933–936. 2006.

APÊNDICE
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

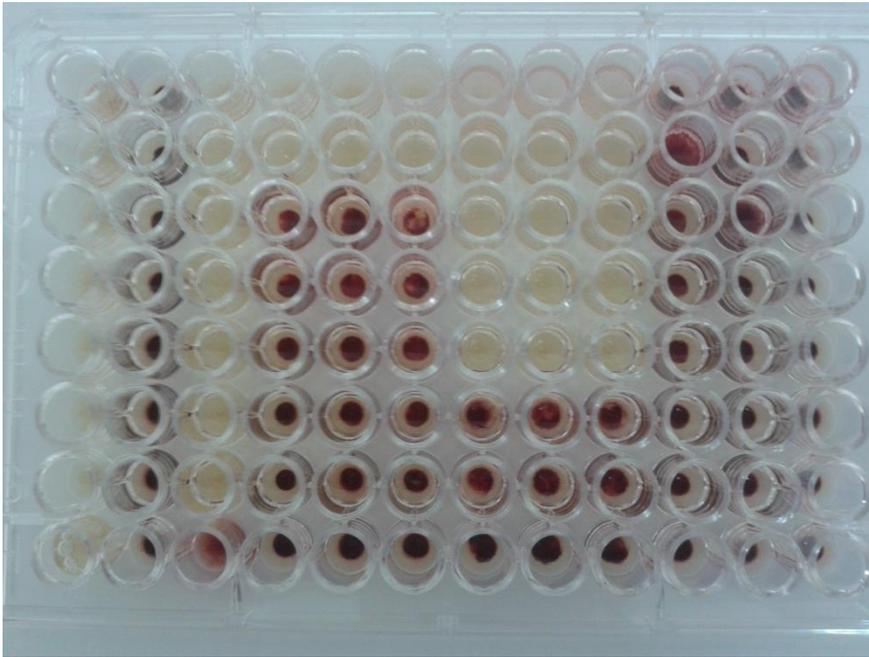
Staphylococcus aureus



Staphylococcus epidermidis



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa

