

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Ocimum gratissimum* L.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lenise de Lima Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE**  
*Ocimum gratissimum L.*

**por**

**Lenise de Lima Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Farmacologia aplicada à produção animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de mestrado

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
*Ocimum gratissimum* L.**

elaborada por  
**Lenise de Lima Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann  
(Presidente/Orientadora)**

---

**Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Tatiana Emanuelli (UFSM)**

Santa Maria, 31 de março de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

Aos grandes incentivadores para a realização deste trabalho:  
meus pais, Daise e Leodolfo (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

- À Deus que guiou meus passos para que eu chegasse até aqui.
- À minha mãe, Daise, ao meu namorado, Marcius, e ao meu irmão, Luís Alvaro, que tanto me apoiaram durante esta caminhada.
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann, meus sinceros agradecimentos pela orientação e confiança depositada durante a realização deste trabalho e por sua contribuição em minha formação científica.
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner, do Laboratório de Análises Microbiológicas da UFSM, pela orientação e auxílio na realização dos testes de atividade antimicrobiana e toxicidade frente à *Artemia salina* L juntamente com a mestrandia Vanessa Oliveira Domingues e o Me. Luiz Gustavo Brenner Reetz.
- Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, e sua equipe pela realização das análises cromatográficas qualitativas.
- Ao Prof. Dr. Érico M. M. Flores, do Departamento de Química Analítica da UFSM, e seus doutorandos Diogo P. de Moraes e Fábio A. Duarte pelo auxílio na obtenção dos extratos pelas metodologias de ultrassom e micro-ondas.
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Soares Pereira, da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, pelo cultivo e envio do material vegetal utilizado na confecção dos extratos.
- Ao Prof. Dr. Renato Zanella, do Departamento de Química Analítica da UFSM, pela análise quantitativa dos extratos.
- Ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, pelo auxílio nas análises estatísticas e em outras atividades acadêmicas.
- À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo aprendizado.
- As amigas e colegas de laboratório Clarissa G. Heldwein e Viviane de O. Garcia pela amizade, paciência e auxílio na realização da parte experimental.
- Aos demais colegas de laboratório, Manuela Soliz, Simone Benovit, Juliana Tondolo, Fabiana Geller, Fernanda H. Carvalho, Glória da Silva, Maikon Barros, Leandro Francescato e Anelise Murari que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos colegas dos cursos de Pós-Graduação em Farmacologia e Ciências Farmacêuticas pelo convívio, aprendizado e amizade.
- À todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram e/ou contribuíram para a realização deste trabalho.

Quando tudo está perdido  
sempre existe um caminho.  
(Renato Russo)

## RESUMO

Dissertação de mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Ocimum gratissimum* L.

AUTOR: LENISE DE LIMA SILVA

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2009.

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), conhecida popularmente como alfavaca, é uma planta amplamente distribuída em regiões de clima tropical e temperado. É utilizada como aromatizante de alimentos e medicinalmente no combate a doenças infecciosas. Suas propriedades biológicas têm sido atribuídas à presença de óleo essencial rico em timol ou eugenol. Este trabalho descreve as variações qualitativas e quantitativas nos óleos essenciais obtidos a partir dos talos, inflorescências e folhas desta espécie cultivada no Sul do Brasil em relação ao período de coleta. Também descreve a avaliação da atividade antibacteriana, toxicidade e teor de eugenol nos extratos etanólicos brutos das partes aéreas secas de *O. gratissimum* obtidos por diferentes metodologias. O óleo essencial obtido a partir das inflorescências frescas deste vegetal teve sua composição química, atividade antibacteriana e toxicidade estudadas. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG/EM. Os extratos etanólicos foram obtidos através dos métodos de maceração, soxhlet, banho de ultrassom, sonda de ultrassom e micro-ondas. O conteúdo de eugenol nos extratos foi determinado por CG-FID utilizando eugenol obtido das partes aéreas de *O. gratissimum* como padrão. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI/NCCLS). O teste de letalidade frente à *Artemia salina* L. foi utilizado para análise da toxicidade. Os constituintes majoritários de todos os óleos foram eugenol (52,6 - 89,2 %) e  $\gamma$ -muuroleno (6,2 - 35,3 %). Apenas os óleos essenciais das inflorescências e talos tiveram seus rendimentos influenciados pela estação de coleta. A pequena variação no teor de eugenol presente no óleo essencial das folhas indicou ser esta a melhor parte do vegetal para a obtenção deste composto. O óleo essencial das inflorescências foi bacteriostático (CIM entre 0,5-2 mg/mL) e bactericida (CBM entre 1-4 mg/mL) frente a todas as cepas bacterianas testadas. Os extratos etanólicos demonstraram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre si em relação a rendimento, teor de eugenol, atividade antibacteriana e toxicidade. Maior atividade antimicrobiana foi verificada para os extratos comparado ao óleo essencial testado frente à *S. aureus* ATCC 25923 e aos isolados de *B. cereus*, MRSA (CIM de 0,66 mg/mL), ESBL e *Shigella flexneri* (CIM de 1,32 mg/mL). Ação bactericida dos extratos foi obtida principalmente frente a bactérias Gram-positivas. Os teores de eugenol detectados nos extratos de *O. gratissimum* não puderam ser correlacionados com a atividade bacteriostática, o que sugere efeito sinérgico entre fito-constituintes. A maceração foi considerada como a melhor metodologia para a obtenção de extratos etanólicos das partes aéreas desta espécie. Os resultados de atividade antibacteriana confirmaram o teste de toxicidade frente à *Artemia salina* L. como um método preditivo deste tipo de atividade.

Palavras-chaves: *Ocimum gratissimum*, composição, atividade antibacteriana, toxicidade.

## ABSTRACT

### CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Ocimum gratissimum* L.

AUTHOR: LENISE DE LIMA SILVA  
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), known as alfavaca, is widely distributed in tropical and warm-temperature regions. It is used as a food flavoring and for medicinal purposes against infectious diseases. Its biological properties are attributed to the presence of thymol or eugenol-rich essential oils. This study describes qualitative and quantitative variations in essential oils from stems, inflorescences and leaves of *O. gratissimum* L. grown in southern Brazil, in two harvest periods. The evaluation of eugenol content, antibacterial activity and toxicity of the different ethanolic extracts from dried aerial parts of *O. gratissimum* were studied. Afterwards, the essential oil from fresh inflorescences had its antibacterial activity, toxicity and chemical composition determined. The essential oils were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. The extracts were obtained by maceration, soxhlet, ultrasonic cleaning bath, ultrasonic horn and microwave-assisted extractions. Eugenol content was determined by GC-FID using the pure compound isolated from aerial parts of the plant as reference. Antibacterial activity was assayed by microdilution method as established by CLSI/NCCLS. Toxicity was verified by brine shrimp (*Artemia salina* L.) lethality test. The major compounds of all essential oils were eugenol (52.6 - 89.2 %) and  $\gamma$ -muurolene (6.2 - 35.3 %). The harvest season influenced only the yields of inflorescence and stem essential oils. The low seasonal variation of eugenol in the essential oil of the leaves indicated that these are the best source to obtain this compound. Inflorescences essential oil was bacteriostatic (MIC between 0.5-2 mg/mL) and bactericidal (MBC between 1-4 mg/mL) against all strains tested. Significant differences ( $P < 0.05$ ) among the extractive methods used to the obtention of ethanolic extracts were observed in all analyses. Higher antimicrobial activity was verified to extracts compared to the essential oil tested against *S. aureus* ATCC 25923 and clinical isolate of *B. cereus*, MRSA (MIC of 0.66 mg/mL), ESBL and *Shigella flexneri* (MIC of 1.32 mg/mL). Bactericidal activity of the extracts was verified in Gram-positive bacteria. Eugenol content did not explain all differences obtained among the antimicrobial activities of the tested extracts. The results suggest synergistic action among phyto-constituents. Maceration was considered the best extraction process considering the biological activities of all extracts. The antimicrobial avaluation results confirmed the brine shrimp lethality test as predictive method for this activity.

Key words: *Ocimum gratissimum*, composition, antibacterial activity, toxicity.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Ocimum gratissimum</i> L.: A – ramo florido; B – bráctea; C – cálice florífero; D – cálice frutífero; E – seção longitudinal da corola com estames; F – núculas; G – tipos de folhas (FONTE: ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a).....	18
FIGURA 2 - <i>Ocimum gratissimum</i> L. – aspecto geral da planta.....	18
FIGURA 3 - Constituintes majoritários do óleo essencial e/ou isolados de <i>O. gratissimum</i> (FONTE: ADAMS, 2001; NJOKU et al., 1997; FARIA et al., 2007).....	24
FIGURA 4- Flavonóides e compostos fenólicos identificados em <i>O. gratissimum</i> (FONTE: GRAYER et al., 2000; 2003) .....	27
FIGURA 5 – Hidrodestilação em aparelho de Clevenger. ....	29
FIGURA 6 - Extração em aparelho de soxhlet.....	30
FIGURA 7 – Formação de um micro-jato de líquido durante colapso da bolha próximo a superfície externa (FONTE: SUSLICK, PRICE, 1999).....	32
FIGURA 8 – Sonicação em processo indireto utilizando um banho de ultrassom (A) e em processos diretos utilizando banho (B) e sonda (C) de ultrassom (FONTE: VINATORU, 2001).....	33
FIGURA 9 – Representação dos dois modos de aquecimento: por condução (A) e por energia de micro-ondas (B) (FONTE: LETELLIER, BUDZINSKI, 1999). ....	34
FIGURA 10 - Espectro de massas por impacto eletrônico do composto isolado (A) e do eugenol (B, NIST 98).....	95
FIGURA 11 – Proposta de fragmentação do eugenol por EM-IE em 70 eV. ....	96
FIGURA 12 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do eugenol (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	162
FIGURA 13 - Espectros de RMN <sup>1</sup> H do eugenol (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	163
FIGURA 14 - Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H do eugenol na região de δ 2,7 a 6,9 ppm (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	164
FIGURA 15 - Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H do eugenol na região de δ 6,45 a 6,79 ppm (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	165

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Usos populares de <i>Ocimum gratissimum</i> no Brasil.....	20
TABELA 2 - Teores de algumas classes de constituintes em <i>Ocimum gratissimum</i> L. ....	21
TABELA 3 - Caracterização físico-química e mineral das folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> ...	22

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC - (do inglês) “American Type Culture Collection”

CBM - concentração bactericida mínima

CDCl<sub>3</sub> - clorofórmio deuterado

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas

CG-FID - cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI/NCCLS - (do inglês) “Clinical and Laboratory Standards Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standards”

DL<sub>50</sub> - dose letal média

ESBL - *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido

EM-IE - espectro de massas por impacto eletrônico

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

eV - elétron Volts

EVR - *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina

GHz - giga Hertz

KHz - quilo Hertz

L. - Linné

M<sup>+</sup> - íon molecular

m/z - relação massa / carga

MHz - mega Hertz

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

NIST - (do inglês) “National Institute of Standards and Technology”

ppm - parte(s) por milhão

RMN <sup>13</sup>C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN <sup>1</sup>H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

UFES - Universidade Federal de Santa Maria

u.m.a. - unidades de massa atômica

var. - variedade

δ - deslocamento químico

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 <i>OCIMUM GRATISSIMUM</i> LINNÉ.....	16
2.1.1 Aspectos botânicos .....	16
2.1.2 Distribuição geográfica, dados fenológicos e ecológicos .....	19
2.1.3 Usos medicinais e nomes populares .....	19
2.1.4 Constituintes químicos .....	21
2.2 MÉTODOS EXTRATIVOS .....	27
2.2.1 Métodos clássicos.....	28
2.2.1.1 Hidrodestilação .....	28
2.2.1.2 Maceração.....	29
2.2.1.3 Soxhlet.....	30
2.2.2 Métodos modernos de extração.....	31
2.2.2.1 Ultrassom.....	31
2.2.2.2 Micro-ondas.....	33
<b>3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 MANUSCRITO 2 .....	36
3.2 MANUSCRITO 3 .....	55
3.3 MANUSCRITO 4 .....	71
<b>4 RESULTADOS ADICIONAIS</b> .....	<b>95</b>
4.1 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO EUGENOL POR EM-IE .....	95
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>98</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>111</b>
MANUSCRITO 1 .....	111
<b>ANEXO</b> .....	<b>162</b>
ESPECTROS DE RMN DO EUGENOL .....	162

# 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico. Com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos sintéticos foram adquirindo primazia no tratamento farmacológico. Isto ocorreu, entre outros fatores, pela maior facilidade de obtenção de compostos puros, possibilidade de modificações estruturais (com vistas a fármacos mais ativos e seguros) e pelo crescente poder econômico das grandes companhias farmacêuticas (RATES, 2001).

Contudo, nos últimos anos, têm aumentado o interesse no uso de terapias complementares e produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, também denominados de fitoterápicos. Entre os fatores que motivam esse aumento estão à insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001). Aliado a isto, também se encontram o maior conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados e o desenvolvimento de novos métodos analíticos de controle de qualidade e de novas formas de preparação e administração (CAÑIGUERAL, DELLACASSA, BANDONI, 2003).

O uso de fitoterápicos, em diversos casos, é justificado pelas vantagens destes em relação a uma substância pura isolada. Entre estas vantagens destacam-se aspectos relativos à sinergia e a associação de mecanismos por ação em alvos moleculares diferentes pelos constituintes vegetais; aos menores riscos de efeitos colaterais, se forem consideradas as reduzidas concentrações dos compostos ativos nas plantas, e os menores custos de pesquisa (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001).

Além disso, este tipo de terapia corresponde ao único recurso terapêutico de parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta (PINTO et al., 2002). Segundo Funari e Ferro (2005) a distribuição mundial do mercado de fitoterápicos em 2001 foi de 3,9 bilhões de dólares na América do Norte, US\$ 6,9 bilhões na Europa, US\$ 5,1 bilhões na Ásia,

US\$ 2,3 bilhões no Japão, US\$ 600 milhões na América do Sul e US\$ 800 milhões nos demais países e regiões, totalizando US\$ 19,6 bilhões.

É de se destacar que a permanência ou entrada no mercado de produtos fitoterápicos, em uma época em que as exigências de segurança, eficácia e qualidade estabelecidas pelas agências reguladoras de medicamentos se tornaram mais rígidas, está relacionada com o desenvolvimento de estudos científicos objetivando a obtenção de matérias-primas controladas, por exemplo, através da consideração de substâncias marcadoras, bem como com o desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a obtenção de extrativos vegetais (SCHENKEL, GOSMANN, PETROVICK, 2004). Neste sentido, o desenvolvimento de modernas técnicas de preparação da amostra com significativas vantagens sobre as metodologias convencionais de extração e análise de plantas medicinais tem um importante papel no esforço global de assegurar e providenciar alta qualidade dos produtos fitoterápicos para os consumidores mundiais (HUIE, 2002).

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), conhecida popularmente como alfavaca, é uma planta originária da Ásia e África de ampla distribuição nas regiões de clima quente (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a). É utilizada na medicina popular de diversos países, dentre eles o Brasil, como anti-séptico no tratamento de doenças infecciosas (ONAJOB, 1986; IWU, 1993; MATOS, 1994; MONTALVO, DOMÍNGUEZ, 1997; SILVA et al., 2006). Sua atividade antimicrobiana é bem relatada na literatura, sendo principalmente atribuída à presença de óleos essenciais (NAKAMURA et al., 1999; DUBEY et al., 2000; SARTORATTO et al., 2004; DUARTE et al., 2005). Em virtude desta espécie vir sendo considerada para inclusão no programa de Fitoterapia do Sistema Único de Saúde (SUS), a caracterização de um marcador químico para o material vegetal com vista a seu futuro controle de qualidade, bem como a escolha de um método de extração que potencialize a atividade antibacteriana desejada se fazem necessários.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivos:

- A extração e análise da composição do óleo essencial das diferentes partes de *Ocimum gratissimum*;
- A avaliação da atividade antibacteriana, toxicidade e composição dos extratos etanólicos brutos das partes aéreas secas de *Ocimum gratissimum* obtidos por diferentes métodos extrativos e do óleo essencial obtido a partir das inflorescências frescas deste vegetal.

Esta dissertação está organizada na forma de manuscritos. Ao todo, quatro manuscritos são apresentados, os quais se encontram formatados conforme os periódicos aos quais foram ou serão submetidos. Destes, três manuscritos são apresentados como parte dos resultados e, por isso, estão inseridos no item Manuscritos Científicos. Os temas centrais abordados são a análise da composição dos óleos essenciais e obtenção dos extratos etanólicos de *O. gratissimum*, bem como a atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial das inflorescências e dos extratos obtidos por diferentes metodologias extrativas. Aqueles resultados que não foram abordados em sua íntegra nos manuscritos, são apresentados como resultados adicionais.

O item destinado a Revisão da Literatura apresenta-se dividido em duas partes. Na primeira é relatada uma descrição da espécie estudada, *Ocimum gratissimum* L., suas características botânicas, usos populares e constituintes químicos. Na segunda, é realizada uma breve descrição teórica dos métodos de extração utilizados neste trabalho. A revisão da literatura também contempla o manuscrito 1 apresentado como apêndice. Nele estão descritos estudos científicos de caráter anti-infeccioso e toxicológico realizados para esta espécie.

Na Discussão Geral, a proposta é realizar uma ampla interpretação dos resultados obtidos, bem como correlacioná-los com os dados da literatura. Assim, questões específicas dos assuntos abordados nesta dissertação são contempladas junto aos seus respectivos manuscritos. A dissertação é finalizada pelas Conclusões do trabalho, Referências Bibliográficas e Anexos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Ocimum gratissimum* Linné

#### 2.1.1 Aspectos botânicos

Segundo Paton et al. (2004), a espécie *Ocimum gratissimum* L. encontra-se taxonomicamente classificada como pertencente a família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae, tribo Ocimeae e subtribo Ociminae.

*Ocimum gratissimum* L. (Figuras 1 e 2) é uma erva de 50-250 cm, de base lenhosa, aromática. Talos eretos de seção quadrangular, ± densamente ramificados, ± glabros na base, com pêlos largos dispersos concentrados nos nós e no eixo da inflorescência, às vezes ± tomentosos sobre o eixo da inflorescência. Ramos abertos ou fechados, lenhosos, com pêlos ± concentrados nas faces, às vezes tomentosos. Folhas 2-12(23,5) x 1,5-5,5(6,2) cm, de ovadas a elípticas, inteiras ou serrilhadas, de agudas a cuspidadas, cuneadas, punteado-glandulosas, glabras ou com pêlos curtos dispersos sobre as inervações; pecíolos 0,6-3 cm, ligeiramente achatados, pilosos, às vezes com os pêlos confinados na face adaxial. Inflorescências laxas ou congestas, delgadas ou robustas, ± ramificadas; ramos laterais 2-15(30) cm, que não se sobrepõem em altura ao ramo principal; verticilos separados entre 0,4 e 1 cm ou, às vezes, adjacentes, que se tocam; eixo da inflorescência sem cicatrizes negras; brácteas 4-7 x 3-4,5 mm, de ovadas a triangulares, persistentes ou não, eretas, que se estreitam notavelmente em direção ao ápice, inteiras, de agudas a cuspidadas, cuneadas ou cordadas, pilosas; pedicelos 1,5-3 mm, eretos, ligeiramente achatados, levemente curvados, pubescentes. Cálice 2-4,5 mm na antese, horizontal, punteado-glanduloso, ligeiramente reflexo, de subglabro a piloso; lábio superior decurrente até a metade superior, de arredondado a acuminado; lóbulos médios e laterais do lábio inferior curtos, de acuminados a cuspidados; cálice frutífero de 4-8 mm de comprimento, horizontal, levemente reflexo, de boca dentada, subglabro ou piloso, lábio superior acrescente. Corola 4-5,5 mm, branca ou branco-esverdeada; tubo reto, glabro, infundibuliforme, algo maior que o tubo do cálice; indumento ± disperso, formado por pêlos curtos situados no interior de tubo; lóbulos do lábio superior arredondados, com poucos pêlos no dorso; lábio inferior ovado, inteiro ou sinuoso, côncavo, com poucos pêlos no dorso, com glândulas ou sem. Estames exertos entre 1 e 2,5mm, os posteriores dotados de apêndices achatados e pilosos ao redor da base. Ovário glabro. Núculas 1-1,5 mm, marrons, subesféricas; pericarpo punteado-foveolado, sem mucilagem ou com uma capa incolor e extremamente fina (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a).

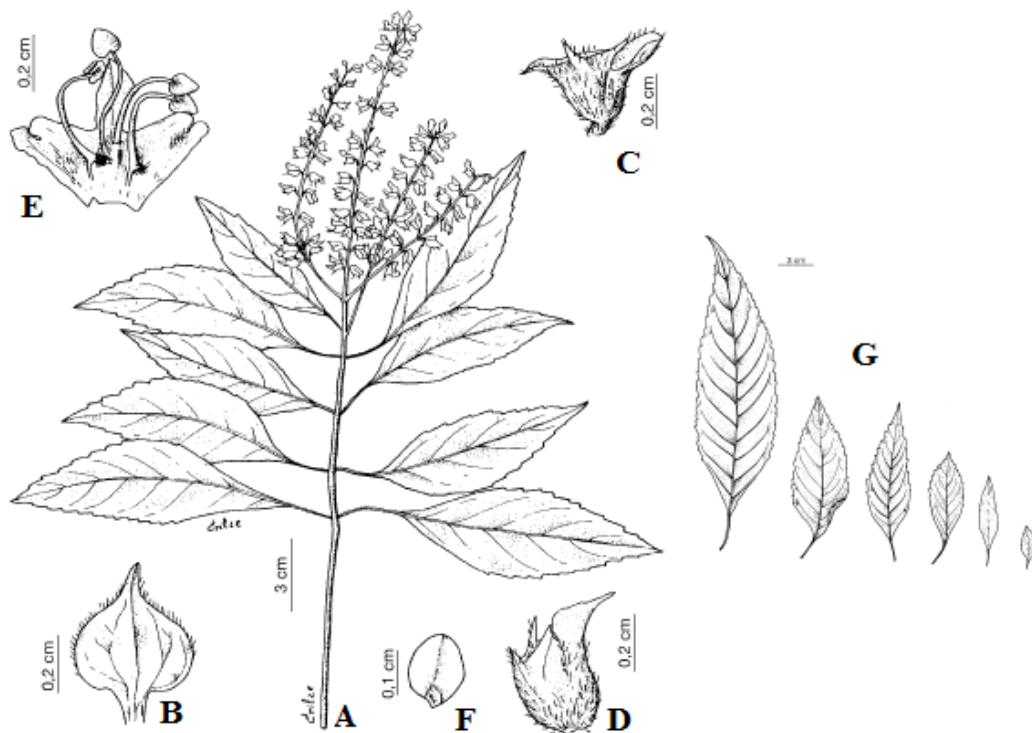


A esta descrição Gonçalves et al. (2008) acrescenta o seguinte:

Arbusto com inflorescências terminais plurifloras simples do tipo indefinida, racimosa, centripeta ou monopodial, com flores situadas em pedicelos, saindo de diversos níveis no eixo primário e atingindo diferentes alturas, com pré-floração do tipo valvar induplicada.

Esta espécie é caracterizada por apresentar uma grande variabilidade morfológica, principalmente no que se refere ao indumento do talo e do cálice e na forma da inflorescência. Ainda que estas variações sejam importantes, não pôde ser estabelecida uma divisão infra-específica clara até o momento, uma vez que a variação é contínua. Ocorrem duas variedades: var. *gratissimum* (= *O. viride*, *O. suave* e *O. guineense*) e var. *macrophyllum* Briq., que se distingue da primeira por apresentar talos glabros ou com pêlos curtos e dispersos sobre um dos lados do talo, folhas glabras ou com pêlos dispersos sobre as inervações inferiores, e eixo da inflorescência piloso. A variedade *gratissimum* demonstra geralmente os talos pilosos, folhas pubescentes e eixo da inflorescência tomentoso (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a).

A análise histológica de folhas, realizada por Albuquerque, Silva e Pierrot (1998), permitiu verificar que a mesma exibe o padrão geral descrito para a família Lamiaceae. A folha é dorsiventral, com estômatos diacíticos em ambas as epidermes. A estrutura vascular do pecíolo é muito variável. Já Fonseca e Leal (2006) verificaram em análise microscópica a presença nas folhas de pêlos tectores longos e curtos, pluricelulares e unicelulares respectivamente, encontrados em maior número sobre a epiderme superior.



**Figura 1 – *Ocimum gratissimum* L.: A – ramo florido; B – bráctea; C – cálice florífero; D- cálice frutífero; E – seção longitudinal da corola com estames; F – núculas; G – tipos de folhas (FONTE: ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a).**



**Figura 2 - *Ocimum gratissimum* L. – aspecto geral da planta.**

### 2.1.2 Distribuição geográfica, dados fenológicos e ecológicos

A espécie *Ocimum gratissimum* L. é originária da Ásia e África, onde se apresenta como perene; em regiões frias é anual. É muito difundida na América tropical, onde foi adaptada e cultivada. Habita terrenos alternados de litoral, selva e caatinga, sempre ao redor de habitações humanas (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a; EHLERT, LUZ, INNECCO, 2004).

É planta descrita como alógama, cuja propagação vegetativa pode ser feita por meio de estaquias (EHLERT, LUZ, INNECCO, 2004). Em estudos realizados por Gonçalves et al. (2008) a mesma demonstrou indícios de ser preferencialmente autógena, uma vez que houve maior eficiência na autopolinização natural. Além disso, com relação aos insetos, foram observadas visitas predominantemente das espécies da família *Apidae*.

### 2.1.3 Usos medicinais e nomes populares

Alguns nomes populares relatados para a espécie *Ocimum gratissimum* L no Brasil são alfavaca, alfavaca-cravo, alfavaca-de-caboclo, alfavaca-de-Guiné, alfavaca-da-América, alfavaca-do-campo, alfavaca-das-minas, louro, louro-de-cheiro, louro-cheiroso, quioiô, quioiô-cravo, árvore-de-manjerição e manjerição-indiano (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998a; DI STASI et al., 2002; EHLERT, LUZ, INNECCO, 2004). Em relação a sua utilização popular, esta tem sido descrita neste país como similar a de países africanos e europeus em consequência de ter sido introduzida em solo brasileiro por europeus e escravos africanos durante a época da colonização. Outros usos, contudo, mostraram-se influenciados pelos índios americanos (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 1998b).

No oeste da África, esta planta é utilizada como diaforético, estomáquico, laxante, anti-séptico, tônico geral, antidiarréico, ingrediente em preparações antimaláricas e como um tratamento para tosse, febre, dores reumáticas, hemorróidas, bronquite e conjuntivite (ONAJOBI, 1986; IWU, 1993). Em Cuba, usos como antiespasmódico e em casos de parasitoses e afecções de olhos e ouvidos foram relatados para as folhas (MONTALVO,

DOMÍNGUEZ, 1997). No Brasil, o chá e a tintura desta planta são usados como enxagüatório bucal e suas partes aéreas como condimento para carne (MATOS, 1994; SILVA et al., 2006). A Tabela 1 apresentada a seguir mostra outros usos de *O. gratissimum* relatados em estudos etnofarmacológicos brasileiros.

**Tabela 1 - Usos populares de *Ocimum gratissimum* no Brasil**

Parte do vegetal	Usos populares (preparação)	Referências
Flores	Como digestivo, expectorante e calmante e em casos de flatulência, tosse e prurido. Em casos de gripe e dor de cabeça (decocto, xarope), estresse e cansaço (banho).	ALCÂNTARA JÚNIOR et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007.
Folhas	No tratamento de gripe (banho, decocto, xarope, infusão), micose (banho), bronquite, tosse (infusão, xarope), resfriado e como diurético (infusão). Como condimento (fresco), digestivo, emenagogo, expectorante, purgativo e estomáquico e em casos de dor de cabeça (decocto, xarope). Em casos de estresse e cansaço (banho), flatulência, hipertensão, prurido e como calmante.	DI STASI et al., 2002; SARTORATO et al., 2004; ALCÂNTARA JÚNIOR et al., 2005; DUARTE et al., 2005; FRANCO, BARROS, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007; LIMA et al., 2007; OLIVEIRA, ARAÚJO, 2007.
Raiz	Em casos de tosse (xarope), dor de cabeça (decocto, xarope), diarreia, complicações estomacais e como sedativo para crianças (decocto).	DI STASI et al., 2002.

#### 2.1.4 Constituintes químicos

Vários *screenings* fitoquímicos foram realizados com *O. gratissimum*. Na planta seca as reações qualitativas indicaram a presença de aminas, esteróides e triterpenóides, açúcares redutores, fenóis, óleo essencial, flavonóides, saponinas e quinonas (GARCÍA et al., 1998). Para os extratos metanólico (AKAH, JOHN-AFRICA, NWORU, 2007; AKINMOLADUN et al., 2007; BRAGA et al., 2007) e aquoso das folhas os testes qualitativos indicaram a presença de alcalóides, taninos, esteróides, terpenóides, flavonóides, glicosídeos cardiotônicos e saponinas. Além disso, para o último também foi detectada positividade para fenóis, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos com desoxi-açúcares, triterpenóides e carboidratos (AZIBA, BASS, ELEGBE, 1999; OFFIAH, CHIKWENDU, 1999; EDEOGA, OMOSUN, UCHE, 2006; OBOH, 2006b; AKINMOLADUN et al., 2007), enquanto que extratos etanólicos apresentaram reação positiva para taninos, saponinas, antraquinonas e glicosídeos cardiotônicos (OBOH, 2006a). No extrato metanólico das flores foi indicada a presença de alcalóides, triterpenóides, taninos e flavonóides (BRAGA et al., 2007). Em relação a estas classes de constituintes, alguns teores foram determinados e encontram-se descritos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Teores de algumas classes de constituintes em *Ocimum gratissimum* L.**

Grupo fitoquímico	Teor (Referência)
Carotenos	2,56 ± 0,09 mg % no extrato hexânico (CHANWITHEESUK et al., 2005)
Fenóis totais	300 mg % no extrato preparado em acetona (OBOH, 2005); 125 ± 0,11 mg % no extrato preparado em acetona-metanol-água 7:7:6 (CHANWITHEESUK et al., 2005); 0,026 - 0,049 % no extrato aquoso (EDEOGA, OMOSUN,

	UCHE, 2006);
	3600 ± 200 mg % no extrato etanólico (OBOH, 2006a).
Flavonóides	1,994 mg % no extrato metanólico (ARAÚJO et al., 2008)
Taninos	24,3 ± 0,08 mg % no extrato aquoso (CHANWITHEESUK et al., 2005);
	3,512 mg % no extrato metanólico (ARAÚJO et al., 2008)
Xantofilas	7,94 ± 0,03 mg % no extrato hexânico (CHANWITHEESUK et al., 2005)

A caracterização físico-química e mineral das folhas de *O. gratissimum* foi realizada por Lopes et al. (2001) usando diferentes técnicas analíticas (gravimetria, espectrometria de absorção atômica e molecular e fotometria de chama). Além disso, outras análises semelhantes de composição foram realizadas neste sentido e encontram-se descritas na literatura. Estes dados encontram-se compilados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Caracterização físico-química e mineral das folhas de *Ocimum gratissimum***

Composição	Teores encontrados				
	LOPES et al. (2001); ALMEIDA et al. (2003) (%)	ALABI, ONIBUDO, AMUSA (2005) (%)	CHANWITHEESUK et al. (2005) (mg%)	EDEOGA, OMOSUN, UCHE (2006) (%)	IFESAN, IJAROTIMI, OSUNDAHUNSI (2006) (%)
Carboidratos		2,38		66,24 - 75,87	35,61 ± 0,05
Cinzas totais	10,75	10,25		5,74 - 6,88	15,62 ± 0,07
Fibra Bruta	10,82	9,26		4,88 - 8,48	8,70 ± 0,09

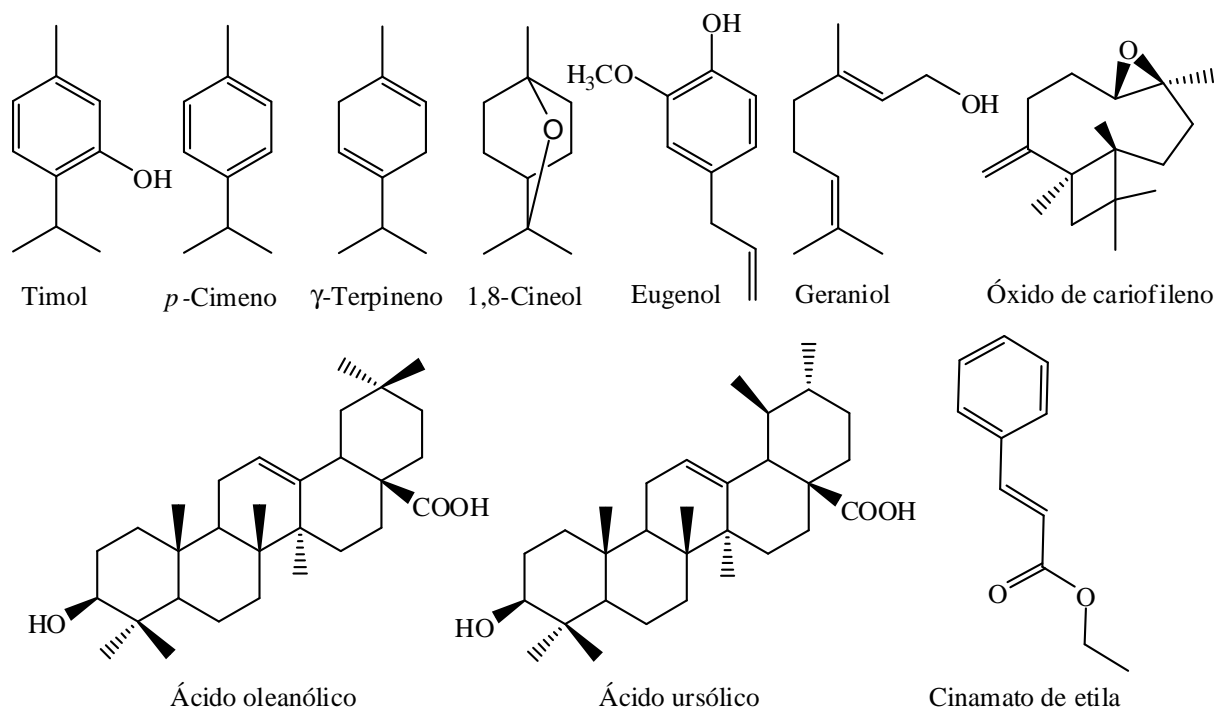
Gordura	1,44	13,7	1,06 - 4,90	11,78 ± 0,09
Proteína Bruta		11,4	9,19 - 17,94	20,18 ± 0,09
Umidade	75,47			8,11 ± 0,10
Vitamina B1		0,0002		
Vitamina B6		0,00041		
Nicotinamida		0,00086		
Vitamina C		0,01535	0,00509 ± 0,00006	
Vitamina E			0,0206 ± 0,0018	0,01334 ± 0,00001
Cálcio	0,742	0,0648	1,46 - 2,46	
Cobre		0,00569		
Ferro	0,00335	0,01336		
Fósforo		0,06125	0,37 - 0,91	
Magnésio	0,0578	0,0841	0,46 - 0,91	
Manganês	0,000685	0,00465		
Nitrogênio			1,43 - 2,84	
Potássio	0,183	0,08624	1,68 - 1,9	
Sódio	0,060	0,00825	0,6 - 0,85	
Zinco	0,000222	0,00685		

---

Em relação a constituintes isolados, do complexo polissacarídeo capsular da semente de *O. gratissimum*, foi obtida uma xilana ácida composta de D-xilose (48%), L-arabinose (16%), D-galactose (16%), e D-ácido galacturônico (20%) (ANJANEYALU, KHAN, THARANATHAN, 1983). Onajobi (1986) obteve compostos razoavelmente polares a partir do extrato lipídico bruto das folhas de *O. gratissimum*. Ácido oleanólico foi isolado a partir do resíduo metanólico das folhas (NJOKU et al., 1997), enquanto uma mistura de

hidrocarbonetos alifáticos ( $C_{31}$ ,  $C_{33}$ ,  $C_{34}$  e  $C_{35}$ ), eugenol, óxido de cariofileno e uma mistura de estigmasterol e sitosterol foram obtidos a partir da fração diclorometânica do extrato das partes aéreas de *O. gratissimum* preparado utilizando uma mistura de hexano: diclorometano: etanol (1:3:1) como líquido extrator (ROSSET et al., 2005). Posteriormente, ácido ursólico foi isolado da fração etanólica do mesmo extrato (FARIA et al., 2007).

Contudo, a maioria dos investigadores estudou o óleo essencial obtido das folhas e/ou partes aéreas de *O. gratissimum* por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG-EM). Sua composição sugere a existência de dois grandes grupos, um rico em timol (SAINSBURY, SOFOWORA, 1971; GARCÍA et al., 1998; MARTINS et al., 1999; YAYI et al., 2004; TCHOUMBOUGNANG et al., 2006) e outro rico em eugenol (JIROVETZ et al., 2003; MADEIRA et al., 2005; FREIRE, MARQUES, COSTA, 2006; TCHOUMBOUGNANG et al., 2006). Outros quimiotipos também foram relatados como o cinamato de etila (DUBEY et al., 2000) e o geraniol (VIEIRA et al., 2001). As estruturas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais e/ou compostos isolados desta espécie podem ser observadas na Figura 3.



**Figura 3 - Constituintes majoritários do óleo essencial e/ou isolados de *O. gratissimum* (FONTE: ADAMS, 2001; NJOKU et al., 1997; FARIA et al., 2007)**



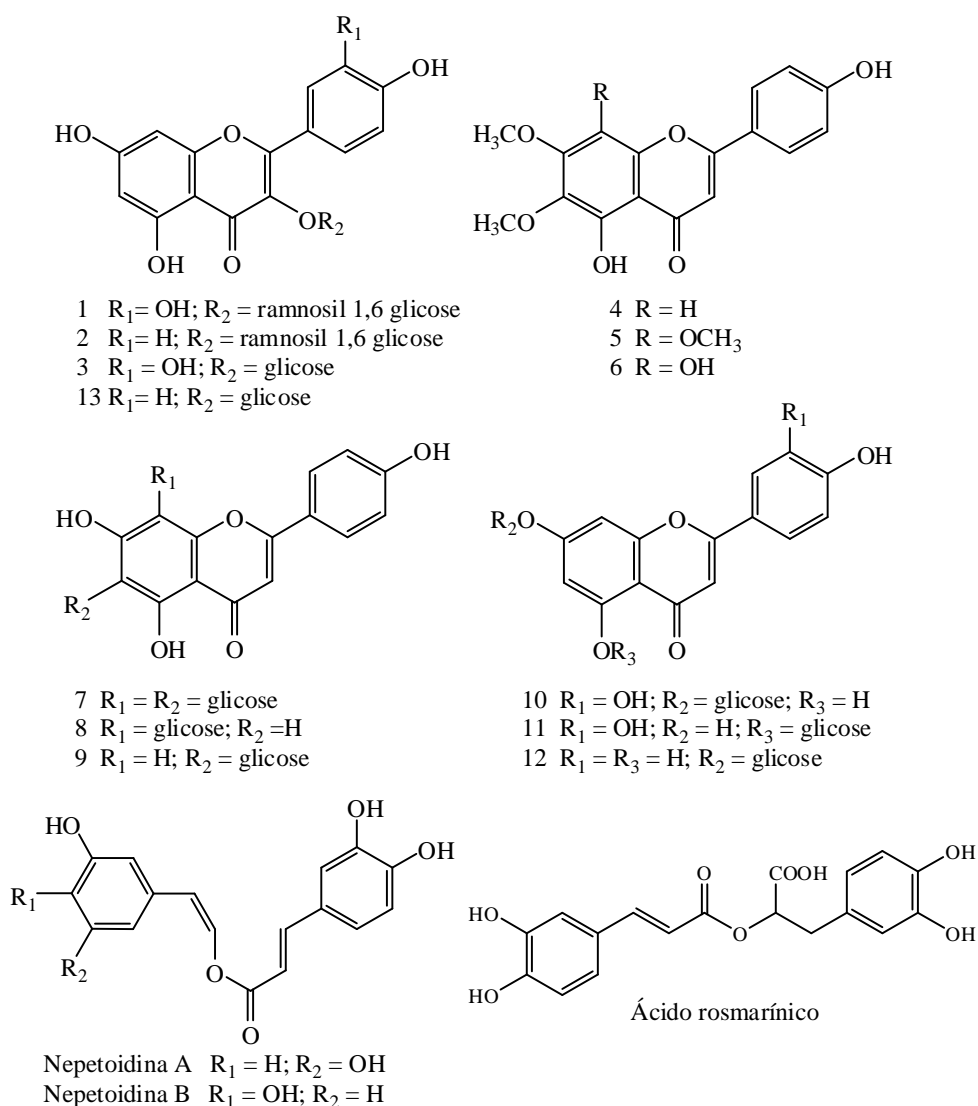
A composição química do óleo essencial obtido das folhas e/ou partes aéreas de *O. gratissimum* demonstrou variações durante o dia (SILVA et al., 1999; YAYI et al., 2004; MADEIRA et al., 2005). Para plantas do quimiotipo eugenol, o maior conteúdo deste constituinte foi encontrado nas folhas coletadas às 12 horas, enquanto o segundo constituinte majoritário, 1,8-cineol, apresentou maiores concentrações quando a coleta foi realizada às 17 horas (SILVA et al., 1999) e 8 horas (MADEIRA et al., 2005). Para plantas do quimiotipo timol, o conteúdo de timol e  $\gamma$ -terpineno mostraram variações opostas entre si durante o dia, enquanto que a soma de ambos com *p*-cimeno remontou quase constante. Em relação ao rendimento de óleo essencial obtido das partes aéreas, maiores quantidades ocorrem em plantas com 2-5 meses de idade e coletadas ao meio-dia (YAYI et al., 2004). Diferentes quantidades relativas dos constituintes majoritários do óleo essencial das folhas também foram verificadas quando o método de extração (destilação a vapor, destilação em forno de micro-ondas e extração por CO<sub>2</sub> fluido supercrítico) foi alterado (SILVA et al., 2004). Contudo, a análise sazonal verificou que eugenol e 1,8-cineol foram os constituintes mais abundantes do óleo essencial das folhas nas diferentes estações, enquanto que uma maior percentagem relativa de sesquiterpenos ocorreu na primavera (FREIRE, MARQUES, COSTA, 2006).

Vieira et al. (2001) verificou que as plantas morfológicamente descritas como *O. gratissimum* var. *gratissimum* apresentam eugenol e cirsimarina como constituintes majoritários e nos espécimes de *O. gratissimum* var. *macrophyllum* predominavam timol e xantomicrol. Diferenças quanto à composição e teor de sesquiterpenóides também foram apresentadas pelas plantas com alto teor de timol e eugenol. Além disso, as variedades contendo altos teores de flavonóides apresentaram alto teor de timol, enquanto naqueles com baixo teor de flavonóides foi detectado alto teor de eugenol. Já aqueles contendo um teor intermediário de flavonóides (mistura de cirsimarina, isotimusina, xantomicrol e luteolina) apresentaram geraniol como principal constituinte do óleo essencial.

A análise do óleo da semente de *O. gratissimum*, quimiotipo geraniol, permitiu o estudo da composição de ácidos graxos, quantificando-se os ácidos  $\alpha$ -linolênico, linoléico, palmítico, oléico, esteárico, palmitoléico,  $\gamma$ -linolênico, araquidônico e eicosanóico (ANGERS, MORALES, SIMON, 1996).

Em estudos realizados por Paton et al. (2004) observou-se que todas as espécies de *Ocimum* da tribo Ocimeae apresentaram 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavonas e flavonas oxigenadas na posição 8. Este fato confirma alguns resultados encontrados na caracterização dos flavonóides de *O. gratissimum* var. *gratissimum* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (GRAYER et al., 2000), os quais têm sua estrutura representada na Figura 4. Por meio desta análise, foram identificados quercetina-3-*O*-glicosídeos (rutina (1) e quercetina-3-*O*-glicosídeo (3)), canferol-3-*O*-glicosídeos (canferol 3-*O*-rutinosídeo (2) e canferol-3-*O*-glicosídeo (13)), agliconas de flavonas metoxiladas (cirsimaritina (4) e xantomicro (5)), luteolina-7-*O*-glicosídeo (10), luteolina-5-*O*-glicosídeo (11), apigenina-7-*O*-glicosídeos (apigenina-7-*O*-glicosídeo (12) e apigenina-7-*O*-malonilglicosídeo), apigenina-*C*-glicosídeo (vicenina-2 (7) e vitexina (8)), isotimusina (6) e isovitexina (9) (GRAYER et al., 2000, 2002). Contudo, a produção de flavonol-3-*O*-glicosídeos por esta planta demonstrou ser afetada quando a mesma cresce em ambiente fechado, enquanto que a produção de *O*- e *C*-glicosídeos de flavonas não é afetada (Grayer et al., 2002).

Grayer et al. (2000; 2003) também identificaram a presença de ácido rosmarínico e nepetoidina A e B nesta espécie (Figura 4). Estes compostos correspondem a ésteres do ácido caféico e, segundo os autores, possuem significância taxonômica para a família Lamiaceae, uma vez que estão presentes na grande maioria das espécies investigadas pertencentes à subfamília Nepetoideae e ausentes em espécies de outras subfamílias



**Figura 4- Flavonóides e compostos fenólicos identificados em *O. gratissimum* (FONTE: GRAYER et al., 2000; 2003)**

## 2.2 Métodos extrativos

O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando para isso um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (SONAGLIO et al., 2004). Dois tipos de fenômenos envolvem este processo: a difusão através da parede

celular e a transferência do conteúdo celular quando as paredes são rompidas (VINATORU, 2001).

Na escolha do método extrativo deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar (SONAGLIO et al., 2004). Metodologias tradicionais de extração, como, por exemplo, soxhlet, consomem muito tempo e maiores quantidades de solvente (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998). Assim, existe uma demanda crescente por novos métodos extrativos, com menores tempos de extração, reduzido consumo de solvente orgânico e prevenindo a poluição (WANG, WELLER, 2006).

### 2.2.1 Métodos clássicos

Métodos clássicos para a extração por solventes de constituintes vegetais são baseados na escolha do solvente acoplado ao uso de aquecimento e/ou agitação (WANG, WELLER, 2006). Estes correspondem a métodos baratos e relativamente simples com relação a seus fundamentos e desenvolvimento, o que permite que sejam realizados por pessoal não especializado (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998).

Algumas técnicas clássicas utilizadas para a extração de constituintes vegetais incluem os processos de hidrodestilação, maceração e soxhlet (WANG, WELLER, 2006), os quais serão descritos resumidamente a seguir.

#### 2.2.1.1 Hidrodestilação

Na hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger (Figura 5), o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa

por decantação (PRINS, LEMOS, FREITAS, 2006). Este procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada e é preferencialmente empregado para extrair óleos essenciais de plantas frescas (SIMÕES, SPITZER, 2004).



**Figura 5 – Hidrodestilação em aparelho de Clevenger.**

#### 2.2.1.2 Maceração

Maceração designa a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (VOIGT, 2000 apud SONAGLIO et al., 2004).

### 2.2.1.3 Soxhlet

A extração em aparelho de soxhlet (Figura 6) permite que o material vegetal entre em contato com solvente fresco condensado, oriundo do balão de destilação, a cada ciclo de operação. Quando o líquido extrativo alcança o nível de refluxo, este é sifonado retornando ao balão de destilação e carregando consigo os constituintes extraídos. Esta operação é repetida até o esgotamento total da droga vegetal (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998).



**Figura 6 - Extração em aparelho de soxhlet.**

Algumas vantagens desta metodologia incluem o deslocamento do equilíbrio difusional pelo constante contato de solvente novo com o material vegetal e a não exigência de filtração após o processo extrativo. Por outro lado, as maiores desvantagens correspondem à possibilidade de degradação térmica dos constituintes ativos, pois o líquido extrativo é aquecido à temperatura de ebulição do solvente por um longo período de tempo. Além disso, a grande quantidade de solvente utilizada, a impossibilidade de agitação do meio e a

necessidade de um procedimento de evaporação e/ou concentração para remoção do solvente após o processo também constituem algumas desvantagens deste processo (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998).

## 2.2.2 Métodos modernos de extração

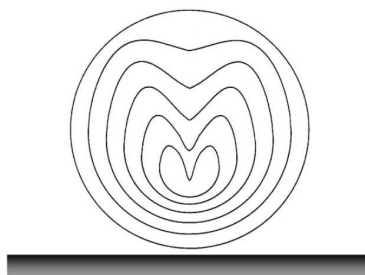
Métodos modernos de extração têm como fator comum o aumento da eficiência extrativa devido ao uso de solventes a altas temperaturas e/ou pressões, o que diminui grandemente o tempo de extração. Além disso, eles requerem menor quantidade de solvente, permitem a extração simultânea de várias amostras e podem corresponder a um processo automático, ou, até mesmo, ser de fácil automação (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998; WANG, WELLER, 2006).

Algumas destas metodologias extrativas serão descritas a seguir. Estas se baseiam no uso de ondas, como ultrassom e micro-ondas, no processo de extração do material vegetal.

### 2.2.2.1 Ultrassom

Ondas de som são vibrações mecânicas em meio sólido, líquido e gasoso com frequências maiores que 20 KHz. Ao contrário das ondas eletromagnéticas, ondas de som podem atravessar a matéria e envolvem ciclos de expansão e compressão durante sua passagem no meio. O processo de expansão separa as moléculas, enquanto que o de compressão promove sua aproximação. A expansão pode criar bolhas ou cavidades no líquido e produzir pressão negativa. As bolhas de ar se formam, crescem e colabam por implosão em processo denominado de cavitação. A rápida compressão adiabática de gases e vapores dentro de bolhas ou cavidades produz altas temperaturas e pressões. Como o tamanho das bolhas é muito pequeno quando comparado ao volume de líquido, o aquecimento produzido é rapidamente dissipado no meio. Contudo, quando próximo à superfície sólida, o colapso da

cavidade é assimétrico e produz jatos de líquido de alta velocidade (Figura 7), que tem forte impacto sobre a superfície sólida (LUQUE-GARCIA, LUQUE DE CASTRO, 2003; WANG, WELLER, 2006).



**Figura 7 – Formação de um micro-jato de líquido durante colapso da bolha próximo a superfície externa (FONTE: SUSLICK, PRICE, 1999).**

Sendo assim, os efeitos mecânicos do ultrassom induzem a grande penetração do solvente para o interior do material vegetal e aumento da transferência de massa, o que favorece o processo extrativo das seguintes formas:

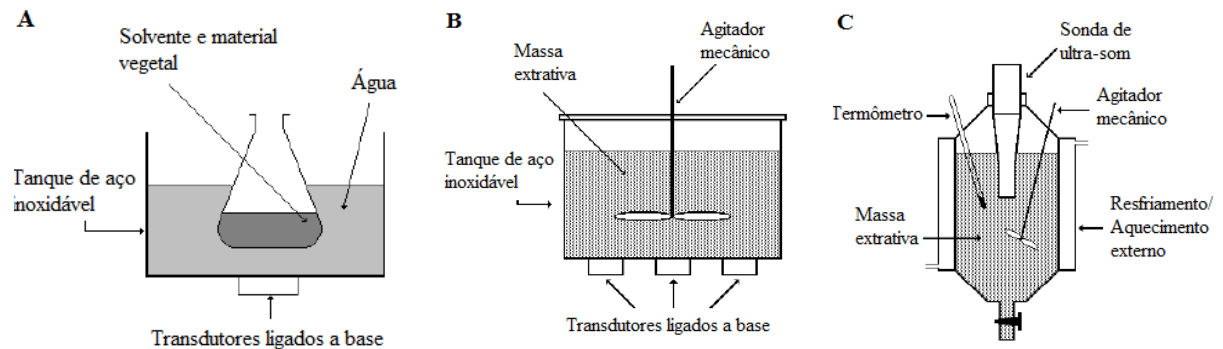
- O colapso das bolhas de cavitação próximo a parede celular vegetal promove o seu rompimento. Este fato aliado a boa penetração do solvente, decorrente da existência dos micro-jatos, facilita a liberação do conteúdo celular vegetal para o solvente extrator;

- O processo de difusão dos constituintes celulares vegetais através da parede celular é aumentado por ação do ultrassom. O inchamento e hidratação do material vegetal podem ser facilitados por este processo causando, assim, um aumento dos poros da parede celular. A expansão do tecido pode, em alguns casos, também romper a parede celular o que favorece ainda mais o processo de transferência (TOMA et al., 2001; VINATORU, 2001; WANG, WELLER, 2006).

A extração por ultrassom pode ser um processo direto ou indireto dependendo do equipamento utilizado. Por sonicação indireta, somente pequenas quantidades de material vegetal podem ser extraídas, enquanto que pelo processo direto, maiores quantidades de material podem ser utilizadas. Dentre os dois tipos de equipamentos extratores existentes (Figura 8), o banho de ultrassom pode realizar tanto um tipo de sonicação quanto o outro



dependendo do seu design. Já a sonda ultra-sônica permite a realização do processo direto apenas (VINATORU, 2001; WANG, WELLER, 2006).



**Figura 8 – Sonicação em processo indireto utilizando um banho de ultrassom (A) e em processos diretos utilizando banho (B) e sonda (C) de ultrassom (FONTE: VINATORU, 2001)**

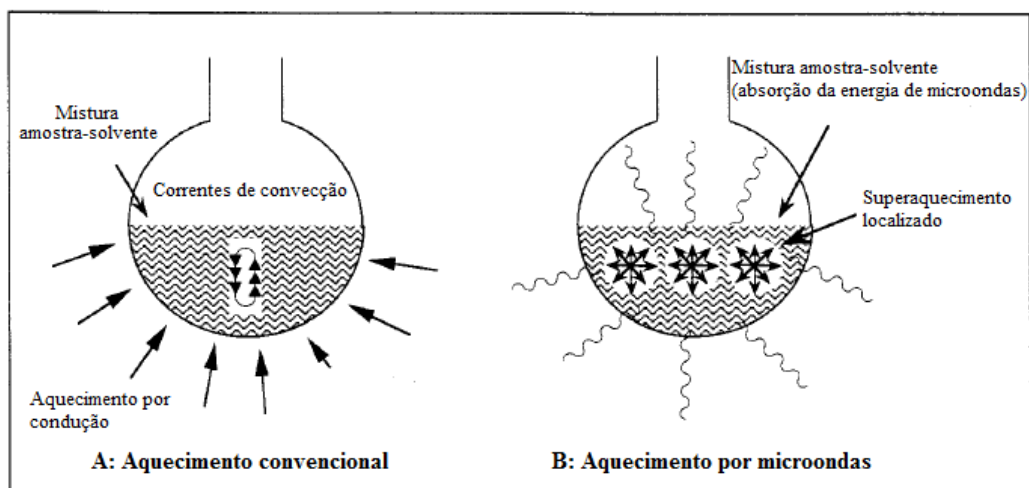
A vantagem desta técnica é a possibilidade de extração de várias amostras ao mesmo tempo desde que seja utilizado um banho de ultrassom como o exemplificado na Figura 8A. Além disso, a extração é realizada a temperatura ambiente, o que torna o método uma alternativa para extração de compostos voláteis e termolábeis. A necessidade de filtração posterior ao processo e impossibilidade de renovação do solvente extrator durante sua realização correspondem às desvantagens do uso desta metodologia (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998; ROMANIK et al., 2007).

#### 2.2.2.2 Micro-ondas

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas com uma frequência de 0,3 a 300 GHz compostas de dois campos oscilantes perpendiculares: o campo elétrico e o campo magnético. O fenômeno do aquecimento é baseado na interação do campo elétrico com os constituintes do material por dois mecanismos simultâneos, a rotação dipolar e a condução iônica. A

rotação dipolar é relacionada ao movimento de moléculas polares tentando se alinhar com o campo elétrico. Esta oscilação produz múltiplas colisões entre moléculas vizinhas gerando, assim, energia térmica que é liberada no meio. A condução iônica, por sua vez, gera aquecimento devido à resistência do meio ao fluxo de íons. Desta forma, ao contrário dos métodos clássicos de aquecimento baseados no fenômeno de condução, toda a amostra é aquecida pelas micro-ondas simultaneamente, como pode ser visualizado na Figura 9 (LETELLIER, BUDZINSKI, 1999; KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; WANG, WELLER, 2006).

Na extração de produtos naturais, as micro-ondas interagem seletivamente com as moléculas polares presentes em glândulas, tricomas ou tecidos vasculares. O aquecimento localizado leva a expansão e ruptura da parede celular e é seguida pela liberação dos constituintes dentro do solvente. Aliado a isto, a migração de íons dissolvidos aumenta a penetração do solvente dentro do material vegetal facilitando a liberação dos constituintes e favorecendo, assim, a extração (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; WANG, WELLER, 2006).



**Figura 9 – Representação dos dois modos de aquecimento: por condução (A) e por energia de micro-ondas (B) (FONTE: LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).**

Dois tipos de equipamentos podem ser utilizados neste processo. O mais comum envolve a extração em um recipiente fechado com pressão e temperatura controladas,

enquanto que o outro utiliza um recipiente extrator aberto sob pressão atmosférica. O primeiro sistema é geralmente usado para extrações sob condições drásticas e altas temperaturas extrativas (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; WANG, WELLER, 2006).

As vantagens deste tipo de extração são a redução do tempo e da quantidade de solvente necessária, em decorrência das altas temperaturas alcançadas e a possibilidade de realizar extrações de várias amostras ao mesmo tempo. Esta metodologia, contudo, requer um tempo de resfriamento e uma filtração após a sua realização. Além disso, a eficiência extrativa pode ser muito baixa quando o(s) composto(s) alvo e os solventes não são polares, ou quando os constituintes são voláteis (LUQUE DE CASTRO, GARCIA-AYUSO, 1998; LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).

## **3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS**

### **3.1 Manuscrito 2**

SILVA, L. L.; GARCIA, V. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Comparative composition of essential oils of stems, inflorescences and leaves of *Ocimum gratissimum* L. grown in southern Brazil. Submetido à Journal of the Brazilian Chemical Society.

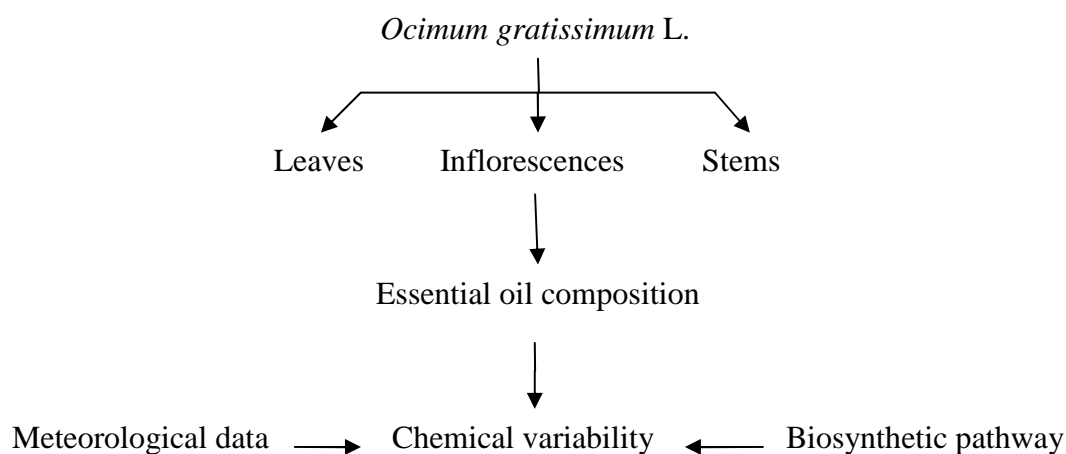
**Comparative composition of essential oils of stems, inflorescences and leaves of *Ocimum gratissimum* L. grown in southern Brazil**

Lenise L. Silva <sup>a</sup>, Viviane O. Garcia <sup>a</sup>, Carlos A. Mallmann <sup>b</sup>, Berta M. Heinzmann <sup>a,\*</sup>

(a) *Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, No. 1000, Prédio 26, Campus Universitário, Bairro Camobi, BR- 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

(b) *Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, No. 1000, Prédio 44, Campus Universitário, Bairro Camobi, BR- 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

**Graphical Abstract**



\* berta.heinzmann@gmail.com

**Comparative composition of essential oils of stems, inflorescences and leaves of *Ocimum gratissimum* L. grown in southern Brazil**

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), conhecida como alfavaca, é uma planta amplamente utilizada como medicinal e flavorizante de alimentos. O objetivo deste trabalho foi verificar variações qualitativas e quantitativas nos óleos essenciais obtidos a partir dos talos, inflorescências e folhas de *O. gratissimum* L. cultivada no Sul do Brasil em relação ao período de coleta (verão e primavera). Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG/EM. As variações de composição foram relacionadas a dados meteorológicos e as possíveis rotas biosintéticas foram discutidas. Os constituintes majoritários de todos os óleos foram eugenol (52,6 - 89,2 %) e  $\gamma$ -muuroleno (6,2 - 35,3 %). Apenas os óleos essenciais das inflorescências e talos tiveram seus rendimentos influenciados pela estação de coleta. A pequena variação no teor de eugenol presente no óleo essencial das folhas indicou ser esta a melhor parte do vegetal para a obtenção deste composto.

The herb *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), known as alfavaca, is widely used medicinally and as a flavoring for food. The aim of this study was to assess qualitative and quantitative variations in essential oils from stems, inflorescences and leaves of *O. gratissimum* L. grown in southern Brazil, according to the harvest period (spring and summer). The essential oils were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. The variations in the composition were related to meteorological data, and possible biosynthetic pathways are discussed. The major compounds of all essential oils were eugenol (52.6 - 89.2 %) and  $\gamma$ -muurolene (6.2 - 35.3 %). The harvest season influenced only the yields of inflorescence and stem essential oils. The low seasonal variation of eugenol in the essential oil of the leaves indicated that these are the best source to obtain this compound.

*Key words:* *Ocimum gratissimum* L.; essential oil.

## 1. Introduction

The genus *Ocimum* belongs to an economically important group of herbaceous plants that are extensively used in flavoring and perfumery, because of their essential oils.<sup>1-2</sup> One of the most important species is *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), commonly known as alfavaca, louro or tree basil. This herb grows to 50-250 cm, has a woody base, and is aromatic. It is a perennial or annual bush in colder regions, including southern Brazil, where it is found in coastal areas, forest and dry savanna, always close to human dwellings. It is widely used medicinally and to flavor food.<sup>3-7</sup> The essential oil of this plant has shown potential use as a food preservative, because of its antimicrobial activity.<sup>8-9</sup> It could also be used as a source of eugenol, a drug with local anesthetic properties that is utilized in human medicine and dentistry.<sup>10-11</sup>

Vieira et al.<sup>5</sup> described three chemotypes (eugenol, timol and geraniol) for *O. gratissimum* based on morphological, chemical and genetic analyses. Variations in the chemical composition of essential oil during daytime and seasonally related to its central activity have been reported.<sup>11-12</sup> The aim of the present study was to assess the qualitative and quantitative variations in the constituents of essential oils from the stems, inflorescences and leaves of *O. gratissimum* of the eugenol chemotype grown in southern Brazil, in two harvest periods (spring and summer). The observed differences in the chemical composition of the essential oils were related to meteorological data, and possible biosynthetic pathways were discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials

Aerial parts of *Ocimum gratissimum* L. were grown and collected in the late spring (December 13, 2006) and summer (March 13, 2007) in the campus of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The inflorescences, leaves and stems were separated by hand. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Biology Department of the Federal University of Santa Maria (Voucher no. SMDB 11167), and identified by Adelino Alvares Filho.

## 2.2. *Obtaining the essential oils*

Fresh aerial parts (inflorescences, leaves and stems) were separately steam-distilled for 3h in a Clevenger-type apparatus. Stem essential oils were separated from the hydrolate by liquid-liquid extraction with hexane and evaporated under reduced pressure at 40°C. The essential oils were stored at -20°C in amber glass bottles until GC-MS analysis.

## 2.3. *GC-MS analysis conditions*

Samples of the essential oils were solubilized in hexane. GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, under the following conditions: HP5-MS column (5%-phenyl - 95%-methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); EI-MS: 70 eV; Operating conditions: split inlet 1:100; temperature program, 40-260°C; 40°C for 4 min; ramp rate, 4°C/min; carrier gas He: flow rate, 1 mL/min; injector and detector temperature, 220°C; interface temperature 250°C; Databank NIST 1998. Retention indexes (RI) were determined by co-injection of a mixture of hydrocarbon standards. The oil components were identified by comparison of the mass



spectra with the mass spectral library, and the Kovats retention index (KI) with literature data.<sup>13</sup>

#### *2.4. Meteorological data*

The meteorological data (Table 1) were obtained from the National Meteorological Institute (INMET) from the Climatological Station of the 8th District of Meteorology, located at Santa Maria Federal University (29° 43' 23" S and 53° 43' 15" W).

< Table 1 >

### **3. Results and discussion**

Essential oil yield of the eugenol chemotype was highest in the leaves, followed by inflorescences and stems, as previously reported by Kothari et al.<sup>14</sup> In the present study, the overall yield of oil obtained from the leaves was not influenced by the harvest season. However, inflorescences and stems gave inverse yields according to the season. The major compounds of all essential oils were eugenol (52.6 - 89.2 %) and  $\gamma$ -muurolene (6.2 – 35.3 %). Leaf and inflorescence essential oils were richer in eugenol than stem oils, which showed high sesquiterpenoid contents (45.3 % in the spring and 31.5% in the summer). Stem oils also showed higher quantitative variations in the main constituents according to the harvest season (Table 2).

< Table 2 >

Oil yields and eugenol content obtained in this study were higher than described in the literature for parts from plants grown in a semi-arid tropical climate.<sup>14</sup> The eugenol content in

essential oils of the leaves was also higher than previously reported for plants grown in southeast Brazil and analyzed seasonally.<sup>11</sup> These differences among studies may be related to different environmental factors such as light, temperature, and moisture status. These factors can greatly influence the emission of volatiles and the yield and composition of essential oils.<sup>15</sup> In *Ocimum basilicum*, for example, Chang et al.<sup>16</sup> observed a significant increase in eugenol content in leaves exposed to high daily light totals. In the present study, the higher number of sunshine hours (Table 1) in the spring showed a small positive effect on the yield and composition of the leaf essential oil, and a slight negative effect on the stem essential oil.

In Lamiaceae, which includes basil, surface glandular trichomes distributed throughout the aerial parts produce and store monoterpenoid, sesquiterpenoid, and phenylpropanoid volatiles. However, trichome density varies with ontogeny and in different tissues; e.g., density is higher on the lower (abaxial) surface than the upper (adaxial) surface of leaves.<sup>17-18</sup> These differences may be responsible for the different oil yields from various parts of the plant.

Another factor that can influence the oil yield is precipitation. Continuous rain may result in loss of substances from the leaves by leaching.<sup>19</sup> In the summer, precipitation was higher than in the spring, and the inflorescence oil yield decreased. Leaf oil yield was less influenced, while stem oil was more affected.

Regarding other constituents, only leaf essential oils contained monoterpenoids, and showed only one compound of this class, *Z*- $\beta$ -ocimene. The absence of monoterpenoids might be a result of plant metabolism and/or mechanical damage to the plant.<sup>20</sup> Observations on certain essential-oil plants such as *Perilla* and *Ocimum* have suggested that the synthesis of essential oil phenylpropanoids, especially eugenol and related compounds, is based on dominant or epistatic effects, whereas the production of monoterpenoids is a recessive or

hypostatic trait.<sup>18</sup> Furthermore, total amounts of terpenoids were negatively correlated with levels of phenylpropanoids and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in *O. basilicum*.<sup>17</sup> The results obtained in this study for the essential oil composition of different parts of *O. gratissimum* agree with previous observations by others.

Biogenetically, phenylpropanoids and terpenoids originate from different primary metabolic precursors and are generated through wholly different biosynthetic routes, as shown in Figure 1 (eugenol biosynthesis scheme) and Figure 2 (terpenoid biosynthesis scheme).

< Figure 1 >

The eugenol biosynthesis pathway (Figure 1) starts with deamination of phenylalanine [1] by phenylalanine ammonia lyase (PAL), producing cinnamic acid [2], which originates *p*-coumaric acid [3] through cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H). As a minor route, coumarate may arise directly from tyrosine under the catalytic action of tyrosine ammonia lyase (TAL) (not shown). The *p*-coumaric acid [3] can form caffeic acid [9] by 3-hydroxylation carried out by an uncharacterized enzyme (C3H), or its carboxyl group can be activated by the formation of a thioester bond with CoA [5] through *p*-coumaroyl:CoA ligase (4CL). This enzyme also catalyzes the formation of CoA esters of cinnamic acid [4], caffeic acid [8] and ferulic acid [11]. The formation of *p*-coumaroyl-CoA [5] from cinnamoyl-CoA [4] (CC4H) and caffeoyl-CoA [8] from *p*-coumaroyl-CoA [5] (CC3H) has been proposed in the literature, although the genes for the enzymes that catalyze these process are yet to be identified.<sup>18, 21-23</sup>

For the formation of caffeoyl-CoA [8] from *p*-coumaroyl-CoA [5] some intermediaries have been described. Shikimate and quinate coumaroyl esters [6, 6'] are formed from *p*-coumaroyl-CoA [5] under the action of acyltransferases such as hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) and *p*-coumaroyl-CoA: shikimate acid *p*-coumaroyl transferase (CST). Their hydroxylation in the meta-position of the phenolic

ring forms 5-O-caffeoyl shikimate and/or quinate esters [7, 7']. Shikimate esters are the preferred substrate of CYP98A3 and CYP98A13, which catalyze these hydroxylation reactions and function as a 5-O-(4-coumaroyl) shikimate/ quinate-3'hydroxylase (C3'H). 5-O-caffeoyl shikimate and/or quinate esters [7, 7'] originate caffeoyl-CoA [8] by the same acyltransferases previously reported.<sup>22, 24</sup>

Caffeic acid [9] and caffeoyl-CoA [8] give rise to ferulic acid [10] and feruloyl-CoA [11], respectively, through methylation of the phenyl ring carried out by two S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent O-methyltransferases (OMT), caffeic acid 3-OMT (COMT) and caffeoyl-CoA OMT (CCOMT). Cinnamoyl-CoA:NADPH oxidoreductase (CCR) catalyzes the reduction of feruloyl-CoA [11] to coniferyl aldehyde [12], which is reduced to the corresponding alcohol [13] by NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (Gang et al., 2001; Ferrer et al., 2008). Coniferyl alcohol [13] is acetylated by coniferyl alcohol acyltransferase (CFAT), forming coniferyl acetate [14], the precursor of eugenol. Eugenol [15] is formed under the catalytic action of eugenol synthase (EGS1) through a two-step reaction involving the formation of a quinone-methide intermediate prior reduction.<sup>25-26</sup> However, coniferyl alcohol [13] is also the monolignol precursor of guaiacyl, one of the lignin-forming units.<sup>23</sup> Consequently the lower concentration of eugenol in the stem essential oil may be due to the direction of the biosynthetic route towards the formation of lignin rather than towards the formation of eugenol.

The biosynthesis of terpenoids (Figure 2) proceeds via the fusion of the activated 5-carbon isoprenoid units, isopentenyl diphosphate (IPP) [16] and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) [17], derived from the acetate/mevalonate or methylerythritol phosphate pathways. The C<sub>5</sub> units are condensed by prenyltransferases to form elongated linear prenyl diphosphates, among which are geranyl diphosphate (GPP, a C<sub>10</sub> compound) [18] and farnesyl

diphosphate (FPP, a C<sub>15</sub> compound) [23]. The conversion of the GPP and FPP to monoterpenoids and sesquiterpenoids, respectively, is carried out by a large family of enzymes known as terpene synthases.<sup>15,27</sup>

< Figure 2 >

GPP [18] ionization to the allylic linalyl cation [19] allows the formation of linalyl diphosphate (LPP) [20, 20'], and allows the cyclization *via* the stereochemically favorable linalyl cation [21]. This intermediate can form *Z*-ocimene [22] by the deprotonation of C-4.<sup>28-</sup>  
<sup>29</sup> It is possible that the few biosynthetic steps necessary to synthesize this compound have favored its presence as the only monoterpenoid in the essential oils studied.

Sesquiterpenoids biosynthesis begins with the ionization and subsequent isomerization of FPP [23] to the corresponding tertiary allylic isomer, nerolidyl diphosphate (NDP). Transoid [24] or cisoid [25] conformers of NDP allow formation of  $\beta$ -caryophyllene [26] through closures from C-11 to C-1 and from C-2 to C10 following deprotonation of C-15.<sup>30</sup>

For sesquiterpenoids with a cadinane skeleton, such as those observed in essential oils of *O. gratissimum* ( $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -ylangene,  $\delta$ -cadinene and  $\alpha$ -cadinol), two biosynthesis routes are described. The first is initiated by ionization of the transoid- NDP [24], with C-10 to C-1 (farnesyl backbone numbering) ring closure, to afford the germacreanyl cation A [27] from which deprotonation, following hydride shift, yields germacrene D [28]. Protonation and rearrangement of this compound forms a cation [29] that cyclizes to a cadinyl cation [30]. As a second alternative, the cisoid-conformer of NDP [25] may serve as a substrate. In this case, the cyclization of [25] occurs from the germacreanyl cation B [31], which by a 1,3-hydride shift produces the cation [29]. The cadinyl cation [30] may give rise to  $\delta$ -cadinene [32] by deprotonation, or cyclize to  $\alpha$ -copaene [33] and/or  $\alpha$ -ylangene [34] through ring closure from

C-2 to C-7, followed by deprotonation. The reaction of [30] with water would lead to formation of  $\alpha$ -cadinol [38].<sup>28, 30-32</sup>

Although germacrene D [28] was not observed in the oil composition of *O. gratissimum*, this does not exclude it as a biosynthetic intermediate. Investigations of the (+)- $\delta$ -cadinene synthase from cotton (*Gossypium hirsutum*) also did not reveal any germacrene D in its products. The explanation may be that germacrene D is tightly bound to the enzyme as a primary cyclization product and be immediately further rearranged. Furthermore, this compound [28] forms  $\gamma$ -muurolene [37],  $\delta$ -cadinene [32] and/or  $\alpha$ -copaene [33] as primary products of its rearrangement in acid media. These reactions could involve deprotonation of the muurolenyl cation [36], formed through cyclization of the cation [35], which results from the conformational change of the cation [29].<sup>31</sup>

Bülow and König<sup>31</sup> showed that photochemical conversion of germacrene D furnishes muurolane- and bourbonane-type sesquiterpenoids. This may explain the higher  $\gamma$ -muurolene contents in inflorescence and stem oils obtained in the spring, when insolation was higher. However, the  $\beta$ -bourbonene content in the inflorescence essential oils did not change appreciably between seasons.

The biosynthesis of  $\beta$ -bourbonene [39] is still unknown.<sup>31</sup> Reactions of cyclization of cation [29] through ring closure from C-7 to C-1 and from C-6 to C-2, followed by deprotonation of C-15, have been proposed as involved in its formation.<sup>33</sup>

#### 4. Conclusion

All parts of *O. gratissimum* harvested in southern Brazil may be good sources of eugenol. Environmental and/or biogenetic factors may be responsible for the observed qualitative and quantitative variations in essential oils from different parts of the plant in the seasons studied. However, leaf essential oil was shown to be the best source of this compound

because of its high yield, high percentage, and the small seasonal variations in yield and eugenol content.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to CAPES for financial support.

## References

1. Orafidiya, L. O.; Agbani, E. O.; Iwalewa, E. O.; Adelusola, K. A.; Oyedapo, O. O.; *Phytomedicine* **2004**, 11, 71.
2. Tchoumboungang, F.; Amvam Zollo, P. H.; Aviessi, F.; Alitonou, G. A.; Sohounhloue, D. K.; Ouamba, J. M.; Tsomambet, A.; Okemy-Andissa, N.; Dagne, E.; Agnaniyet, H.; Bessière, J.M.; Menut, C.; *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18, 194.
3. Albuquerque, U. P.; Andrade, L. H. C.; *Anales Jard. Bot. Madrid* **1998**, 56, 43.
4. Albuquerque, U. P.; Andrade, L. H. C.; *Anales Jard. Bot. Madrid* **1998**, 56, 107.
5. Vieira, R. F.; Grayer, R. J.; Paton, A.; Simon, J. E.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, 29, 287.
6. Ehlert, P. A. D.; Luz, J. M. Q.; Innecco, R.; *Hortic. Bras.* **2004**, 22, 10.
7. Paton, A. J.; Springate, D.; Suddee, S.; Otieno, D.; Grayer, R. J.; Harley, M. M.; Willis, F.; Simmonds, M. S. J.; Powell, M. P.; Savolaine, V.; *Mol. Phylogenet. Evol.* **2004**, 31, 277.
8. Fandohan, P.; Gbenou, J. D.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W. F. O.; Wingfield, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6824.
9. Nguéfack, J.; Leth, V.; Amvam Zollo, P. H.; Mathur, S. B.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94, 329.
10. Costa, P. R. R.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 357.
11. Freire, C. M. M.; Marques, M. O. M.; Costa, M.; *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 105, 161.
12. Silva, M. G. V.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Alencar, J. W.; *Fitoterapia* **1999**, 70, 32.



13. Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
14. Kothari, S. K.; Bhattacharya, A. K.; Singh, K.; Ramesh, S. I.; Rao, E. V. S. P.; *J. Essent. Oil Res.* **2005**, 17, 212.
15. Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J.; *Plant Physiol.* **2004**, 135, 1893.
16. Chang, X.; Alderson, P. G.; Wright, C. J.; *Environ. Exp. Bot.* **2008**, 63, 216.
17. Iijima, Y.; Davidovich-Rikanati, R.; Fridman, E.; Gang, D. R.; Bar, E.; Lewinsohn, E.; Pichersky, E.; *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3724.
18. Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F.; Sangwan, R. S.; *Plant Growth Regul.* **2001**, 34, 3.
19. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 374.
20. Figueiredo, R.; Rodrigues, A. I.; Costa, M. C.; *Food Chem.* **2007**, 104, 1445.
21. Gang, D. R.; Wang, J.; Dudareva, N.; Nam, K. H.; Simon, J. E.; Lewinsohn, E.; Pichersky, E.; *Plant Physiol.* **2001**, 125, 539.
22. Boudet, A. M.; *Phytochemistry* **2007**, 68, 2722.
23. Ferrer, J. L.; Austin, M. B.; Stewart Jr., C.; Noel, J. P.; *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, 46, 356.
24. Gang, D. R.; Beuerle, T.; Ullmann, P.; Werck-Reichhart, D.; Pichersky, E.; *Plant Physiol.* **2002**, 130, 1536.

25. Koeduka, T.; Fridman, E.; Gang, D. R.; Vassão, D. G.; Jackson, B. L.; Kish, C. M.; Orlova, I.; Spassova, S. M.; Lewis, N. G.; Noel, J. P.; Baiga, T. J.; Dudareva, N.; Pichersky, E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 130, 10128.
26. Louie, G. V.; Baiga, T. J.; Bowman, M. E.; Koeduka, T.; Taylor, J. H.; Spassova, S. M.; Pichersky, E.; Noel, J. P.; *PLoS One* **2007**, 2(10), e993.
27. Schnee, C.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J.; *Plant Physiol.* **2002**, 130, 2049.
28. Dewick, P. M.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 181.
29. Shelton, D.; Zabarás, D.; Chohan, S.; Wyllie, S. G.; Baverstock, P.; Leach, D.; Henry, R.; *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, 42, 875.
30. Steele, C. L.; Crock, J.; Bohmann, J.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2078.
31. Bülow, N.; König, W. A.; *Phytochemistry* **2000**, 55, 141.
32. Isaksson, D.; Doctoral Thesis, Mid Sweden University, Sweden, 2006.
33. Barros, F. M. C.; Zambarda, E. O.; Heinzmann, B. M.; Mallmann, C. A.; *Quim. Nova*, in the press.

Table 1

Meteorological data recorded in the collection periods

	December 2006 (Spring)	March 2007 (summer)
Mean air temperature (°C)	25.8	24.2
Hours of sunshine	262.8	162.5
Air relative humidity (%)	70	83
Total precipitation (mm)	84.2	173.6
Days with rain	8	10

Table 2

Chemical composition of essential oils of leaves, inflorescences and stems of *Ocimum gratissimum* L. in spring and summer.

Season	Spring (December/2006)									Summer (March/2007)									RI ref
	Leaves			Inflorescences			Stems			Leaves			Inflorescences			Stems			
Yield % (w/w)	0.7788			0.5991			0.0026			0.7492			0.2191			0.0059			
Constituents	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	
<i>Z</i> - $\beta$ -Ocimene	1.6	15.33	1039	-	-	-	-	-	-	2.3	15.32	1038	-	-	-	-	-	-	1037
Eugenol	89.2	26.91	1360	81.9	26.89	1359	52.6	26.89	1359	88.8	26.89	1359	83.3	26.89	1359	67.0	26.9	1359	1359
$\alpha$ -Ylangene	0.7	27.49	1377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1375
$\alpha$ -Copaene	-	-	-	1.6	27.49	1377	-	-	-	-	-	-	1.3	27.50	1377	-	-	-	1377
$\beta$ -Bourbonene	0.5	27.78	1386	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	27.79	1386	-	-	-	1388
$\beta$ -Caryophyllene	1.8	28.91	1421	3.1	28.90	1421	3.4	28.90	1421	2.5	28.90	1421	2.7	28.90	1421	3.7	28.90	1421	1419
$\gamma$ -Muurolene	6.2	30.83	1483	12.6	30.83	1483	35.3	30.83	1483	6.4	30.83	1483	10.6	30.83	1483	25.9	30.83	1483	1480
$\delta$ -Cadinene	-	-	-	0.8	32.10	1526	4.6	32.09	1525	-	-	-	0.5	32.10	1526	1.0	32.09	1525	1523
$\alpha$ -Cadinol	-	-	-	-	-	-	0.9	35.88	1658	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1654
Total identified	100			100			96.8			100			99.1			97.6			

% : Relative percentage; Rt : Retention time; RI cal : calculated Kovats retention index; RI ref : reference Kovats retention index

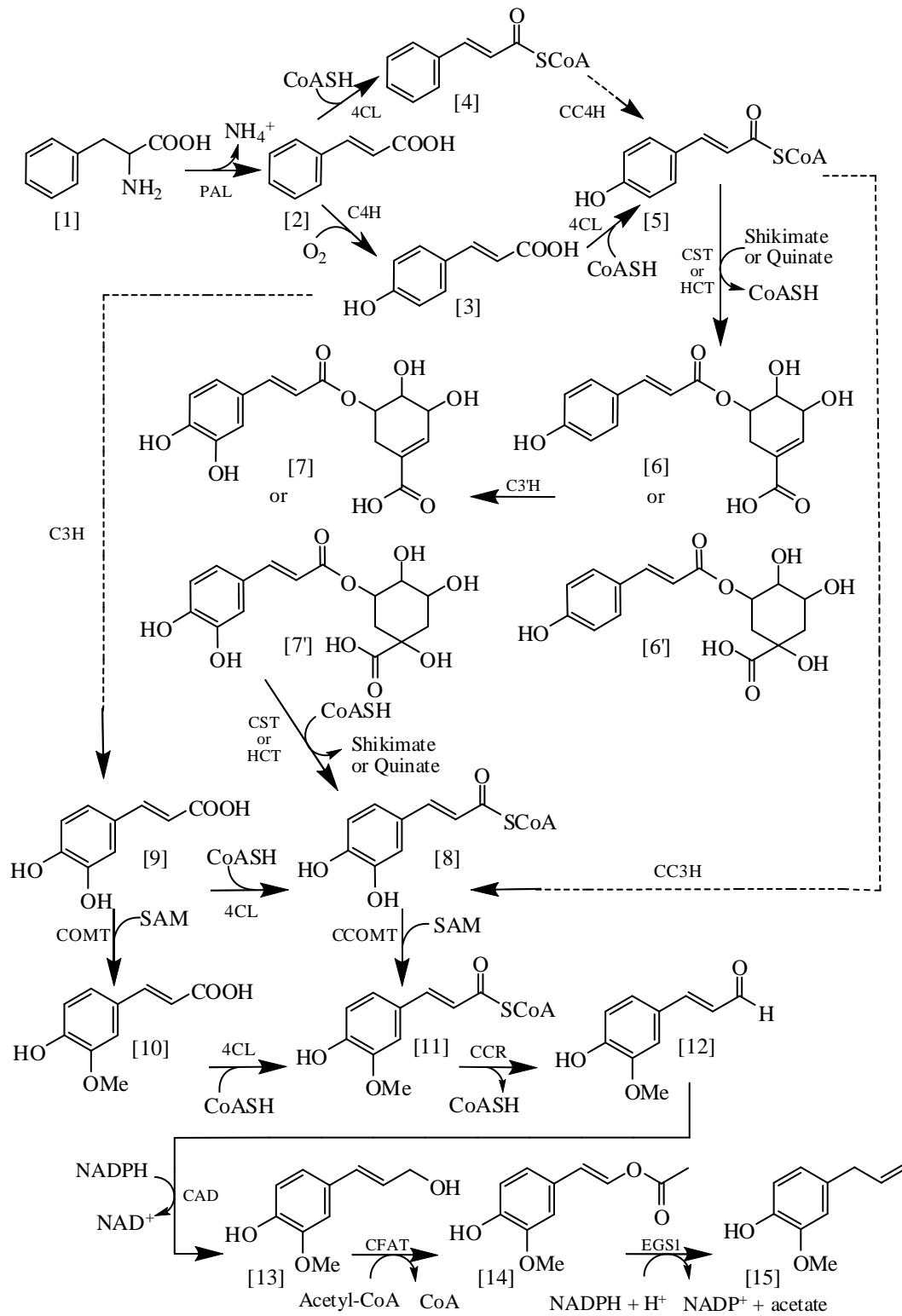


Figure 1

Eugenol biosynthesis pathway. Single arrows indicate verified transformations; dashed arrows are hypothesized conversions.<sup>21, 23-26</sup>

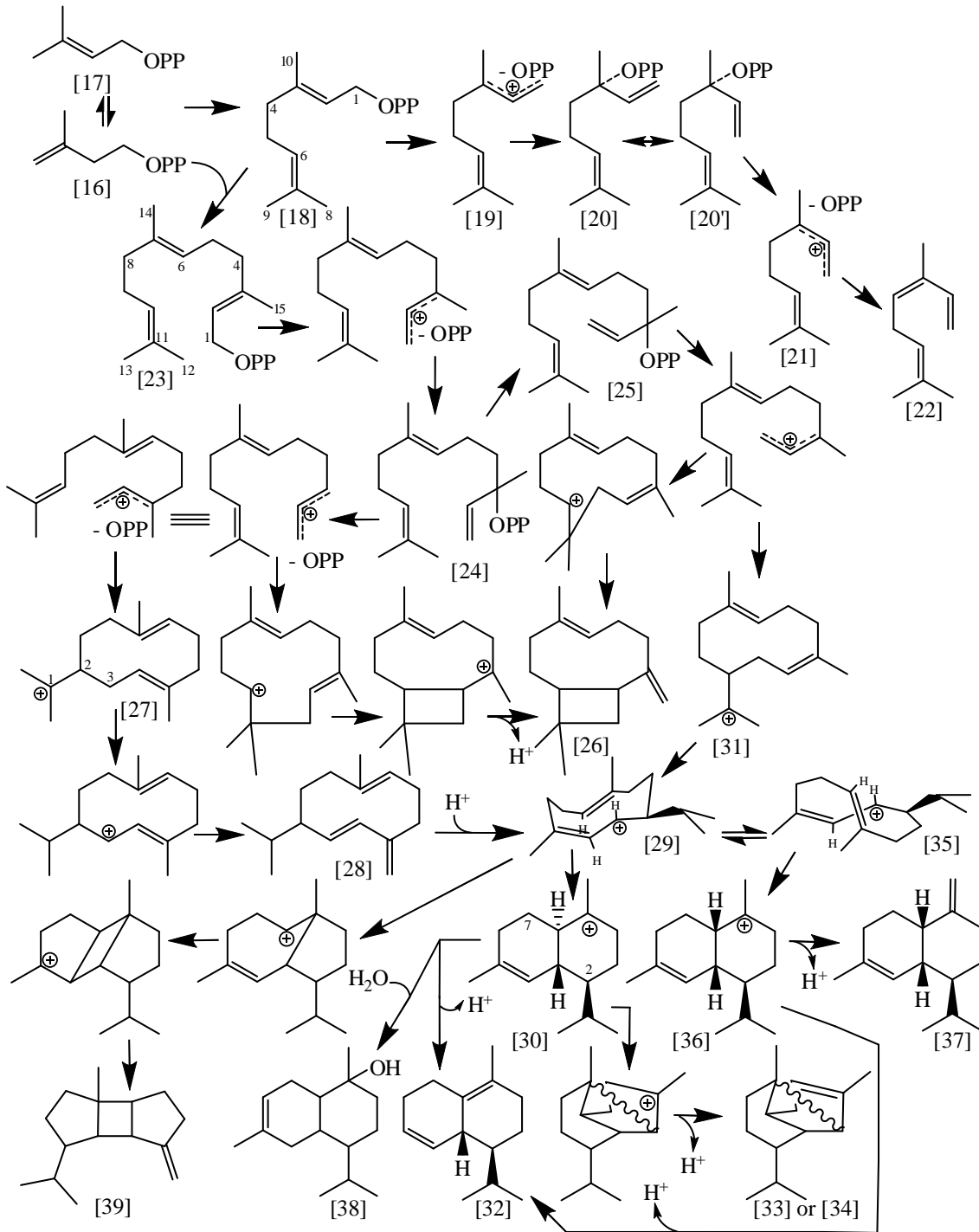


Figure 2

Terpenoid biosynthesis pathway.<sup>15, 27-33</sup>

### 3.2 Manuscrito 3

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. Submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.

**Composição química, atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L.**

**Lenise L. Silva<sup>1</sup>, Clarissa G. Heldwein<sup>1</sup>, Luiz G. B. Reetz<sup>2</sup>, Rosmari Hörner<sup>2</sup>, Carlos A. Mallmann<sup>3</sup>, Berta M. Heinzmann<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 44, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

**RESUMO:** O óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. foi obtido por hidrodestilação e analisado por CG/EM. Os constituintes majoritários identificados foram eugenol (81,94%) e  $\gamma$ -muuroleno (12,58%). O óleo essencial das inflorescências demonstrou atividade antibacteriana frente a todas as cepas bacterianas testadas pelo método de microdiluição em caldo. Os valores obtidos de concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) variaram, respectivamente, entre 0,5-2 mg/mL e 1-4 mg/mL. Valores de CL<sub>50</sub> de 233,8 (200,7 - 272,0)  $\mu$ g/mL para o óleo essencial e 186,1 (144,1 - 228,5)  $\mu$ g/mL para o composto eugenol, utilizado como padrão, foram observados para *Artemia salina* L.



**Unitermos:** *Ocimum gratissimum*, inflorescências, óleo essencial.

\* E-mail: berta.heinzmann@gmail.com; Tel.: +55 55 3220 8955

**ABSTRACT: Chemical composition, antibacterial activity and toxicity of the essential oil from inflorescences of *Ocimum gratissimum* L.:** The essential oil obtained by hydrodistillation of the inflorescences of *Ocimum gratissimum* L. was analyzed by GC/MS. The main constituents were eugenol (81.94%) and  $\gamma$ -muurolene (12.58%). Antibacterial activity was verified against all strains tested by means of the broth microdilution method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values obtained ranged between 0.5-2 mg/mL and 1-4 mg/mL respectively. Toxicity by brine-shrimp (*Artemia salina* L.) bioassay showed LC<sub>50</sub> value of 233.8 (200.7 - 272.0)  $\mu$ g/mL for the essential oil and 186.1 (144.1 - 228.5)  $\mu$ g/mL for eugenol, used as a standard.

Keywords: *Ocimum gratissimum*, inflorescences, essential oil.

## INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido realizados com produtos do metabolismo vegetal secundário, visando encontrar substâncias com atividade antimicrobiana que possam servir como alternativas terapêuticas efetivas contra as infecções por microrganismos resistentes a antibióticos (Acosta et al., 2003). Uma das maiores fontes de pesquisa nessa área é a confirmação da atividade de plantas utilizadas popularmente com esse fim. *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), conhecida popularmente como alfavaca, é utilizada no Brasil como anti-séptico local contra fungos e bactérias (Matos, 1994; Morais et al., 2005; Silva et al., 2006). Devido a esta atividade, é uma das espécies consideradas para inclusão no programa de fitoterapia do Sistema Único de Saúde (SUS). Suas inflorescências em particular

são utilizadas para o tratamento de problemas digestivos, flatulência, gripe, tosse, prurido, estresse, dor de cabeça, fadiga e como expectorante e sedativo (Alcântara Júnior et al., 2005; Albuquerque et al., 2007).

As partes aéreas de *O. gratissimum* fornecem óleo essencial, que pode ser classificado em três quimiotipos (eugenol, timol e geraniol) de acordo com seus constituintes principais (Vieira et al., 2001). A literatura relata para esta espécie as atividades antinociceptiva (Rabelo et al., 2003), antioxidante (Trevisan et al., 2006) e antimicrobiana (Jedličková et al., 1992; Nguéfack et al., 2004). Contudo, não existem trabalhos relacionando estudos biológicos à composição química do óleo essencial obtido exclusivamente das inflorescências de *O. gratissimum*.

A avaliação de toxicidade é indispensável para considerar um tratamento seguro (Cáceres, 1996). O teste de letalidade com *Artemia salina* L. é um método simples na pesquisa de produtos naturais (Meyer et al., 1982), que possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (Parra et al., 2001). O procedimento determina valores de concentração letal média (CL<sub>50</sub>), em µg/mL, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (Meyer et al., 1982).

O presente trabalho relata a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido das inflorescências de *O. gratissimum* frente a cepas bacterianas catalogadas e isolados clínicos, bem como sua toxicidade para *Artemia salina* L., correlacionando estas atividades com sua composição química.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

As inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas em dezembro de 2006 no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Material testemunha

identificado por Adelino Alvares Filho encontra-se depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM sob o registro nº SMDB 11167.

### **Obtenção do óleo essencial e identificação dos constituintes**

A extração do óleo essencial das inflorescências (224,3 g) de *O. gratissimum* foi realizada pelo método de hidrodestilação por 3 h, utilizando o aparelho de Clevenger modificado (Farmacopéia Brasileira, 1988). O óleo essencial foi armazenado em frasco de vidro âmbar vedado e conservado à -20°C até o momento das análises.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), visando à identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial, foram realizadas em um sistema hifenado AGILENT 6890, equipado com um detector seletivo de massas série 5973, conforme metodologia descrita por Murari et al. (2008).

### **Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial**

A atividade antibacteriana do óleo essencial foi avaliada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (NCCLS, 2003), conforme descrito por Murari et al. (2008). Foram testadas cepas bacterianas catalogadas e isolados clínicos do Hospital Universitário de Santa Maria (Tabela 2).

O óleo essencial foi dissolvido em etanol 95% de forma a obter uma solução estoque com concentração de 160 mg/mL. Diluições em série foram realizadas de forma a obter concentrações entre 8 – 0,0156 mg/mL. Ampicilina foi utilizada como antibiótico padrão, em concentrações entre 10-0,00976 mg/mL, 2-0,00195 mg/mL e 0,1-0,0000976 mg/mL, determinadas de acordo com o perfil de resistência microbiana. Controles negativo, positivo e do produto foram realizados para cada bactéria testada. Todos os testes foram efetuados em triplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição, conforme detectado a olho nu, enquanto que a concentração bactericida mínima (CBM) é a menor concentração em que o composto é capaz de agir como bactericida.

### **Teste de toxicidade para *Artemia salina* L.**

O teste de toxicidade com náuplios de *Artemia salina* (Leach) foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Vanhaecke et al. (1981). Os ovos de *A. salina* (30 mg) foram eclodidos entre 22-29°C em salina artificial (23 g/L de sal marinho e 0,7 g/L de bicarbonato de sódio em água destilada). Após 24 horas, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para placas de petri contendo 9 mL de salina artificial e 1 mL da amostra a ser testada. Os testes foram realizados em triplicata, em duas repetições. A contagem dos náuplios mortos e vivos foi realizada após 24 h.

O óleo essencial (103 mg) foi dissolvido em etanol (1 mL) e diluído em salina artificial de forma a obter concentrações finais de 515, 257,5, 103 e 10,3 µg/mL. Eugenol foi utilizado como substância padrão, em concentrações finais de 514, 257, 135,1 e 13,5 µg/mL. Controle negativo foi realizado com etanol diluído 1:100 em salina artificial. Os valores de CL<sub>50</sub> e seus intervalos de confiança de 95% foram calculados por análise de Probitos (Tabela 2).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As inflorescências de *O. gratissimum* forneceram 0,6% (m/m) de óleo essencial contendo cinco constituintes (Tabela 1) identificados através da análise por CG/EM. O composto majoritário, identificado como eugenol (81,94%), determina o quimiotipo do material vegetal estudado.

**“Tabela 1”**

Rendimentos e composição química similares aos obtidos neste estudo foram verificados por Vieira et al. (2001) para o óleo essencial obtido das partes aéreas de *O. gratissimum*. Contudo em relação ao óleo obtido apenas das inflorescências de plantas do quimiotipo eugenol, o rendimento, teores de eugenol e  $\beta$ -cariofileno obtidos neste trabalho foram superiores aos valores reportados anteriormente por Kothari et al. (2005).

Dentre os sesquiterpenos identificados constata-se a relativa predominância de compostos com esqueleto cadinano ( $\gamma$ -muuroleno,  $\alpha$ -copaeno e  $\delta$ -cadineno). A origem biossintética comum destes compostos a partir do cátion germacradienílico ou (*E*, *Z*)-germacrílico pode ser uma possível explicação para este fato (Steele et al., 1998; Bülow; König, 2000).

Monoterpenos não foram detectados no óleo essencial das inflorescências de *O. gratissimum*. A ausência destes constituintes tem sido relacionada ao metabolismo vegetal e/ou dano mecânico à planta (Figueiredo et al., 2007). Para plantas dos gêneros *Ocimum* sp. e *Perilla* sp. tem sido sugerido que a síntese de fenilpropanóides, especialmente eugenol e compostos relacionados, é baseada em efeitos dominantes, enquanto que a produção de monoterpenos é um fator recessivo (Sangwan et al., 2001).

O óleo essencial das inflorescências de *O. gratissimum* apresentou valores de CIM entre 0,5-2 mg/mL para as bactérias Gram-positivas testadas e 1-2 mg/mL para as Gram-negativas (Tabela 2). A maior resistência das bactérias Gram-negativas à ação de óleos essenciais já é descrita na literatura e parece ser devido à grande complexidade da dupla membrana apresentada por estes microrganismos, que limita a difusão de compostos hidrofóbicos, através de sua cobertura lipopolissacarídica (Burt, 2004; Holley; Patel, 2005).

**“Tabela 2”**

O mecanismo da ação antibacteriana dos compostos fenólicos não está totalmente elucidado. Alguns estudos indicam que estes exerceriam seus efeitos na membrana através de numerosos mecanismos, como ruptura, complexação de substrato, inativação enzimática e quelação de metais. Em relação aos demais componentes do óleo essencial em estudo, a atividade antibacteriana pode ser conferida pela lipofilia dos hidrocarbonetos de estrutura terpênica, que permite sua partição nos lípidios da membrana celular, aumentando sua permeabilidade e desestabilizando a estrutura da célula bacteriana (Sikkema et al., 1995; Cowan, 1999).

A alteração do perfil de ácidos graxos e rompimento da membrana bacteriana, com liberação de constituintes intracelulares, foram verificados frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos para o eugenol (Walsh et al., 2003; Gill; Holley, 2006a; Di Pasqua et al., 2007). Adicionalmente, a inibição da atividade da ATPase ligada à membrana de *E. coli* e *L. monocytogenes* também foi demonstrada experimentalmente e relacionada à ação bactericida deste composto (Gill; Holley, 2006a, b).

Em relação aos constituintes de natureza terpênica, apenas  $\beta$ -cariofileno e  $\delta$ -cadineno têm atividade antimicrobiana descrita frente a fungos e bactérias pelo método de microdiluição em caldo (Skaltsaa et al., 2003). Estes dados, no entanto, mostram-se controversos, uma vez que não foi detectada atividade para  $\beta$ -cariofileno frente a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica pela mesma metodologia (Duarte et al., 2007). Possíveis explicações seriam as diferenças existentes entre as cepas testadas e a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos em água a qual, segundo Griffin et al. (1999), estaria relacionada a sua baixa atividade antimicrobiana.

Para o óleo essencial das folhas de *O. gratissimum* são considerados possíveis mecanismos de atividade antimicrobiana a permeabilização da membrana citoplasmática verificada em *Listeria innocua* (Nguefack et al., 2004) e efeitos anti-virulência em *Shigella*

sp. por diminuição na atividade da protease extracelular, conteúdo de ramnose do *o*-lipopolissacarídeo e incidência de invasividade (Iwalokun et al., 2003).

Dentre as bactérias Gram-positivas testadas, foram verificados maiores valores de CIM para os isolados clínicos de *B. cereus*, causador de endocardite bacteriana, e *S. aureus* resistente a meticilina, em relação a suas respectivas cepas catalogadas. Estes resultados confirmam sua maior resistência e não surpreendem, uma vez que isolados clínicos freqüentemente mostram-se resistentes inclusive aos antimicrobianos de utilização terapêutica (Neely; Holder, 1999). Adicionalmente, foi detectada atividade bactericida com valores idênticos de CIM e CBM (2 mg/mL) para a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, o que torna o óleo essencial testado uma possível fonte de novos antimicrobianos frente a este microrganismo, cujas opções terapêuticas são extremamente limitadas (Bruin; Riley, 2007).

O óleo essencial das inflorescências também demonstrou ação bactericida e, em alguns casos, bacteriostática frente a bactérias Gram-negativas causadoras de diarreia, como EPEC, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. Estes resultados fornecem uma possível explicação para o uso popular da planta inteira como antidiarréico em países africanos (Kaou et al., 2008).

Na avaliação da toxicidade de compostos ativos e extratos vegetais para *Artemia salina*, um valor de  $CL_{50}$  inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  permite considerar o composto como bioativo (Meyer et al., 1982). No presente trabalho, tanto para o óleo essencial das inflorescências ( $CL_{50} = 233,8$  (200,7 – 272,0)  $\mu\text{g/mL}$ ) quanto para o eugenol ( $CL_{50} = 186,1$  (144,1 – 228,5)  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstraram toxicidade sem diferenças estatísticas entre si. Portanto, estes dados concordam com a atividade antibacteriana detectada, bem como com as demais atividades relatadas para o eugenol. Contudo, considerando-se o caráter toxicológico do teste, as amostras demonstraram toxicidade que, segundo Parra et al. (2001), é passível de ser correlacionada a testes de toxicidade aguda oral em animais.

Embora a atividade antibacteriana detectada seja de amplo espectro, merecendo destaque a ação frente a microrganismos resistentes e isolados clínicos locais, os altos valores de CIM e CBM obtidos e a toxicidade observada para *Artemia salina* desaconselham o uso interno de monopreparados à base de *O. gratissimum*. Alternativa para sua utilização com esta finalidade seria em associações com antibióticos, fato este já descrito na literatura para o óleo essencial das folhas (Jedličková et al., 1992; Iwalokun et al., 2003), ou em preparações de uso tópico no caso de lesões infectadas, uma vez que foi verificada neste trabalho atividade frente a *S. aureus*, cepa causadora de infecções cutâneas. Entretanto, outros estudos são necessários para comprovar a viabilidade e segurança destas proposições, bem como a inocuidade toxicológica das mesmas.

#### **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pelo apoio financeiro.



## REFERÊNCIAS

- Acosta M, González M, Araque M, Velazco E, Khourel N, Rojas L, Usubillaga A 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Rev Facultad de Farmacia* 45: 19-24.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.
- Alcântara Júnior JP, Osuna JTA, Queiroz SROD, Rios AP 2005. Ethnobotanical and ethnopharmacological surveys on medicinal plants from the municipality of Itaberaba-BA for cultivation and conservation. *Sitientibus Ser Cienc Biol* 5: 39-44.
- Bruin MA, Riley LW 2007. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 7, doi:10.1186/1471-2334-7-24.
- Bülow N, König WA 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpenes biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55: 141-168.
- Burt S 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.
- Cáceres A 1996. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cowan MM 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55: 4863-4870.

- Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A, 2005. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* 111: 197-201.
- Farmacopéia Brasileira 1988. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu.
- Figueiredo R, Rodrigues AI, Costa MC 2007. Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chem* 104: 1445-1453.
- Gill AO, Holley RA 2006b. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 111: 170-174.
- Gill AO, Holley RA 2006a. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics *Int J Food Microbiol* 108: 1-9.
- Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL, Leach DN 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J* 14, 322-332.
- Holley RA, Patel D 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 22: 273-292.
- Iwalokun BA, Gbenle GO, Adewole TA, Smith SI, Akinsinde KA, Omonigbehin EO 2003. Effects of *Ocimum gratissimum* L. essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigéria. *APMIS* 111: 477-482.
- Jedličková Z, Mottl O, Šerý V 1992. Antibacterial properties of the Vietnamese Cajeput oil and *Ocimum* oil in combination with antibacterial agents. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 36: 303-309.
- Kaou AM, Mahiou-Leddet V, Hutter S, Ainouddine S, Hassani S, Yahaya I, Azas N, Ollivier E 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 116: 74-83.

- Kothari SK, Bhattacharya AK, Singh K, Ramesh SI, Rao EVSP 2005. Pre-flowering harvesting of *Ocimum gratissimum* for higher essential oil and eugenol yields under semi-arid tropics. *J Essent Oil Res* 17: 212-216.
- Matos FJA 1994. *Farmácias vivas*. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta med* 45: 31-34.
- Morais SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhaes EF 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev Bras Farmacogn* 15: 169-177.
- Murari AL, Carvalho FH, Heinzmann BM, Michelot TM, Hörner R, Mallmann CA 2008. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. *Quim. Nova* 31: 1081-1084.
- NCCLS 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically. 6<sup>th</sup> ed. Approved Standard M7-A6, Wayne, P. A.
- Neely AN, Holder IA 1999. Antimicrobial resistance. *Burns* 25, 17-24.
- Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M 2004. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol* 39: 395-400.
- Parra AL, Yhebra RS, Sandiñas IG, Buela LI 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8: 395-400.
- Rabelo M, Souza EP, Soares PMG, Miranda AV, Matos FJA, Criddle DN 2003. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. *Braz J Med Biol Res* 36: 521-524.

- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* 34: 3-21.
- Sikkema J, Bont AAM, Poolman B 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201-222.
- Silva MIG, Gondim APS, Nunes IF, Sousa FCF 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn* 16: 455-462.
- Skaltsaa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 64: 743-752.
- Steele CL, Crock J, Bohmann J, Croteau R 1998. Sesquiterpene synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). *J Biol Chem* 273: 2078-2089.
- Trevisan MTS, Silva MG, Pfundstein B, Spiegelhalder B, Owen RW 2006. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *J Agric Food Chem* 54: 4378-4382.
- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 5: 382-387.
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem Syst Ecol* 29: 287-304.
- Walsh SE, Maillard J-Y, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol* 94: 240-247.

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum*

L.

<b>Fórmula</b>	<b>Componente</b>	<b>%</b>	<b>Tr</b>	<b>IRcal</b>	<b>IRref</b>
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Eugenol	81,94	26,895	1359	1359
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -Copaeno	1,57	27,491	1377	1377
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -Cariofileno	3,14	28,902	1421	1419
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\gamma$ -Muuroleno	12,58	30,831	1483	1480
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\delta$ -Cadineno	0,77	32,098	1525	1523

% = Porcentagem relativa; **Tr** = Tempo de retenção; **IRcal** = Índice de retenção calculado;

**IRref** = Índice de retenção de referência

**Tabela 2.** Atividade antibacteriana do óleo essencial (OE) das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L.

Microrganismo testado	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
	OE	Ampicilina	OE	Ampicilina
<b>Gram-positivo</b>				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0,5	$0,78 \cdot 10^{-3}$	1	$31,25 \cdot 10^{-3}$
<i>Bacillus cereus</i> (isolado de endocardite)	1	$15,6 \cdot 10^{-3}$	4	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	2	$3,12 \cdot 10^{-3}$	2	> 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	$0,39 \cdot 10^{-3}$	4	> 0,05
MRSA <sup>a</sup>	2	$31,25 \cdot 10^{-3}$	4	> 1
<b>Gram-negativo</b>				
<i>Escherichia coli</i> ESBL <sup>b</sup>	2	> 5	2	> 5
<i>Escherichia coli</i> EPEC <sup>c</sup>	2	$3,9 \cdot 10^{-3}$	2	0,25
<i>Shigella</i> sp.	1	$3,9 \cdot 10^{-3}$	2	0,5
<i>Shigella flexneri</i>	2	$3,9 \cdot 10^{-3}$	2	> 1
<i>Salmonella</i> sp.	1	$3,9 \cdot 10^{-3}$	2	> 1
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	1	$25 \cdot 10^{-3}$	2	0,05

<sup>a</sup> *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; <sup>b</sup> *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido; <sup>c</sup> *Escherichia coli* enteropatogênica.

### 3.3 Manuscrito 4

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M.; ZANELLA, R.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Eugenol content, antibacterial activity and toxicity of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L. obtained by different methods. À ser submetido para Planta Medica.

**Eugenol content, antibacterial activity, and toxicity of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L. obtained by different methods**

Lenise de Lima Silva<sup>1</sup>, Clarissa Giesel Heldwein<sup>1</sup>, Luiz Gustavo Brenner Reetz<sup>2</sup>, Rosmari Hörner<sup>2</sup>, Diogo Pompéu de Moraes<sup>3</sup>, Fábio Andrei Duarte<sup>3</sup>, Érico Marlon de Moraes Flores<sup>3</sup>, Renato Zanella<sup>3</sup>, Ana Maria Soares Pereira<sup>4</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>1</sup>

**Affiliation**

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup>Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

**Correspondence**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima n° 1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com Phone: +55 55 3220 9366 Fax: +55 55 3220 8248.



**Abstract**

Different ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) had their yield, eugenol content, antibacterial activity, and toxicity compared in order to define the best extraction method to optimize the medicinal use of this plant as an antibacterial agent. The extracts were obtained by maceration, soxhlet, ultrasonic cleaning bath (UCB), ultrasonic horn (UH), and microwave-assisted extractions (MAE). Eugenol content was determined by GC-FID, using the pure compound isolated from aerial parts of the plant as a reference. Antibacterial activity was assayed by the broth microdilution method. Toxicity was verified by the brine shrimp (*Artemia salina* L.) lethality test (BSL). Significant differences among the extraction methods were observed in all analyses. Maceration was the best extraction process, considering the biological activities of all the extracts.

**Key Words:**

*Ocimum gratissimum*, Lamiaceae, extraction methods, antibacterial activity, toxicity, eugenol content.

**Abbreviations:**

BSL: brine shrimp lethality test; ESBL: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*; EPEC: enteropathogenic *Escherichia coli*; MAE: microwave-assisted extraction; MBC: minimum bactericidal concentration; MIC: minimum inhibitory concentration; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; TTC: triphenyl tetrazolium chloride; UCB: ultrasonic cleaning bath; UH: ultrasonic horn; VRE: vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*; WHO: World Health Organization.

## 1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), about three-quarters of the world population relies upon traditional remedies (mainly herbs) for their health care [1]. Additionally, the WHO recognizes the importance of medicinal plants to the health systems of many developing countries [2].

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), commonly known as alfavaca or tree basil, is one of the medicinal plants that is presently being considered for inclusion in the phytotherapy program of Brazil's National Health System. This species is native to Africa, and is cultivated and naturalized throughout Brazil [3-4]. It has been used as a topical antiseptic and as a treatment for conjunctivitis, bronchitis, and diarrhea, among others [4-7]. Its wide-spectrum antimicrobial activity has been confirmed and described in many studies [8-10]. This activity has been related to a high content of eugenol in the essential oil, as analyzed by bioautography [11].

This report compares different ethanolic extracts of *O. gratissimum* obtained by maceration, soxhlet, ultrasonic cleaning bath (UCB), ultrasonic horn (UH), and microwave-assisted extractions (MAE), in regard to their yield, eugenol content, antibacterial activity, and toxicity, in order to define the best extraction method to optimize the medicinal use of this plant as an antibacterial agent.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant Material

Aerial parts of *O. gratissimum* L. were grown in Jardinópolis, São Paulo, Brazil. The plant material was collected in March 2007, dried, and stored in closed dark packages until the extractions. To obtain pure eugenol, aerial parts were grown at the Universidade Federal

de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil, and collected in December 2006 and March 2007. Voucher specimens were deposited in the Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (Voucher no. 1329) and in the Herbarium of the Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Voucher no. SMDB 11167). The plants were identified by Lin Chan Ming and Adelino Alvares Filho, respectively.

## 2.2. *Obtaining ethanolic extracts from O. gratissimum*

Plant material was pulverized at 600  $\mu\text{m}$  before extraction by soxhlet, ultrasonic, and microwave-assisted processes. All extractions were performed with 95% ethanol in triplicate. Extraction time, temperature, and solvent volume/sample weight ratio (mL/g) of the different methods are described in Table 1.

Sonochemical procedures were carried out in an ultrasonic cleaning bath (UCB) (model Ultrasonic Cleaner 1440D - Series Evolution, 40 kHz and 100 W) and ultrasonic horn (UH) (model VC 750, Sonics, 20 kHz working frequency, 750 W). The horn was operated on a 40% cycle at 2.5 cm from the surface of the extraction solution. Microwave-assisted extraction (MAE) was performed in a Multiwave 3000 microwave using a quartz closed-vessel system. The microwave energy program used was: highest temperature 100 °C, ramp of 5 minutes until 300 W, followed by 5 minutes of radiation. In the finishing process, the vessels containing the extraction solution were cooled for 30 minutes before opening.

All extracts obtained were filtered and stored in closed amber bottles until they were concentrated under reduced pressure, at 40 °C. Next, the extracts were placed in a desiccator and kept at room temperature until constant weight. Yields are expressed as a percentage of the total amount of the extracted plant material.

### 2.3. Eugenol purification from ethanolic extracts and quantitative analyses

The eugenol purification process from the ethanolic extract of *O. gratissimum* was developed to permit quantitative analyses by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), with reduced interference from other constituents. The procedure was initially performed in pilot columns. Fractions (20 mL) obtained in the pilot column were monitored by TLC (silica gel F254, chloroform-toluene 85:15, detection: anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) to determine which fractions contained the compound of interest.

For the purification procedure, the extracts (about 400 mg) were added to a chromatography column (1 x 29.5 cm), containing 15 g of silica-gel 60 (Merck, 70-230 mesh) and eluted with chloroform-toluene 85:15 at 2 mL/min. The fractions containing eugenol according to the pilot columns [maceration: fractions 6-13 (100-260 mL); soxhlet: fractions 5-15 (80-300 mL); UH: fractions 5-14 (80-280 mL); UCB: fractions 5-12 (80-140 mL); MAE: fractions 3-13 (40-260 mL)] were concentrated under reduced pressure, at 40 °C. The resulting solution was diluted with the eluent to 50 mL in a volumetric flask and submitted to GC-FID analyses. To determine the repeatability of the procedure, the other fractions were compared by TLC with the corresponding fractions of the pilot column.

Quantitative determination by GC-FID was performed in duplicate by analyzing the area below the curve. Eugenol obtained from *O. gratissimum* and diluted in dichloromethane at 1.038 mg/mL was used as an external standard.

GC-FID analysis was performed on a Varian gas chromatograph Model 3800 coupled with flame ionization detection, using the Star Workstation 6.6 system for data acquisition and a CPSil 5CB column (100% methyl silicone, 30 m x 0.25 mm i. d. x 0.10  $\mu\text{m}$  film thickness). Operating conditions: injection volume 1  $\mu\text{L}$ ; injector temperature 220 °C; oven temperature program 40-260 °C; 40 °C for 4 min; ramp rate 4 °C/min; and detector temperature 310 °C.

#### 2.4. Extraction, isolation, and characterization of eugenol from *O. gratissimum*

Fresh aerial parts of *O. gratissimum* were submitted to steam distillation for 3 h in a Clevenger-type apparatus. After extraction, the essential oil and hydrolate were collected and submitted to liquid-liquid extraction with hexane. The organic phase was evaporated at 40 °C and the residue was stored at -20 °C in amber glass bottles until purification.

The residue (210.7 mg) was purified by silica-gel CC eluted with dichloromethane at 1 mL/min. The 14 fractions of 20 mL obtained were monitored by TLC and pooled according to their chromatographic profiles. Fractions 4-10 (60-200 mL) were concentrated (103.8 mg), analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and NMR, and identified as eugenol.

GC-MS analysis was performed on an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, using a HP5-MS column (5% phenyl - 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i. d. x 0.25 µm) and EI-MS of 70 eV. Operating conditions: split inlet 1:100; carrier gas He; flow rate 1 mL/min; injector and detector temperature 220 °C; detector interface temperature 250 °C. Chromatographic conditions were the same as the GC-FID analysis. NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 FT-NMR at 400 MHz for <sup>1</sup>H and 100 MHz for <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub> with TMS as the internal standard.

Eugenol (Fig. 1): Rt (GC): 29.83 min; EI-MS m/z (%): 164 [M<sup>+</sup>] (100), 149 (35), 137 (22), 133 (20), 131 (35), 121 (22), 103 (53), 91 (53), 77 (64), 51 (35); <sup>1</sup>H NMR δ (ppm) 3.16 (2H, d, *J* 6.8Hz, H-7), 3.65 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.92 (2H, m, H-9), 5.68 (1H, s, OH), 5.81 (1H, m, H-8), 6.52 (1H, d, *J* 6Hz, H-6), 6.53 (1H, d, *J* ~2.5Hz, H-3), 6.72 (1H, dd, *J* ~2.5Hz and 6Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR δ (ppm) 39.68 (C-7), 55.71 (OCH<sub>3</sub>), 111.08 (C-9), 114.26 (C-3), 115.22 (C-6), 120.97 (C-5), 131.67 (C-4), 137.68 (C-8), 143.71 (C-1), 146.34 (C-2).

### 2.5. Antibacterial activity

The antibacterial activity of the extracts was assayed by the broth microdilution method as established by M7-A6 [12] for bacteria. The test microorganisms included ATCC and clinical isolates from the University Hospital of Santa Maria (Table 2).

Bacterial strains were grown for 16 - 24 h at  $35 \pm 2$  °C in Mueller Hinton agar. The inoculum for the assays was prepared by diluting the cell mass in 0.9% NaCl solution, adjusted to the McFarland scale 0.5 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL), and confirmed by spectrophotometric reading at 625 nm. Cell suspensions were finally diluted in Mueller Hinton broth to  $1 \times 10^6$  CFU/mL.

The extracts were diluted in 95% ethanol. Serial dilutions were performed so that the final concentrations of the extracts ranged from about 10.550 to 0.020 mg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. faecalis* ATCC 51299, and 2.637 – 0.005 mg/mL for the other strains. Inoculum (100 µL) was added to all wells. The plates were incubated at  $35 \pm 2$ °C for 24 h. The extracts were examined in triplicate three times. Antimicrobial activity was detected by adding 20 µL of 2% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) aqueous solution. Ampicillin was used as the reference antimicrobial control, in concentrations of 5-0.00488 mg/mL, 1-0.000975 mg/mL, and 0.5-0.0000488 mg/mL according to the antimicrobial resistance profile. Negative and positive controls of the product were used for each bacterial strain tested.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered as the lowest concentration of the sample that prevented visible growth. Minimum bactericidal concentrations (MBCs) were determined by sub-culturing in Mueller Hinton agar at  $35 \pm 2$  °C for 48 h from each negative growth tube. MBCs were defined as the lowest concentration yielding negative subcultures.

## 2.6. Brine shrimp lethality test (BSL)

The BSL was carried out by using nauplii of brine shrimp *Artemia salina* (Leach), according to the methodology adapted from Vanhaecke et al. [13]. Brine shrimp eggs (30 mg) were hatched at 22-29 °C in artificial sea water, which was prepared with about 23 g/L of sea salt and 0.7 g/L of sodium bicarbonate in distilled water. After 24 hours, 10 phototropic nauplii were added to petri plates containing 9 mL of artificial sea water and 1 mL of stock solution of the extract.

The extracts of *O. gratissimum* (60 mg) were dissolved in ethanol (1 mL) and diluted in artificial sea water to obtain final concentrations of 1000, 600, 300, and 150 µg/mL. Plates were incubated at 22-29 °C for 24 hours, and the number of survivors was counted. The samples were examined twice, in triplicate. The positive control consisted of eugenol in final concentrations of 514, 257, 135.1, and 13.5 µg/mL under the same experimental conditions. The negative controls were tested with ethanol diluted 1:100 in artificial sea water.

## 2.7. Statistical analysis

The percentage data for extractive yield and eugenol composition were transformed using the arcsine transformation methodology [14]. The results for extractive yield, eugenol composition, MIC, and MBC of each microorganism were analyzed by one-way ANOVA. The mean values were compared by the Tukey honestly significant difference (HSD) test. MICs that did not show homogeneity of variances were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. LC<sub>50</sub> values and 95% confidence intervals for the BSL test were calculated by Probit analysis. Statistical analysis between experimental results was based on Spearman's rank correlation ( $r_s$ ). Significant difference was statistically considered at the level of  $P < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

The extracts differed significantly in yield and eugenol content (Table 1). In contrast to the observations of Vinatoru et al. [15], the contents of the dry residues obtained by ultrasound were not higher than those obtained by classical methods. The largest yields were obtained by soxhlet (19.5 %); however, the extraction time was longer than with the ultrasound and microwave-assisted extractions. Eugenol content was also lower in the extract obtained by ultrasonic methods, compared with the classical maceration (11.6 %) and soxhlet (10.0 %) procedures. These results contrast to those observed for *Salvia officinalis*, where the ultrasonic process was more efficient in extracting the active compounds [16]. Ultrasound irradiation can disrupt plant cell walls, facilitating the release of their contents. The mechanical effects of ultrasound induce a greater penetration of solvent into cellular materials and improve mass transfer [17].

Between the two types of ultrasound methods used, no significant differences could be detected in the extractive yield. However, UCB extracted more eugenol than did UH. This may result from the higher extraction frequency used by the first method. According to Vinatoru [18], when high-frequency ultrasound is employed, the extraction yield does not increase significantly; however, the degradation of the herb constituents may be diminished. Eugenol degradation during stocking by dissociation of phenolic hydrogen has been described [19]. The process of dissociation, however, may occur from sonication, as observed previously for pure water. Furthermore, the free radicals formed may lead to the formation of additional compounds in the extractive medium [20]. This hypothesis may be one explanation for the lower eugenol content in the UH extract.

The extractive yield and eugenol percentage of the extracts obtained from MAE were similar to the classical maceration process, and higher than ultrasound methods. Chen et al. [23] also obtained an increase of extractive yields with this methodology compared with an



ultrasonic bath for the extraction of *Ganoderma atrum*. In MAE, the microwaves interact selectively with the polar molecules present in glands, trichomes, or vascular tissues. Localized heating leads to the expansion and rupture of cell walls, and is followed by the liberation of content into the solvent [24].

Regarding antibacterial activity (Table 2), the extracts obtained by ultrasound methods had similar MIC values against Gram-positive bacteria, both among each other and in relation to the classical maceration procedure. An exception was the UCB against *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 0.66 mg/mL), for which the MIC value was the lowest of all methods. For Gram-negative bacteria, UH extraction was more effective than the other extraction processes against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL) and *S. choleraesuis* ATCC 10708 (MIC = 1.32 mg/mL). Bactericidal activities were only observed in the case of UCB against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VRE) and *B. cereus* ATCC 14579.

The extracts obtained by the classical procedures of maceration and soxhlet demonstrated bacteriostatic activity against nearly all strains tested. Only *Salmonella* sp. showed resistance, which was observed for all extracts tested, independently of the extraction method used. However, of the conventional techniques, lower MIC values to Gram-positive bacteria occurred when maceration was used. The only exception to this was VRE, which showed its lowest values in the cases of soxhlet and microwave extracts. The extraction of compounds that are active against this strain seems to be favored by the high temperatures of both processes. However, for the other bacterial strains, the same factor may have caused the thermal degradation of some compounds with a synergic effect, or increased the extraction of constituents with an antagonist effect in regard to antibacterial activity. The extract produced by MAE may have been less affected by this factor than the extract obtained by soxhlet, because of the faster extraction time.

Only the conventional techniques generated extracts that were active against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Shigella* sp. Other diarrheagenic pathogens such as *Shigella flexneri* and *S. choleraesuis* ATCC 10708 also showed susceptibility to these extracts. This activity may explain the popular use of this plant for the treatment of diarrhea [4, 21]. Although the MIC values found in the present study are not adequate for clinical use, the long-term utilization of preparations of this plant may contribute to the control of diarrheagenic bacteria. On the other hand, maceration was the extractive method that gave the best results against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (MIC = 0.66 mg/mL). This activity should be evaluated further, since increases in disease caused by community- and hospital-acquired MRSA have been documented in recent years [22].

In contrast, as observed by ultrasonic methods in the case of some bacteria, the microwave process did not show higher antimicrobial activity than other processes against the strains tested. For *B. cereus* ATCC 14579, *S. aureus* ATCC 25923, ESBL, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 the microwave process had MIC values statistically equal to one or both conventional processes and to the ultrasonic processes, with the exceptions of UCB against *S. aureus* ATCC 25923, soxhlet against *B. cereus* ATCC 14579, and UH in the case of ESBL. Furthermore, this extractive method was as effective as UCB against *S. flexneri*, as were both ultrasonic methods against MRSA. Similar bactericidal activity was detected for maceration and UH against *B. cereus* ATCC 14579, and for soxhlet and UCB extraction against VRE.

All the extracts of *O. gratissimum* were bactericidal to only some of the Gram-positive bacteria, except the extract obtained by soxhlet against *S. flexneri* (MBC = 2.63 mg/mL). Furthermore, bactericidal activity was observed only for the extract obtained by microwave against endocarditis-isolated *B. cereus*, and for the extracts by classical methods against *S. aureus* ATCC 25923. However, considering only the results of bactericidal activity of the

extracts against Gram-positive bacteria, a positive correlation ( $r_s = 0,894$ ) between eugenol content and activity is apparent.

Differences in observed susceptibility among Gram-positive and Gram-negative bacteria have been described in the literature as resulting from the interaction of a number of factors, including differences in the cytoplasmic membrane/ glycoprotein interface, as well as greater physicochemical complexity of the Gram-negative cell wall [25].

The highest MIC values for all extracts were detected against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, with no significant differences among them. This result confirms the high intrinsic resistance described for this Gram-negative bacillus, which is related to the low outer-membrane permeability, coupled with secondary resistance mechanisms such as antibiotic efflux pumps and biofilm formation [26-27].

The mechanism of antimicrobial activity of phenolic compounds, such as eugenol, is incompletely understood. In general, these compounds appear to exert their activity at the cytoplasmic membrane through mechanisms such as substrate complexing, membrane disruption, enzyme inactivation, and metal chelation [28-29]. Eugenol causes structural alterations in the fatty-acid profile and membrane disruption, with leakage of intracellular constituents, in both Gram-negative and Gram-positive microorganisms. Inhibition of the membrane-bound ATPase activity of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* was also shown experimentally on isolated membranes, and related to the bactericidal activity of this compound [30-33].

The possibility of a synergistic or antagonistic action between eugenol, one of the principal components of the ethanolic extract of *O. gratissimum*, and small amounts of other components in this study should not be neglected, because the eugenol content did not explain all the observed differences among the bacteriostatic activities of the methods tested. Furthermore, correlation between these parameters was not verified by Spearman's test ( $P <$

0.05). Among the constituents of *O. gratissimum* reported in the literature, oleanolic acid, some flavonoids, and caffeic acid esters had their antimicrobial action reported in other plants and/or in the isolated form [35, 37-40]. The presence of these constituents in the extracts may have caused the effects observed.

All ethanolic extracts of *O. gratissimum* demonstrated bioactivity using the BSL test (Table 1) according to the Meyer et al. [34] classification ( $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ ). The  $LC_{50}$  results were lower than reported previously for the ethanolic residue ( $LC_{50} = 1807.6 \mu\text{g/mL}$ ) [35] and differed statistically according to the extractive method, except between the microwave and soxhlet procedures. The extract obtained by maceration ( $LC_{50} = 331.3 \mu\text{g/mL}$ ) was shown to be the most toxic. It was followed by UH, UCB, and finally soxhlet/MAE, in decreasing order of toxicity. However, a lower  $LC_{50}$  value was detected for eugenol ( $LC_{50} = 186.1 \mu\text{g/mL}$ ). These results suggest that this compound in a mixture was less toxic because of a reduction of its concentration and that the action of other constituents potencialized the toxicity of the extracts.

Negative correlation ( $r_s = -0,949$ ) between brine shrimp toxicity and the number of bacterial strains with lowest MIC values for extracts obtained by the different processes could be observed in this study. This relation among tests also was described for species of the family Euphorbiaceae with antibacterial activity [36]. Thereby, the maceration procedure may be the best method to obtain ethanolic extracts of *O. gratissimum* with respect to its biological action, since maceration showed the lowest  $LC_{50}$  and MIC values (for 5 strains) among the extraction methods tested. The second-best methodology to produce more active extracts would be the ultrasound methods, followed by soxhlet and/or MAE.

However, in the selection of an appropriate extraction technique, the cost, time required for extraction, and the volume of solvent used must also be considered. Traditional solid-liquid extraction methods such as maceration and soxhlet require large quantities of

solvent and are time-consuming (Table 1). The large amount of solvent used not only increases operating costs but also causes additional environmental problems [17, 41]. Therefore, the optimum extraction conditions of ultrasonic and microwave processes should be determined, in order to optimize the extraction of the active constituents in the shortest time, with the least consumption of organic solvents and with increased pollution prevention and antibacterial activities of the respective extracts.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to CAPES for financial support.

## References

- <sup>1</sup> WHO. Report on the intercountry expert meeting of traditional medicine and primary health care. WHO-EMTRM/1-E/L/12.92/168, Cairo, Egypt; 1991
- <sup>2</sup> WHO/IUCN/WWF. Guidelines on the conservation of medicinal plants (ISBN 2 8317 0136 8). IUCN, Gland, Switzerland; 1993
- <sup>3</sup> Albuquerque UP, Andrade LHC. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el Nordeste del Brasil. Anales Jard Bot Madrid 1998; 56: 43-64
- <sup>4</sup> Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz Jr. M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. Fitoterapia 2002; 73: 69–91
- <sup>5</sup> Matos FJA. Farmácias vivas. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará; 1994: 55-56
- <sup>6</sup> Silva MIG, Gondim APS, Nunes IF, Sousa, FCF. The use of herbal medicines in the family health care units in Maracanaú (CE). Braz J Pharmacogn 2006; 16: 455-462
- <sup>7</sup> Onajobi FD. Smooth muscle contracting lipid-soluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*. J Ethnopharmacol 1986; 18: 03–11
- <sup>8</sup> Jedličková Z, Mottl O, Šerý V. Antibacterial properties of the Vietnamese Cajeput oil and *Ocimum* oil in combination with antibacterial agents. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1992; 36: 303-309
- <sup>9</sup> Ijeh II, Omodamiro OD, Nwanna IJ. Antimicrobial effects of aqueous and ethanolic fractions of two spices, *Ocimum gratissimum* and *Xylopia aethiopica*. Afr J Biotechnol 2005; 4: 953-956
- <sup>10</sup> Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol 2007; 111: 197-201

- <sup>11</sup> Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Bando E, Melo AFN, Cortez DAG, Dias Filho BP. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 675-678
- <sup>12</sup> NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A6, 6th edition. Wayne: NCCLS; 2003
- <sup>13</sup> Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicol Environ Saf 1981; 5: 382-387
- <sup>14</sup> Zar JH. Biostatistical Analysis, 4th edition. New Jersey: Prentice-Hall; 1999
- <sup>15</sup> Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip PI, Lazurca D, Mason TJ. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. Ultrason Sonochem 1997; 4: 135-139
- <sup>16</sup> Salisová M, Toma S, Mason TJ. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. Ultrason Sonochem 1997; 4: 131-134
- <sup>17</sup> Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci Technol 2006; 17: 300-312
- <sup>18</sup> Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason Sonochem 2001; 8: 303-313
- <sup>19</sup> Miller RA, Bussell NE, Ricketts CK, Jordi H. Analysis and purification of eugenol. J Dent Res 1979; 58: 1394-1400
- <sup>20</sup> Luque-Garcia JL, Luque de Castro MD. Ultrasound: a powerful tool for leaching. Trends Anal Chem 2003; 22: 41-47
- <sup>21</sup> Ilory MO, Sheteolu AO, Omonibgehin EA, Adeneye AA. Antidiarrhoeal activities of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). J Diarrhoeal Dis Res 1996; 14: 283-285

- <sup>22</sup> *Lopes HV*. CA-MRSA: a new problem for the infectologist. *Rev Panam Infectol* 2005; 7: 34-36
- <sup>23</sup> *Chen Y, Xie MY, Gong XF*. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *J Food Eng* 2007; 81: 162-170
- <sup>24</sup> *Kaufmann B, Christen P*. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and Pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal* 2002; 13: 105-113
- <sup>25</sup> *Holley RA, Patel D*. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 2005; 22: 273-292
- <sup>26</sup> *Hancock REW*. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998; 27: S93-S99
- <sup>27</sup> *Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM*. *Pseudomonas aeruginosa* - plant root interactions, pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* 2004; 134: 320-331
- <sup>28</sup> *Sikkema J, Bont AAM, Poolman B*. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995; 59: 201-222
- <sup>29</sup> *Cowan MM*. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 564-582
- <sup>30</sup> *Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG*. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 240-247
- <sup>31</sup> *Gill AO, Holley RA*. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 2006; 111: 170-174
- <sup>32</sup> *Gill AO, Holley RA*. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 2006; 108: 1-9



- <sup>33</sup> *Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G.* Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 4863-4870
- <sup>34</sup> *Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL.* Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 1982; 45: 31-34
- <sup>35</sup> *Njoku CJ, Zeng L, Asuzu IU, Oberlies NH, McLaughlin JL.* Oleanolic acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *Int J Pharmacog* 1997; 35: 134-137
- <sup>36</sup> *MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN.* Studies on the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae*. *J Ethnopharmacol* 1988; 22: 143-172
- <sup>37</sup> *Grayer RJ, Eckert MR, Veitch NC, Kite GC, Marin PD, Kokubun T, Simmonds MSJ, Paton AJ.* The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* 2003; 64: 519-528
- <sup>38</sup> *Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA.* Natural flavonoids as antimicrobial agents. *J Am Nutraceutical Assoc* 2004; 7: 24-31
- <sup>39</sup> *Cushnie TPT, Lamb AJ.* Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 343-356
- <sup>40</sup> *Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T.* Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 1147-1149
- <sup>41</sup> *Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, Kamiński M.* Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J Biochem Biophys Methods* 2007; 70: 253-261

## Legends for Figures

Fig. 1. Chemical structure of eugenol

Fig. 1

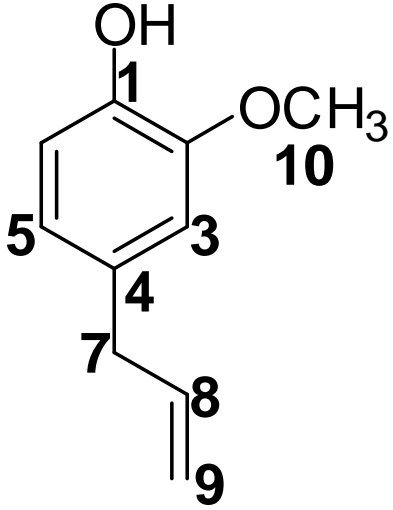


Table 1

Experimental conditions, extract yield, eugenol composition, and toxicity by brine shrimp lethality test of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L.

	Extraction Methods					Eugenol
	Maceration	Soxhlet	UH	UCB	MAE	
Experimental conditions						
Time	3 x 7 days	30 h	1 h	1 h	5 min	
Temperature (°C)	Ambient	78	13-44	40	41-81	
Solvent volume/sample weight ratio (mL/g)	43.8 (3 x 14.6)	8.6	10	10	10	
Extract yield (%) <sup>1</sup>	11.8b	19.5a	10.2bc	7.9c	12.1b	
Eugenol composition (%) <sup>1</sup>	11.6a	10.0b	4.6d	7.8c	11.8a	
BSL						
LC <sub>50</sub> (µg/mL)	331.3	793.4	456.9	586.5	999.4	186.1
95% Confidence interval	302.1-363.1	690.9-951.8	413.9-511.4	523.9-655.4	796.3-1429.9	144.1 - 228.5

<sup>1</sup> Means followed by different letters were significantly different (P < 0.05) by one-way ANOVA followed by Tukey honestly significant difference test.

Table 2

MIC and MBC (mg/mL)<sup>1,2</sup> of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L.

Bacteria		Extraction Methods					Ampicillin
		Maceration	Soxhlet	UH	UCB	MAE	
Gram-positive							
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	MIC <sup>6</sup>	1.32b	2.63a	1.32bc	1.32c	1.32abc	0.00078
	MBC	2.64a	> 2.63	2.64a	1.32b	2.64a	0.03125
<i>Bacillus cereus</i> (endocarditis isolate)	MIC <sup>6</sup>	0.66a	2.63b	0.66ac	0.66c	2.64d	0.0156
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	2.64	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	MIC	10.56a	5.28b	10.58a	10.57a	5.28b	0.00312
	MBC	> 10.56	10.57a	> 10.58	10.57a	10.56a	> 0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MIC <sup>6</sup>	1.32a	1.32a	1.32a	0.66b	1.32a	0.00039
	MBC	2.64a	2.63a	> 2.64	> 2.64	> 2.64	> 0.05
MRSA <sup>3</sup>	MIC <sup>6</sup>	0.66c	2.63a	1.32abc	1.32b	1.32b	0.03125
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	> 1
Gram-negative							
<i>Escherichia coli</i> ESBL <sup>4</sup>	MIC	2.64a	2.63a	1.32b	2.64a	2.64	> 5
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	> 5
<i>Escherichia coli</i> EPEC <sup>5</sup>	MIC	2.64a	2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.0039
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC	10.56a	10.57a	10.58a	10.57a	10.56a	1
	MBC	> 10.56	> 10.57	> 10.58	> 10.57	> 10.56	> 1
<i>Shigella</i> sp.	MIC	2.64a	2.63a	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.0039
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.5
<i>Shigella flexneri</i>	MIC	2.64a	2.63a	2.64a	1.32b	1.32b	0.0039
	MBC	> 2.64	2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	> 1
<i>Salmonella</i> sp.	MIC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.0039
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	> 1
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	MIC	2.64a	2.63a	1.32b	> 2.64	2.64a	0.025
	MBC	> 2.64	> 2.63	> 2.64	> 2.64	> 2.64	0.05

<sup>1</sup> Means followed by different letters were significantly different (P< 0.05) by one-way ANOVA followed by Tukey honestly significant difference test; <sup>2</sup> Standard error of the means were omitted for easy viewing (S.E.M. ≤ 0.01); <sup>3</sup> Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; <sup>4</sup> Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*; <sup>5</sup> Enteropathogenic *Escherichia coli*; <sup>6</sup> MIC analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test (P< 0.05).

## 4 RESULTADOS ADICIONAIS

### 4.1 Análise da fragmentação do eugenol por EM-IE

O composto isolado apresentou uma massa molecular de 164 u.m.a. evidenciada pela presença do sinal correspondente no espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE) com feixe de elétrons de 70 eV (Figura 10). A alta intensidade deste pico, que corresponde ao pico base, é característica de compostos aromáticos, como éteres aromáticos e fenóis, e deve-se a estabilização do íon molecular pelo anel aromático (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000). A Figura 11 apresenta uma proposta de fragmentação para o eugenol, a qual será descrita a seguir.

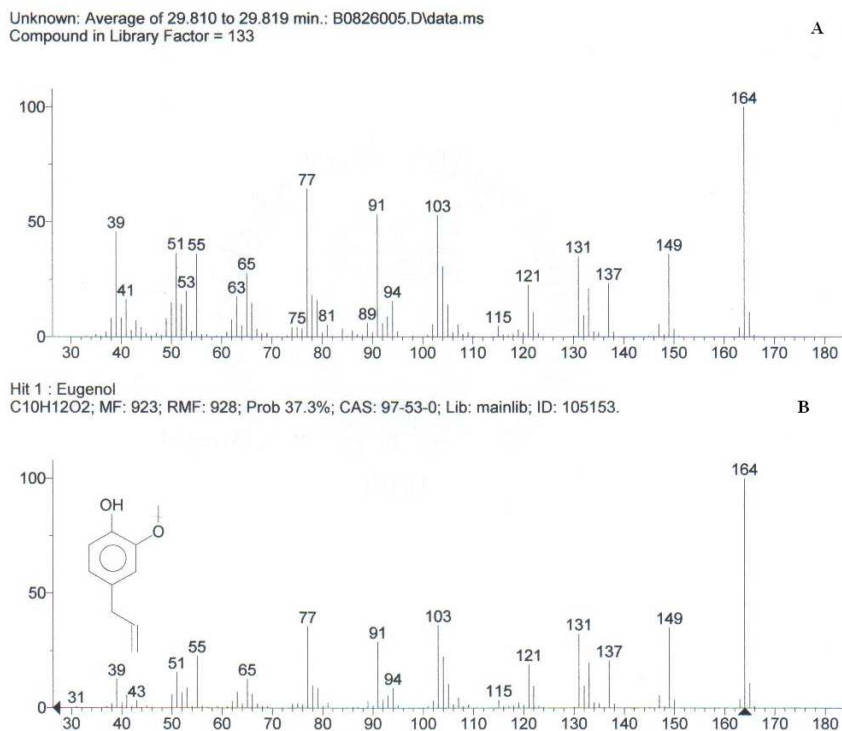
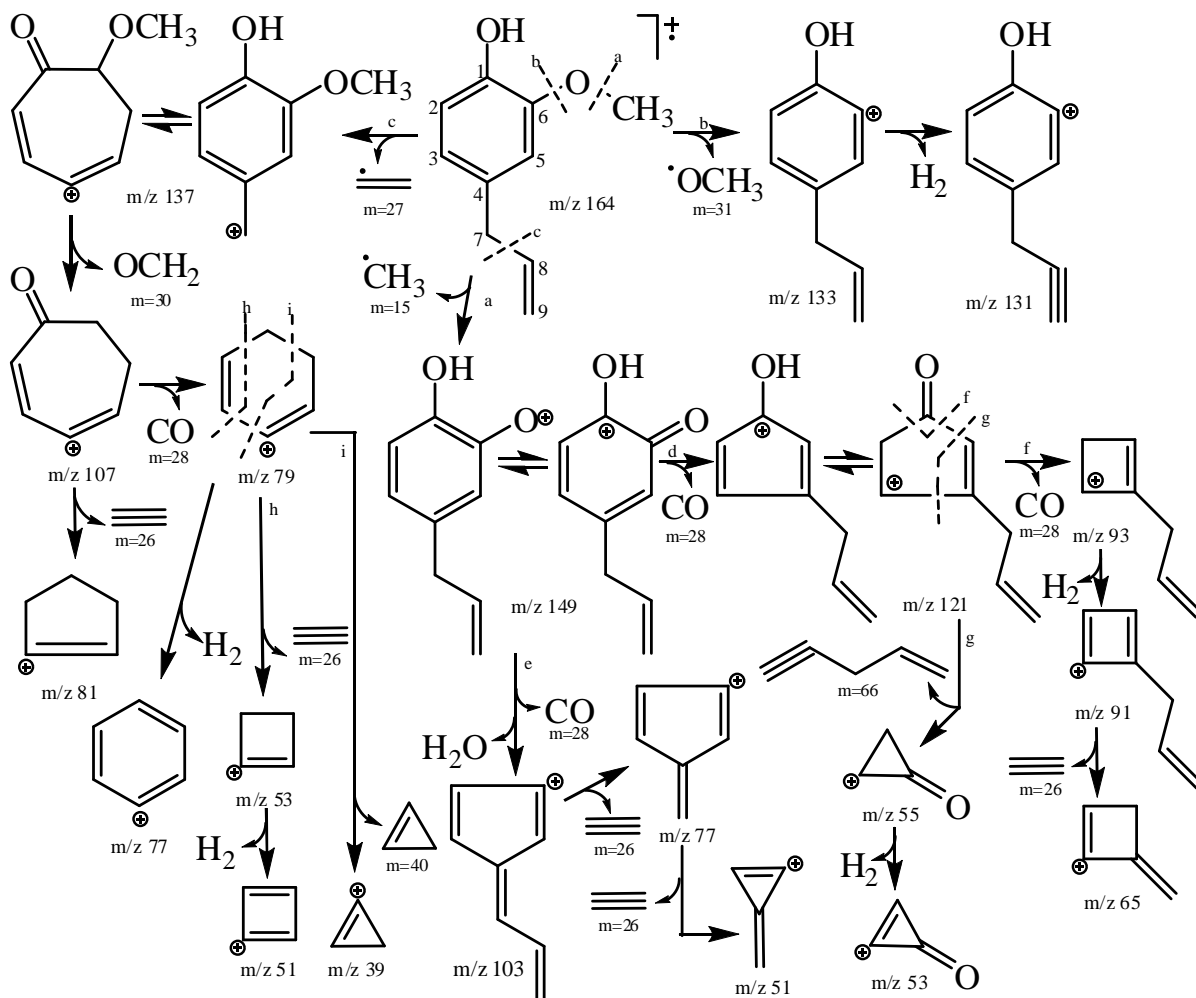


Figura 10 - Espectro de massas por impacto eletrônico do composto isolado (A) e do eugenol (B, NIST 98)



**Figura 11 – Proposta de fragmentação do eugenol por EM-IE em 70 eV.**

A partir do íon molecular  $[M^+]$  com  $m/z$  164 u.m.a., a quebra da ligação  $\beta$  ao anel aromático, com liberação de um radical metila (15 u.m.a.), origina um fragmento de  $m/z$  149 u.m.a. (rota a). A partir deste íon, o rompimento das ligações entre os carbonos 1 e 6, e, 6 e 5, por dupla fragmentação  $\alpha$  deste íon rearranjado permite a eliminação de CO (28 u.m.a.) e a formação de fragmento com  $m/z$  121 (rota d). O rearranjo deste íon e subsequente eliminação de CO originam o fragmento com  $m/z$  93 (rota f), que por novas fragmentações, com eliminação de moléculas neutras e rearranjos forma os fragmentos com  $m/z$  91 u.m.a. e  $m/z$  65 u.m.a. No entanto, o fragmento de  $m/z$  121 pode sofrer também uma reação de retro Diels-Alder (rota g), com eliminação do fragmento de maior massa (66 u.m.a.) como molécula



neutra e formação do fragmento com  $m/z$  55 u.m.a, o qual, após eliminação de  $H_2$ , origina o fragmento de  $m/z$  53 u.m.a..

A perda de água intramolecular (18 u.m.a.) e a dupla fragmentação  $\alpha$  com eliminação de CO (28 u.m.a.) do fragmento de  $m/z$  149 u.m.a. origina o fragmento de  $m/z$  103 u.m.a. (rota e), o qual por sua vez, após rearranjo e eliminação de etino (26 u.m.a.), forma o fragmento com  $m/z$  77 u.m.a.. Este por uma reação de retro Diels-Alder permite a eliminação de uma nova molécula de etino (26 u.m.a.) e a formação de um fragmento de  $m/z$  51 u.m.a.

A partir do íon molecular ( $m/z$  164 u.m.a.), através da eliminação de radical  $OCH_3$  (31 u.m.a.), forma-se o fragmento de  $m/z$  133 (rota b). A eliminação de  $H_2$  por este íon forma um novo fragmento de  $m/z$  131 u.m.a..

O íon molecular ( $m/z$  164 u.m.a.) ao sofrer eliminação do radical etenila (27 u.m.a.) devido à fragmentação benzílica, forma o fragmento de  $m/z$  137 u.m.a. (rota c), o qual por rearranjo, seguido por eliminação de partícula neutra (30 u.m.a.), origina o fragmento de  $m/z$  107. Este íon pode eliminar novamente uma molécula neutra de etino (26 u.m.a.) formando o fragmento com  $m/z$  81 u.m.a. ou sofrer uma dupla fragmentação  $\alpha$ , eliminando CO (28 u.m.a.) e formando um fragmento com  $m/z$  79 u.m.a.. A perda de  $H_2$  por este íon forma novamente o fragmento de  $m/z$  77 u.m.a.. Além disso, o fragmento de  $m/z$  79 u.m.a. pode sofrer reações de retro Diels-Alder originando os fragmentos de  $m/z$  39 u.m.a (rota i), por eliminação de partícula neutra de 40 u.m.a., e  $m/z$  53 u.m.a (rota h), por eliminação de etino (26 u.m.a.). Este último íon, também por eliminação de  $H_2$ , origina um novo fragmento de  $m/z$  51 u.m.a..

Com base no modelo de fragmentação apresentado pela substância (Figura 10A), foi sugerido pelo banco de dados do equipamento, uma série de substâncias com fragmentações semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o eugenol (Figura 10B) foi o composto que apresentou um modelo de fragmentação mais próximo ao do composto isolado. O espectro de massas da substância isolada também está de acordo com os dados descritos na literatura para o eugenol (ADAMS, 2001).

## 5 DISCUSSÃO GERAL

O metabolismo secundário vegetal funciona como mediador na interação entre a planta produtora e o seu ambiente. Desta forma, a biossíntese de metabólitos secundários pode ser frequentemente afetada por fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento do vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, ataque por patógenos, entre outros (VERPOORTE, MEMELINK, 2002; GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Neste estudo, *Ocimum gratissimum* L. mostrou ter o teor e composição de seus óleos essenciais alterados de acordo com o órgão vegetal (manuscrito 1). Além disso, influências de fatores abióticos decorrentes da sazonalidade, como grau de insolação e precipitação, também foram observadas. As folhas, contudo, corresponderam ao órgão vegetal com o conteúdo de óleo essencial e o teor de eugenol menos influenciáveis pelos parâmetros considerados.

Muitos dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário atuam como agentes de defesa frente a competidores, herbívoros ou patógenos na tentativa de manutenção da sobrevivência e saúde do organismo produtor. Estas características tornam estes constituintes uma boa fonte de agentes terapêuticos para doenças infecciosas, onde a morte ou injúria de um microrganismo e/ou parasita é desejada (BAKER et al., 2007). Em algumas espécies vegetais, compostos fenólicos, como o eugenol, têm sido considerados como os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (BURT, 2004; RIOS, RECIO, 2005). De acordo com Cowan (1999), constituintes aromáticos são frequentemente obtidos a partir de um extrato bruto etanólico ou metanólico. Em virtude da maior toxicidade relatada para o metanol em testes biológicos (ELOFF, 1998), o solvente extrator utilizado para a obtenção dos diferentes extratos de *O. gratissimum* foi o etanol, que também é empregado na produção de tinturas e extratos fluidos em geral.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos e/ou extratos são descritas três metodologias. Estas correspondem aos métodos de difusão, diluição e bioautografia. Em decorrência do fato do método de diluição ser apropriado para análise de extratos e/ou compostos polares e não polares e para determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (COS et al., 2006), esta metodologia foi utilizada para o estudo da atividade antibacteriana do óleo essencial das

inflorescências (manuscrito 2) e dos extratos etanólicos das partes aéreas (manuscrito 3) de *O. gratissimum*.

Frente às cepas catalogadas de *B. cereus*, EVR e *S. choleraesuis* e aos isolados clínicos de EPEC, *Shigella sp.* e *Salmonella sp.* o óleo essencial das inflorescências foi bacteriostático em menores concentrações que os extratos etanólicos das partes aéreas. A maior atividade do óleo essencial em relação ao extrato de uma mesma planta já foi relatada pelo método de difusão em ágar em estudos de outras espécies vegetais, como *Mentha longifolia ssp. longifolia*, *Origanum vulgare ssp. vulgare* e *Cordia curassavica* (SAHIN et al., 2004; GULLUCE et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2007).

Melhor ação antibacteriana foi verificada para os extratos etanólicos de *O. gratissimum* em relação ao óleo essencial das inflorescências frente à cepa padrão de *S. aureus* e aos isolados de *B. cereus*, MRSA, ESBL e *Shigella flexneri*. Estes resultados indicam que constituintes distintos daqueles presentes no óleo essencial podem ser co-responsáveis pela atividade biológica dos extratos. Esta inferência baseia-se também no teor de eugenol detectado nos diferentes extratos, uma vez que o conteúdo verificado, além de ser inferior ao valor detectado no óleo, não permite obter uma correlação com as diferentes ações bacteriostáticas determinadas. A ocorrência de sinergismo de ação entre o eugenol e outros fito-compostos, desta forma, deve ser considerada. Dentre os constituintes já identificados em *O. gratissimum*, ácido oleanólico, alguns flavonóides e derivados do ácido caféico já tiveram sua presença relacionada à atividade antimicrobiana em outras espécies vegetais e/ou comprovada *in vitro* (GRAYNER et al., 2003; BYLKA, MATLAWSKA, PILEWSKI, 2004; CUSHNIE, LAMB, 2005; HORIUCHI et al., 2007). No entanto, no caso deste trabalho deve-se levar em consideração que foram analisados diferentes partes do vegetal coletados em localidades distintas, o que por si só pode ter originado variabilidade nos resultados.

Em relação à ação bactericida deve-se ressaltar o fato do óleo essencial das inflorescências ter demonstrado atividade frente a todas as cepas testadas, enquanto que os extratos etanólicos agiram apenas contra bactérias Gram-positivas. A única exceção a este caso foi o extrato obtido por soxhlet frente ao isolado clínico de *Shigella flexneri*. A maior resistência das bactérias Gram-negativas descrita na literatura parece ser devido à interação de inúmeros fatores, como diferenças na interface entre membrana citoplasmática e glicoproteína e a maior complexidade físico-química da parede celular da célula Gram-negativa (HOLLEY, PATEL, 2005). Contudo, os resultados observados podem ser resultantes das diferenças de composição entre as amostras, inclusive no que se refere aos teores de eugenol. Se forem

consideradas apenas bactérias Gram-positivas, as variações de conteúdo de eugenol verificadas nos extratos podem explicar a atividade bactericida dos mesmos frente a um maior ou menor número de cepas bacterianas. Esta ação do eugenol tem sido descrita como decorrente da alteração do perfil de ácidos graxos e rompimento da membrana bacteriana, com liberação de constituintes intracelulares, bem como devido a inibição da atividade da ATPase (WALSH et al., 2003; GILL, HOLLEY, 2006a,b; DI PASQUA et al., 2007).

O estudo da toxicidade utilizando *Artemia salina* L. como modelo biológico permitiu verificar diferenças entre os extratos obtidos por distintas metodologias extrativas. Foi possível, inclusive, a proposição de uma ordem de toxicidade entre os extratos, a qual coincide quase que perfeitamente com a atividade antimicrobiana. Da mesma forma, o óleo essencial, que se mostrou mais ativo frente a algumas cepas bacterianas, apresentou um valor menor de concentração letal média (CL<sub>50</sub>), o que caracteriza, portanto, maior toxicidade em comparação aos extratos. Estes resultados estão de acordo com as observações de MacRae, Hudson e Towers (1988), que verificaram toxicidade para este micro-crustáceo de plantas da família das Euforbiáceas com atividade antibacteriana.

Por outro lado, segundo Parra et al. (2001) os resultados do teste de *Artemia salina* L. podem ser correlacionados a testes de toxicidade aguda oral em animais. Desta forma, o uso interno do óleo essencial das inflorescências e dos extratos etanólicos de *O. gratissimum* deve ser desaconselhado, uma vez que as referidas amostras apresentam toxicidade de acordo com o critério proposto por Meyer et al. (1982).

A análise das diferentes metodologias extrativas (manuscrito 3) permitiu verificar uma ligeira superioridade do método de maceração em relação aos demais processos quanto à atividade antibacteriana. Contudo, a escolha do método extrativo mostrou-se claramente dependente do intuito e/ou finalidade a que o extrato se propõe. Por exemplo, a extração por micro-ondas pode ser utilizada quando é desejado um extrato para uso interno frente a cepas Gram-positivas, devido à baixa toxicidade do extrato originado. Se o uso externo é desejado, a obtenção por sonda de ultrassom pode ser uma alternativa ao demorado processo de maceração.

## 6 CONCLUSÕES

- As folhas de *O. gratissimum* foram as melhores fontes de óleo essencial e eugenol.
- O óleo essencial das inflorescências de *O. gratissimum* apresenta uma ação bacteriostática superior ao extrato etanólico das partes aéreas frente a cepas causadoras de diarreia. No entanto, seu uso interno deve ser desaconselhado devido a sua toxicidade e altos valores de CIM.
- A utilização do extrato etanólico de *O. gratissimum* no combate a cepas de *S. aureus* e microrganismos resistentes a metilina e/ou produtores de beta-lactamases de espectro estendido deve ser preferida em relação ao óleo essencial das inflorescências. Neste caso, a extração por sonda de ultrassom permite a obtenção de um extrato relativamente eficiente frente às referidas cepas e com menor toxicidade que o obtido por maceração.
- Os extratos de *O. gratissimum* obtidos por métodos modernos de extração e pelo processo tradicional de soxhlet demonstraram menor atividade bacteriostática do que o extrato proveniente da metodologia de maceração. Em virtude das técnicas extrativas por ultrassom e micro-ondas não terem sido otimizadas, este processo pode ser realizado no intuito de melhorar a atividade antibacteriana.
- A escolha da metodologia extrativa pode ser realizada de acordo com o intuito a que o extrato se propõe. Contudo, devido à toxicidade e altos valores de CIM obtidos para alguns extratos etanólicos de *O. gratissimum*, o seu uso interno também deve ser desaconselhado. No entanto, sua utilização em formulações tópicas como anti-séptico pode ser considerada.
- Os resultados de atividade antibacteriana obtidos para *O. gratissimum* confirmaram o teste de toxicidade para *Artemia salina* L. como um método preditivo deste tipo de atividade.
- O eugenol não pode ser utilizado como único marcador da atividade antibacteriana em extratos etanólicos de *O. gratissimum*. Estudos adicionais devem ser realizados para identificação de outros possíveis marcadores biológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 2001.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Sinopse das plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AKAH, P. A.; JOHN-AFRICA, L.; NWORU, C. S. Gastro-protective properties of the leaf extracts of *Ocimum gratissimum* L. against experimental ulcers in rat. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 461-467, 2007.

AKINMOLADUN, A. C. et al. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essay**, v. 2, p. 163-166, 2007.

ALABI, D. A.; ONIBUDO, M. Z.; AMUSA, N. A. Chemicals and nutritional composition of four botanicals with fungitoxic properties. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, p. 84-88, 2005.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el Nordeste del Brasil. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p.43-64, 1998a.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotánica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p.107-118, 1998b.

ALBUQUERQUE, U. P.; SILVA, F. C. L.; PIERROT, L. Exame diagnóstico da folha de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 23-25, 1998.

ALCÂNTARA JÚNIOR, J. P. et al. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais do município de Itaberaba-BA para cultivo e preservação. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2005.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 343-350, 2003.

ANGERS, P.; MORALES, M. R.; SIMON, J. E. Basil seed oils. In: J. Janick (ed.), **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996. p. 598-601. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/v3-598.html>>. Acesso em: 26 dez. 2006.

ANJANEYALU, Y. V., KHAN, M.R., THARANATHAN, R. N. An acidic xylan from the capsular polysaccharide-complex of *Ocimum gratissimum* seeds. **Carbohydrate Research**, v. 116, p. 83-88, 1983.

ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72-80, 2008

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

BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 396-402, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 7, n. 2, 24-31, 2004.

CANIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CHANWITHEESUK, A. et al. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUBEY, N. K. et al. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, n. 71, p. 567-569, 2000.

EDEOGA, H. O.; OMOSUN, G.; UCHE, L. C. Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 892-895, 2006.

EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

FARIA, T. J. et al. *Ocimum gratissimum* L.: a rich source of ursolic acid and eugenol. In: Brazilian Conference on Natural Products, 1<sup>st</sup>, 2007, São Pedro. **Anais do 1<sup>st</sup> BCNP**. São Pedro: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

FONSECA, F. N.; LEAL, L. K. A. M. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Ocimum gratissimum* Linn (Alfavaca-cravo) e produto derivado. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 19., 2006, Salvador. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Salvador: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2006.



FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

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

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005.

GARCÍA, D. et al. Estudio farmacognóstico de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano Cimarrón). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 31, n. 1, p. 31-36, 1998.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170-174, 2006b.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1-9, 2006a.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, C. B. S. et al. Atividade de insetos em flores de *Ocimum gratissimum* L. e suas interações com fatores ambientais. **Caatinga**, v. 21, n. 3, p. 128-133, 2008.

GRAYER, R. J. et al. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. **Phytochemistry**, v. 64, p. 519-528, 2003.

GRAYER, R. J. et al. Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 327-342, 2002.

GRAYER, R. J. et al. The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography-mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n. 4, p. 257-267, 2000.

GULLUCE, M. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1449-1456, 2007.

HERNANDEZ, T. et al. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 137-141, 2007.

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

HORIUCHI, K. et al. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1147-1149, 2007.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 23-30, 2002.

IFESAN, B. O. T.; IJAROTIMI, O. S.; OSUNDAHUNSI, O. F. Evaluation of antioxidant activity of *Ocimum* sp. **Journal of Food Technology**, v. 4, p. 318-321, 2006.

IWU, M. M. **Handbook of African Medicinal Plants**. Florida: CRC Press Inc., 1993. 214-215 p.

JIROVETZ, L. et al. Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 120-124, 2003.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 105-113, 2002.

LETELLIER, M.; BUDZINSKI, H. Microwave assisted extraction of organic compounds. **Analisis**, v. 27, p. 259-271, 1999.

LIMA, C. B. et al. Uso de Plantas Mediciniais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 5, p. 600-602, 2007.

LOPES, M. F. G. et al. Caracterização físico-química de algumas espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 95-98, 2001.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 1-10, 1998.

LUQUE-GARCIA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-172, 1988.

MADEIRA, S. V. F. et al. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea pig ileum. **Phytomedicine**, v. 12, p. 506-509, 2005.

MARTINS, A. P. et al. Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*. **Planta Medica**, v. 65, p. 187-189, 1999.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 1994. 55-56 p.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONTALVO, R. V.; DOMÍNGUEZ, C. C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano cimarrón). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 2, n. 2-3, p. 14-18, 1997.

NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NJOKU, C. J. et al. Oleanolic acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 2, p. 134-137, 1997.

OBOH, G. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* leaves. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 1, p. 47-53, 2006a.

OBOH, G. Tropical green leafy vegetables prevent garlic-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, p. 545- 551, 2006b.

OBOH, G. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 513-517, 2005.

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

OLIVEIRA, C. J.; ARAUJO, T. L. Medicinal plants: uses and beliefs of elderly carriers of arterial hypertension. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, p. 93-105, 2007.

ONAJOBI, F. D. Smooth muscle contracting lipid-soluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 03–11, 1986.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PATON, A. J. et al. Phylogeny and evolution of basils and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 277-299, 2004.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmcognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROMANIK, G. et al. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 253-261, 2007.

ROSSET, M. et al. Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 515-520, 2005.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549-557, 2004.

SAINSBURY, M., SOFOWORA, E. A. Essential oil from the leaves and inflorescence of *Ocimum gratissimum*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3309-3310, 1971.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 371-400.

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, M. G. V. et al. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **ARKIVOC**, v. 2004 (vi), p. 66-71, 2004.

SILVA, M. G. V. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 289-326.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, p. 295-326, 1999.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from tropical African area. **Journal Essential Oil Research**, v. 18, p. 194-199, 2006.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 8, p. 137-142, 2001.

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

VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

WALSH, S. E. et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 240-247, 2003.

WANG, L., WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

YAYI, E. et al. *Ocimum gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1013-1018, 2004.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

# APÊNDICE

## MANUSCRITO 1

SILVA, L. L.; HEINZMANN, B. M. Anti-infective and toxicological effects of *Ocimum gratissimum* L.: a review. Submetido à Food and Chemical Toxicology.

**Anti-infective and toxicological effects of *Ocimum gratissimum* L.: a review**

Lenise de Lima Silva, Berta Maria Heinzmann\*

*Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Prédio 26, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

\*Mailing Address: Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Prédio 26, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail address: hberta@ccs.ufsm.br . Tel: +5555-3220 9366; Fax: +5555-3220-9366

Running title: *O. gratissimum*: Anti-infective and Toxicology

Keywords: *Ocimum gratissimum*, anti-infective, toxicology

Abbreviations:

ATCC, American Type Culture Collection; LC<sub>50</sub>, mean lethal concentration; EC<sub>90</sub>, 90% effective concentration; EO, essential oil; GST, glutathione S-transferase; HIV, Human Immunodeficiency Virus; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; LD<sub>50</sub>, mean lethal dose; MIC, minimum inhibitory concentration.



**Abstract**

*Ocimum gratissimum* L., clove basil or tree basil, is widely distributed in tropical and warm-temperature regions, and is used as a food flavoring and for medicinal purposes. This review compiles phytochemical, anti-infective and toxicological studies, aiming to synthesize existing scientific evidence for the uses of this plant as an antimicrobial agent. Some popular uses reported are as an antiseptic or antidiarrheal, and as a treatment for fever, worms and gastrointestinal complaints. Antimicrobial and antiparasitic activities were demonstrated in biological studies. The greatest activity is observed against Gram-positive bacteria, followed by fungi and Gram-negative bacteria. Different microorganisms are susceptible to the action of the plant preparations; therefore, uses as an antibiotic agent, food preservative and pesticide can be suggested for this species. Because most of the studies were carried out with the essential oil, its constituents are likely responsible for the reported activities. Toxicological pre-clinical studies have shown that oral use is well tolerated. Clinical studies with topical preparations showed mild and tolerable adverse effects. However, further clinical studies are necessary to establish whether the pharmacokinetic aspects alter the activities reported in animal and *in vitro* studies, and to ensure that *O. gratissimum* is safe and efficacious for human use as an anti-infective agent.

**Key words:** *Ocimum gratissimum*, anti-infective, toxicology

## 1. Introduction

*Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) is one of the few species belonging to the tribe Ocimeae that occurs in both the New and Old World (Paton et al., 2004). It is an aromatic herb, 50-250 cm in height, with a woody base. It is perennial or annual in cold regions, and inhabits coastal areas, forests and dry savanna, always close to human dwellings. It is widely used medicinally, horticulturally and to flavor food (Iwu, 1993; Ehlert et al., 2004; Paton et al., 2004).

Great morphological variability is observed for this plant, specifically in the indumentum of the stem and leaves and the form of inflorescences. Two varieties are distinguished: var. *gratissimum* (= *O. viride*, *O. suave* and *O. guineense*) and var. *macrophyllum* Briq. The former has generally hairy stems, pubescent and tomentose leaves and inflorescence shafts; and the latter has stems that are glabrous or have short hairs scattered on one or two surfaces of the stem, glabrous leaves or with hairs scattered on the lower nerves, and hairy inflorescence shafts (Albuquerque and Andrade, 1998a).

The aim of this study was to compile an up-to-date and comprehensive review of *O. gratissimum* that covers phytochemical, anti-infective and toxicological studies, in order to synthesize existing scientific evidence for the use of this plant as an antimicrobial agent.

## 2. Ethnopharmacology and traditional uses

*O. gratissimum* has similar ethnomedical uses in African and Afro-Brazilian culture. These similarities originated from the transport of African plant species together with knowledge of their traditional uses to Brazil, by Europeans and African slaves during Brazil's colonial period. Other common uses in Brazil were influenced by American Indians (Albuquerque and Andrade, 1998b).

In parts of West Africa, *O. gratissimum* is used as a diaphoretic, stomachic, laxative, antiseptic, general tonic, and antidiarrheal; as a treatment for cough, fever, rheumatic pains, haemorrhoids, bronchitis and conjunctivitis; and as an ingredient of many malaria remedies (Onajobi, 1986; Iwu, 1993). In Cuba, uses as an antispasmodic and for cases of worms and eye and ear infections are reported for the leaves (Montalvo and Domínguez, 1997). In Brazil, a tea and tincture of this plant are used as a mouthwash, and its aerial parts as a condiment for meat (Matos, 1994; Silva et al., 2006). Table 1 compiles other uses of *O. gratissimum* reported by Brazilian ethnopharmacological surveys. The nutritional aspects related to its use in food are summarized in Table 2.

<Insert Table 1 here>

<Insert Table 2 here>

### 3. Phytochemistry

Many phytochemical screenings have been carried out on *O. gratissimum*. In the dried plant, the presence of amines, steroids and triterpenoids, reducing sugars, phenols, essential oil, flavonoids, saponins and quinones has been demonstrated (García et al., 1998). In the methanolic (Akah et al., 2007; Akinmoladun et al., 2007; Braga et al., 2007) and aqueous extracts from leaves, alkaloids, tannins, steroids, terpenoids, flavonoids, cardiac glycosides and saponins have been detected. Aqueous extracts from leaves have also given positive reactions for the presence of phenols, anthraquinones, cardiac glycosides with deoxy-sugars, triterpenoids and carbohydrates (Aziba et al., 1999; Offiah and Chikwendu, 1999; Edeoga et al., 2006; Oboh, 2006b; Akinmoladun et al., 2007). For ethanolic extracts, the literature describes the presence of tannins, saponins, anthraquinones and cardiac glycosides (Oboh, 2006a). The methanolic extract of flowers showed positive reactions for alkaloids, triterpenoids, tannins and flavonoids (Braga et al., 2007). Regarding these phytochemical

groups, total contents of phenolics of 300 mg % by acetone extract (Oboh, 2005),  $125 \pm 0.11$  mg % by acetone-methanol-water (7:7:6) extract (Chanwitheesuk et al., 2005), 0.026-0.049 % by aqueous extract (Edeoga et al., 2006) and  $3.6 \pm 0.2$  g % by ethanol extract (Oboh, 2006a). Contents of carotenes of  $2.56 \pm 0.09$  % by hexane extract; xanthophylls of  $7.94 \pm 0.03$  mg % by hexane extract; tannins of  $24.3 \pm 0.08$  mg % by aqueous extract (Chanwitheesuk et al., 2005) and 3.512 mg % and flavonoids of 1.994 mg % by methanol extract (Araújo et al., 2008) have been reported.

In regard to the isolated constituents, Onajobi (1986) obtained fairly polar compounds from a crude lipid extract of *O. gratissimum*. Oleanolic acid was isolated from the methanolic residue (Njoku et al., 1997), and an aliphatic hydrocarbon mixture (C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub>, C<sub>34</sub> and C<sub>35</sub>), eugenol, caryophyllene oxide and a mixture of stigmasterol and sitosterol were obtained from the dichloromethane fraction of the hexane: dichloromethane: ethanol (1:3:1) extract.

An acidic xylan composed of D-xylose (48%), L-arabinose (16%), D-galactose (16%) and D-galacturonic acid (20%) was isolated from the capsular, mucilaginous polysaccharide-complex of the seeds of this species (Anjaneyalu et al., 1983).

However, most investigators have studied the essential oil (EO) by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Its composition suggests the existence of two chemotypes, one thymol-rich (Sainsbury and Sofowora, 1971; García et al., 1998; Martins et al., 1999; Yayi et al., 2004; Tchoumboungang et al., 2006) and the other eugenol-rich (Silva et al., 1999; Jirovetz et al., 2003; Madeira et al., 2005; Freire et al., 2006; Tchoumboungang et al., 2006). Additional chemotypes have also been reported, including ethyl cinnamate (Dubey et al., 2000) and geraniol (Vieira et al., 2001).

The chemical composition of the EO of *O. gratissimum* has been shown to vary during daytime (Silva et al., 1999; Yayi et al., 2004; Madeira et al., 2005). The highest yields of EO were obtained from plants 2-5 months old and collected at noon (Yayi et al., 2004). Also,

different relative amounts of the main components of EO were obtained with different extractive methods, including steam distillation, microwave oven distillation, and supercritical extraction with CO<sub>2</sub> (Silva et al., 2004). However, eugenol and 1,8-cineole are the most abundant compounds of the EO at different seasons, whereas the highest relative percentage of sesquiterpenes occurs in spring (Freire et al., 2006).

Vieira et al. (2001) showed that *O. gratissimum* var. *gratissimum* contains eugenol as the major volatile oil constituent and cirsimaritin as the major flavone. In contrast, *O. gratissimum* var. *macrophyllum* contains thymol as the major volatile oil constituent and xanthomicrol as the major flavone. The structures of major volatiles and other compounds identified in *O. gratissimum* are shown in Figure 1.

<Insert Figure 1 here>

In the *Ocimum* clade, 5-hydroxy-6, 7-dimethoxyflavones and 8-oxygenated flavones are present in all species (Paton et al., 2004). In the extract of *O. gratissimum*, rosmarinic acid, quercetin-3-*O*-glycosides (Figure 1 - 1 and 3), kaempferol-3-*O*-glycosides (Figure 1 - 2 and 13), methoxylated flavone aglycones and their derivatives (cirsimaritin (Figure 1 - 4), xanthomicrol (Figure 1 - 5)), luteolin (Figure 1 - 10 and 11) and apigenin (Figure 1 - 6-9, 12) have been identified (Grayer et al., 2000, 2002).

The presence of caffeic acid esters (nepetoidins A and B) in *O. gratissimum* is characteristic, and is one feature distinguishing the Nepetoideae from the other subfamilies of Lamiaceae and related families (Grayer et al., 2003).

## **4. Biological activity**

### *4.1. Antimicrobial activity*

Antibacterial and antifungal activities of *O. gratissimum* are shown in Table 3. About 14 of 20 studies and 17 of 18 studies were carried out with EO of *O. gratissimum* against bacteria and fungi respectively (Table 3). Other studies used extracts prepared in water (Ilori et al., 1996; Iwalokun et al., 2001; Adebolu and Oladimeji, 2005; Akinyemi et al., 2005; Ijeh et al., 2005), ethanol (Akinyemi et al., 2005; Duarte et al., 2005; Ijeh et al., 2005; Lemos et al., 2005; Silva et al., 2005; Faria et al., 2006; Oboh, 2006a) or methanol (Chah et al., 2006; Braga et al., 2007). The different extraction methods used in these studies are not shown in Table 3.

Used as a fungicide, the EO showed equal or superior efficacy to synthetic commercial fungicides against pathogens of betelvine (*Piper betle* L.) (Tripathi et al., 1985). *Ocimum* powder (3%) can be utilized for long-term preservation of small lots (3.5 kg) of groundnut kernels packaged in jute bags and polypropylene-mesh bags against *Aspergillus parasiticus* (Awuah and Ellis, 2001). The EO (4.8  $\mu\text{L/g}$ ) reduced the incidence of *Fusarium verticillioides* in corn and inhibited total fungal growth over 21 days, although the fumonisin level in treated corn was maintained throughout a 6-week storage period in closed conditions (Fandohan et al., 2004). Against *A. flavus* at pH 3.0 and 4.5, EO activity remained stable at both pHs, whereas the efficacy of potassium sorbate as a food preservative was reduced at the higher pH (Nguefack et al., 2004b).

Combined with antibiotics, the EO increased their activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 and some fungi (Jedličková et al., 1992). Iwalokun et al. (2003) reported a decrease of the MIC of antibiotics and an increase of the susceptibility of *Shigella* strains against antimicrobial agents in subinhibitory concentrations (0.75 and 1  $\mu\text{g/mL}$ ) of EO. Furthermore, these authors suggested anti-virulent effects of *O. gratissimum* EO in these concentrations on *Shigella* sp., and decreased extracellular protease activity, o-lipopolysaccharide rhamnose content, and the incidence of

invasiveness estimated as keratoconjunctivitis in guinea pigs. Nguefack et al. (2004a), using flow cytometry, observed permeabilization of the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* exposed to EO.

Formulations of 2% EO in several bases demonstrated higher *in vitro* antibacterial effects than those of commercial antiseptic products against type strains and clinical isolates from boils, wounds and pimples. EO was more effective when incorporated into hydrophilic bases than lipophilic ones. Solubilization and microemulsification grossly reduced its antimicrobial activity (Orafidiya et al., 2001). However, in guinea pigs, the application of an EO ointment (1000 µg/mL) prepared in polyethylene glycol cured experimentally induced dermatomycoses caused by *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum gypseum* in 11 and 9 days, respectively (Tiwari et al., 2003).

In rats orogastrically infected with *Escherichia coli* (NCIB 86), the ethanolic extract decreased white blood count, packed cell volume, hemoglobin content and neutrophils circulating in the blood when compared with a control. Furthermore, negative results of ketone, nitrite, protein, bilirubin, hemoglobin and reduction of pus cells, casts, crystals and bacterial cells in urine were also observed in treated animals. Therefore, the prepared extract was able to inhibit or cure *E. coli* infection in rats by modulating or normalizing the immunological indices. It could also prevent excessive breakdown of red blood cells and destruction of the cells by microorganism enterotoxins (Oladunmoye, 2006).

<Insert Table 3 here>

#### 4.2. Antiparasitic activity

The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) and other experimental results of antiparasitic activity tests of EO and extracts of *O. gratissimum* are summarized in Table 4. The methanol residue of *O. gratissimum* did not produce significant paralysis in *Haemonchus*

*contortus* and *Heligmosomoides polygyrus* larvae *in vitro* (Njoku and Asuzu, 1998). However, the inhibitory activity against nematode glutathione S-transferases (GSTs) produced by *O. gratissimum* extract may be at least partially responsible for the anthelmintic effects of this plant (Fakae et al., 2000). In addition, EO was shown to cause mitochondrial alterations at the ultrastructural level in *Herpetomonas samuelpessoai* at 100 µg/mL (Holetz et al., 2003) and in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* at IC<sub>50</sub> values (Ueda-Nakamura et al., 2006). Decreased activity of the succinate cytochrome-C reductase enzyme of the trypanosomatid *H. samuelpessoai* (Holetz et al., 2003) and interference in cell division of *L. amazonensis* (Ueda-Nakamura et al., 2006) were also observed after EO administration. Furthermore, the *in vitro* pretreatment of mouse peritoneal macrophages with 100 and 150 µg/mL of EO reduced the indices of association between promastigotes of *L. amazonensis* and the macrophages, followed by increased nitric-oxide production by macrophages before and after infection (Ueda-Nakamura et al., 2006).

EO (25-100 µg/mL) was as effective as carbofuran in inhibiting larval survival and egg hatching of *Phatylenchus brachyurus* *in vitro*, after 24 h. Reduction in the population under greenhouse conditions (soil and tomato roots) was also observed for the EO. However, when it was combined with EO of *Ocimum basilicum* (1:1), the mixture was more effective in controlling the nematodes, which suggests a synergistic effect between these oils (Onifade, 2007). Aqueous extract from roots of *O. gratissimum* effectively controlled the tomato root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in soil, with corresponding increases in plant height, leaf and fruit yield over the control treatment (Olabiyi, 2008).

<Insert Table 4 here>

#### 4.3. Antiviral activity



The aqueous extract of the leaves of *O. gratissimum* inhibited HIV-1 strain HTLVIII<sub>B</sub> cytopathicity with high antiviral indices. Against HIV-2 strain GH1, effective activity was observed when treatment started at 40 min after virus adsorption, as well as when treatment was delayed for 2 h, unlike AZT in the latter case. Additionally, only the extract was able to attain 90% effective concentration (EC<sub>90</sub>) values when high multiplicity of infection (MOI) with HIV-1 strain GH3 was used and treatment was delayed for 2 h. In Molt-4 cocultures with Molt-4/HIV, the early cytopathic effect of cell fusion was unaffected by AZT, but was completely inhibited by the extract at non-cytotoxic concentrations. The plant extract also inhibited HIV-1 reverse transcriptase activity in the synthesis of DNA from RNA template and proviral DNA copying by taq polymerase (Ayisi and Nyadedzor, 2003).

## 5. Toxicological effects

The mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) values and experimental conditions of acute toxicity tests of EO and extracts of *O. gratissimum* on animals are summarized in Table 5. This table also includes the results of mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in assays using *Artemia salina* L., since a good correlation ( $r= 0.85$ ,  $p< 0.05$ ) was observed between this *in vitro* test and *in vivo* tests for predicting the oral acute toxicity of plant extracts (Parra et al., 2001).

Parra et al. (1999) detected no significant differences between the acute toxicological effects of the fluid extract (62% ethanol) of *O. gratissimum* in mice and the ethanolic vehicle, as well as in the macroscopic examination of organs and tissues, after 14 days of administration. However, the fluid extract at 30% showed acute toxicity effects in mice and nephrotoxic and hepatotoxic signs, 14 days after a single-dose oral administration, in a histopathological study (Hernández et al., 2006).

The aqueous extract of the leaves of *O. gratissimum* administered orally twice a week for four weeks in rabbits caused significant and dose-dependent decreases in liver enzymes

(alanine aminotransamine, aspartate aminotransaminase and alkaline phosphatase) and hemoglobin level, packed cell volume, red blood cells and white blood cells. Histopathological changes in kidneys and intestine (jejunum) were also observed. This was indicative of diuretic action and of effects on bowel discharge and mucus secretion. In the liver, the extract showed higher necrotic changes at a low dose (0.4 g/kg) and hepatoprotective activity at higher doses (1.6 g/kg) (Efraim et al., 2000, 2003). However, a diet containing 4% garlic along with 40% leaf supplement for 14 days did not prevent garlic-induced hepatotoxicity in rats (Obboh, 2006b). An aqueous extract (500-1500 mg/kg) of *O. gratissimum* administered orally in rats for 28 days also did not change normal serum levels of the liver enzymes, total protein, albumin and bilirubin (Egesie et al., 2006).

Orafidiya et al. (2004a) investigated oral and intra-peritoneal acute toxicity in mice and rats, and sub-chronic toxicity of the EO in rats. A dose-dependent sedative effect of *Ocimum* oil was observed during acute and sub-chronic toxicity studies. Changes in weight of rat testes, hearts, kidneys, intestines and lungs were not statistically significant in analyses after a 30-day treatment period. However, significant liver and brain enlargement was observed. Analyses of blood biochemical, hematological and histopathological findings showed significant differences between control and treated groups, and revealed an inflammatory response that transited from acute to chronic on persistent administration. As expected, this study suggested that *Ocimum* oil might be better tolerated when administered orally for systemic delivery, because  $DL_{50}$  values were higher and no death during the sub-chronic test period was observed in this group. Fandohan et al. (2008) observed no morphological alterations in the stomach (5-1000 mg/Kg) and liver (>1000 mg/Kg) of rats after a subacute study. However, at higher doses, the stomach wall was altered, due to the invasion of the lamina propria and adjacent tissues by leukocytes such as neutrophil and eosinophil polymorphonuclear leukocytes.

Phytotoxic effects were not observed for the EO used as a fungicide against *Piper betle* cv. Desawari (Tripathi et al., 1985) or as a nematocide against *Lycopersicon esculentum* cv. West coast TM782C (Onifade, 2007). However, when used as a fungicide, EO adversely affected corn kernel germination at 4.8  $\mu\text{L/g}$  (Fandohan et al., 2004); whereas an aqueous extract showed no toxicity to seedlings of *Vigna unguiculata* (Alabi et al., 2005a).

<Insert Table 5 here>

## 6. Clinical studies

Topical application of *O. gratissimum* (dry or fresh form) showed activity against dermatophytes of scalp and hands of children (3-8 years), after two weeks of twice-daily application. Oral treatment with an aqueous extract did not act against mycoses, but did expel worms (Obot and Aluyi, 2002).

A clinical study was carried out with 126 subjects over a period of 4 weeks, to determine the clinically effective concentration and most appropriate base for a topical *O. gratissimum* EO formulation for the management of acne vulgaris. Preparations containing the oil, at 2% and 5%, using alcohol- and cetomacrogol-blend bases, were significantly more effective and reduced lesions faster than 10% benzoyl peroxide lotion. Adverse effects reported for the 5% *Ocimum* oil preparations were minimal and tolerable. The base in which the oil was incorporated exerted considerable influence on its activity. Highest activity was observed in the alcohol preparation, followed by the cetomacrogol blend, polysorbate 80 and then petrolatum, in which activity was relatively low (Orafidya et al., 2002). Another clinical study with 84 subjects found that the efficacy of *Ocimum* oil lotion products increased with increasing aloe-gel content. Products formulated with undiluted or 50% aloe gel were most active and resolved inflammatory lesions faster than a 1% clindamycin preparation. The aloe

gel alone showed minimal activity. Adverse effects were mild and tolerable (Orafidiya et al., 2004b).

## 8. Conclusion

The studies of the biological activities described in this review provide the scientific basis for ethnopharmacological uses of *O. gratissimum* as an antiseptic and antiparasitic agent. The action against infectious diseases can be related to the sum of antimicrobial and immunological activities, and the action in cases of fever and worms can be related to antiparasitic activity. Antidiarrheal effects may be due to antimicrobial activity against *Enterobacteriaceae*.

Differences between antimicrobial test methods, microorganisms, samples and their compositions can also be found in the literature, and do not allow broad comparisons between data. However, the greatest effectivity can be observed against Gram-positive bacteria, followed by fungi and Gram-negative bacteria. The findings of the broad spectrum of antimicrobial activity of *O. gratissimum* lead us to suggest that it may have beneficial uses as a food preservative and pesticide, and in the treatment of some human infectious diseases.

Considering that most studies were carried out with the EO, its constituents are certainly responsible or coresponsible for the reported activities. Furthermore, among the isolated compounds, only oleanolic acid demonstrated antiparasitic activity. Flavonoids were not correlated with any of the activities treated in this review, until now.

Toxicity studies in animals have shown that this plant can be well tolerated when administered orally. The LD<sub>50</sub> values reported for this form of administration are higher than the therapeutic doses used in many studies, and indicate that this is a safe plant from the toxicological point of view. Clinical studies carried out with topical preparations have also shown mild and tolerable adverse effects. Despite these findings, further clinical studies are

necessary to assess whether pharmacokinetic aspects change the activities detected in pre-clinical studies or by other forms of administration, and to ensure that *O. gratissimum* is safe and efficacious for human use as an anti-infective agent.

**Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgement**

The authors are grateful to CAPES for financial support.

## References

- Acosta, M., González, M., Araque, M., Velazco, E., Khourl, N., Rojas, L., Usubillaga, A., 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Rev. Facultad de Farmacia* 45, 19-24.
- Adebolu, T.T., Oladimeji, S.A., 2005. Antimicrobial activity of leaf extracts of *O. gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 682-684.
- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacognosy* 17, 114-140.
- Akah, P.A., John-Africa, L., Nworu, C.S., 2007. Gastro-protective properties of the leaf extracts of *Ocimum gratissimum* L. against experimental ulcers in rat. *Int. J. Pharmacol.* 3, 461-467.
- Akinmoladun, A.C., Ibukun, E.O., Afor, E., Obuotor, E.M., Farombi, E.O., 2007. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Sci. Res. Essay* 2, 163-166.
- Akinyemi, K.O., Oladapo, O., Okwara, C.E., Ibe, C.C., Fasure, K.A., 2005. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complement. Altern. Med.* 5, 1-7.
- Alabi, D.A., Oyero, I.A., Jimoh, Amusa, N.A., 2005a. Fungitoxic and phytotoxic effect of *Vernonia amygdalina* (L), *Bryophyllum pinnantus* Kurz, *Ocimum gratissimum* (Closium) L. and *Eucalyptna globules* (Caliptos) Labill water extracts on cowpea and

- cowpea seedling pathogens in Ago-Iwoye, South Western Nigeria. *World J. Agric. Sci.* 1, 70-75.
- Alabi, D.A., Onibudo, M.Z., Amusa, N.A., 2005b. Chemicals and nutritional composition of four botanicals with fungitoxic properties. *World J. Agric. Sci.* 1, 84-88.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114, 325–354.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., 1998a. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el Nordeste del Brasil. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56, 43-64.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., 1998b. Etnobotánica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56, 107-118.
- Alcântara Júnior, J.P., Osuna, J.T.A., Queiroz, S.R.O.D., Rios, A.P., 2005. Ethnobotanical and ethnopharmacological surveys on medicinal plants from the municipality of Itaberaba-BA for cultivation and conservation. *Sitentibus Ser. Cienc. Biol.* 5, 39-44.
- Almeida, M.M.B., Lopes, M.F.G., Sousa, P.H.M., Nogueira, C.M.D., Magalhães, C.E.C., 2003. Determination of moisture, fibers, lipids, ashes and silica in medicinal plants. *B. CEPPA* 21, 343-350.
- Anjaneyalu, Y.V., Khan, M.R., Tharanathan, R.N., 1983. An acidic xylan from the capsular polysaccharide-complex of *Ocimum gratissimum* seeds. *Carbohydr. Res.* 116, 83-88.
- Araújo, T.A.S, Alencar, N.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 120, 72-80.
- Atal, C.K., Sharma, M.L., Kaul, A., Khajuria, A., 1986. Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary screening. *J. Ethnopharmacol.* 18, 133-141.

- Awuah, R.T., Ellis, W.O., 2001. Effects of some groundnut packaging methods and protection with *Ocimum* and *Syzygium* powders on kernel infection by fungi. *Mycopathol.* 154, 29-36.
- Ayisi, N.K., Nyadedzor, C., 2003. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. *Antiviral Res.* 58, 25–33.
- Aziba, P.I., Bass, D., Elegbe, Y., 1999. Pharmacological investigation of *Ocimum gratissimum* in rodents. *Phytother. Res.* 13, 427-429.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 11, 396-402.
- Chah, K.F., Eze, C.A., Emuelosi, C.E., Esimone, C.O., 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 104, 164-167.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N., 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem.* 92, 491-497.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79, 213-220.
- Díaz, L.H., Jorge, M.R, García, D., Alea, J.P., 2003. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. *Rev Cubana Plant Med.* 8 (2), 0-0, ISSN 1028-4796.



- Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz Jr., M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73, 69–91.
- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.* 111, 197-201.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305-311.
- Dubey, N.K., Tiwari, T.N., Mandin, D., Andriamboavonjy, H., Chaumont, J.P., 2000. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia* 71, 567-569.
- Edeoga, H.O., Omosun, G., Uche, L.C., 2006. Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 892-895.
- Effraim, K.D., Jacks, T.W., Sodipo, O.A., 2003. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leaves extract on some organs of rabbit. *Afr. J. Biomed. Res.* 6, 21-25.
- Effraim, K.D., Salami, H.A., Osewa, T.S., 2000. The effect of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* on haematological na biochemical parameters in rabbits. *Afr. J. Biomed. Res.* 3, 175-179.
- Egesie, U.G., Adelaiye, A.B., Ibu, J.O., Egesie, O.J., 2006. Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Nigerian J. Physiol. Sci.* 21, 31-35.
- Ehlert, P.A.D., Luz, J.M.Q., Innecco, R., 2004. Vegetative propagation of the wild basil using different types of cuttings and substrata. *Hortic. Bras.* 22, 10-13.

- Enikuomehin, O.A., Ikotun, T., Ekpo, E.J.A., 1998. Evaluation of ash from some tropical plants of Nigeria for the control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. on wheat (*Triticum aestivum* L.). Mycopathol. 142, 81-87.
- Fakae, B.B., Campbell, A.M., Barrett, J., Scott, I.M., Teesdale-Spittle, P.H., Liebau, E., Brophy, P.M., 2000. Inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) from parasitic nematodes by extracts from traditional Nigerian medicinal plants. Phytother. Res. 14(8), 630-634.
- Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J.D., Darboux, R., Moudachirou, M., 2008. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. Food Chem. Toxicol. 46, 2493-2497.
- Fandohan, P., Gbenou, J.D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W.F.O., Wingfield, M.J., 2004. Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. J. Agric. Food Chem. 52, 6824-6829.
- Faria, T. J., Ferreira, R.S., Yassumoto, L., Souza, J. R.P., Ishikawa, N.K., Barbosa, A. M., 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 867-871.
- Franco, A.L.P., Oliveira, T.B., Ferri, P.H., Bara, M.T.F., Paula, J.R., 2007. Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L. Rev. Eletr. Farm. 4, 208-220.
- Franco, E.A.P., Barros, R.F.M., 2006. Use and diversity of medicinal plants at the “Quilombo Olho D’água dos Pires”, Esperantina, Piauí State, Brazil. Rev. Bras. Pl. Med. 8, 78-88.

- Freire, C.M.M., Marques, M.O.M., Costa, M., 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. J. Ethnopharmacol. 105, 161-166.
- García, D., Pupo, S., Crespo, M., Fuentes, L., 1998. Estudio farmacognóstico de *Ocimum gratissimum* L.(Orégano Cimarrón). Rev. Cubana Plant. Med. 31, 31-36.
- Grayer, R.J., Eckert, M.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Marin, P.D., Kokubun, T., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. Phytochemistry 64, 519-528.
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Veitch, N.C., Eckert, M.R., Marin, P.D., Senanayake, P., Paton, A.J., 2002. Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. Biochem. Syst. Ecol. 30, 327-342.
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Abou-Zaid, M., Archer, L.J., 2000. The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography-mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. Phytochem. Anal. 11, 257-267.
- Hernández, N.B., Ruiz, A.R. Parra, A.V., 2006. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. Rev. Cubana Plant. Med. 11(1), 0-0, ISSN 1028-4796.
- Holetz, F.B., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Morgado-Díaz, J.A., Nakamura, C.V., 2003. Effect of essential oil of *Ocimum gratissimum* on the trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. Acta Protozool. 42, 269-276.
- Holetz, F.B., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., 2002. Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. Acta Sci. Health Sci. 24, 657-662.

- Ifesan, B.O.T., Ijarotimi, O.S., Osundahunsi, O.F., 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Ocimum* sp. J. Food Tech. 4, 318-321.
- Ijeh, I.I., Omodamiro, O.D., Nwanna, I.J., 2005. Antimicrobial effects of aqueous and ethanolic fractions of two spices, *Ocimum gratissimum* and *Xylopia aethiopica*. Afr. J. Biotechnol. 4, 953-956.
- Ilory, M.O., Sheteolu, A.O., Omonibgehin, E.A., Adeneye, A.A., 1996. Antidiarrhoeal activities of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). J. Diarrhoeal Dis. Res. 14, 283-285.
- Iwalokun, B.A., Gbenle, G.O., Adewole, T.A., Smith, S.I., Akinsinde, K.A., Omonigbehin, E.O., 2003. Effects of *Ocimum gratissimum* L. essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigeria. APMIS 111, 477-482.
- Iwalokun, B.A., Gbenle, G.O., Adewole, T.A., Akinsinde, K.A., 2001. Shigelloidal properties of three Nigerian medicinal plants: *Ocimum gratissimum*, *Terminalia avicennoides*, and *Momordica balsamina*. J. Health Popul. Nutr. 19, 331-335.
- Iwu, M.M., 1993. Pharmacognostical Profile of Selected Medicinal Plants. In: Handbook of African Medicinal Plants, CRC Press Inc., Florida, pp. 214-215.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Ntezurubanza, L., Baerheim Svendsen, A., 1989. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. J. Ethnopharmacol. 26, 57-63.
- Jedličková, Z., Mottl, O., Šerý, V., 1992. Antibacterial properties of the Vietnamese Cajeput oil and *Ocimum* oil in combination with antibacterial agents. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 36, 303-309.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Shafi, M.P., Kaniampady, M.M., 2003. Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. Eur. Food Res. Technol. 217, 120-124.

- Kaou, A.M., Mahiou-Leddou, V., Hutter, S., Ainouddine, S., Hassani, S., Yahaya, I., Azas, N., Ollivier, E., 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 116, 74–83.
- Lemos, J.A., Passos, X.S., Fernandes, O.F.L., Paula, J.R., Ferri, P.H., Souza, L.K.H., Lemos, A.A., Silva, M.R.R., 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 55-58.
- Lima, C.B., Bellettini, N.M.T., Silva, A.S., Cheirubim, A.P., Janani, J.K., Vieira, M.A.V., Amador, T.S., 2007. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. *Brazilian Journal of Biosciences* 5, 600-602.
- Lima, E.O., Gompertz, O.F., Paulo, M.Q., Giesbrech, A.M., 1992. *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. *Rev. Microbiol.* 23, 1992.
- Lopes, M.F.G., Almeida, M.M.B., Nogueira, C.M.D., Morais, N.M.T., 2001. Physical-chemical characterization of some species of medicinal plants. *Rev. Bras. Pl. Med.* 4, 95-98.
- Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Melo, J.C.P., Nakamura, C.V., 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41, 85-94.
- Madeira, S.V.F., Rabelo, M., Soares, P.M.G., Souza, E.P., Meireles, A.V.P., Montenegro, C., Lima, R.F., Assreuy, A.M.S., Criddle, D.N., 2005. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea pig ielum. *Phytomedicine* 12, 506-509.
- Martins, A.P., Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomi, F., Cañigüeral, S., Casanova, J., Cunha, A.P., Adzet, T., 1999. Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*. *Planta Med.* 65, 187-189.

- Matos, F.J.A., 1994. Alfavaca-cravo. *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). In: Farmácias vivas, Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 55-56.
- Mesia, G.K., Tona, G.L., Nanga, T.H., Cimanga, R.K., Apers, S., Cos, P., Maes, L., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2008. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 115, 409-415.
- Mohammed, A., Tanko, Y., Okasha, M.A., Magaji, R.A., Yaro, A.H., 2007. Effects of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 2087-2090.
- Montalvo, R.V., Domínguez, C.C., 1997. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano cimarrón). *Rev. Cubana Plant Med.* 2(2-3), 14-18.
- Moundipa, P.F., Flore, K.G.M., Bilong, C.F.B, Bruchhaus, I., 2005. *In vitro* amoebicidal activity of some medicinal plants of the bamun region (Cameroon). *Afr. J. Trad. CAM* 2, 113-121.
- Nakamura, C.V., Ishida, K., Faccin, L.C., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Rozental, S., Souza, W., Ueda-Nakamura, T., 2004. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. *Res. Microbiol.* 155, 579-586.
- Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Bando, E., Melo, A.F.N., Cortez, D.A.G., Dias Filho, B.P., 1999. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 675-678.
- Ndounga, M., Ouamba, J.M., 1997. Antibacterial and antifungal activities of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *O. basilicum* from Congo. *Fitoterapia* 68, 190-191.
- Ngassoum, M.B., Essia-Ngang, J.J., Tatsadjieu, L.N., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Adjoudji, O., 2003. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia* 74, 284-287.

- Nguefack, J., Nguikwie, S.K., Fotio, D., Dongmo, B., Amvam Zollo, P.H., Leth, V., Nkengfack, A.E., Poll, L., 2007. Fungicidal potential of essential oils' and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, Two Seed-Borne Fungi of Rice (*Oryza Sativa* L.). J. Essent. Oil Res. 19, 581-587.
- Nguefack, J., Budde, B.B., Jakobsen, M., 2004a. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett. Appl. Microbiol. 39, 395-400.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P.H., Mathur, S.B., 2004b .Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. Int. J. Food Microbiol. 94, 329-334.
- Njoku, C.J., Asuzu, I.U., 1998. The anthelmintic effects of the leaf extract of *Ocimum gratissimum* (L.). Phytomedicine 5(6), 485-488.
- Njoku, C.J., Zeng, L., Asuzu, I.U., Oberlies, N.H., McLaughlin, J.L., 1997. Oleanolic Acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). Int. J. Pharmacog. 35, 134-137.
- Obiajunwa, E.I., Adebajo, A.C., Omobuwajo, O.R., 2002. Essential and trace element contents of some Nigerian medicinal plants. J. Radioanal. Nucl. Chem. 252, 473-476.
- Oboh, G., 2006a. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* leaves. J. Pharmacol. Toxicol. 1, 47-53.
- Oboh, G., 2006b. Tropical green leafy vegetables prevent garlic-induced hepatotoxicity in the rat. J. Med. Food 9, 545- 551.
- Oboh, G., 2005. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. LWT - Food Sci. Technol. 38, 513-517.

- Obot, M.S.J., Aluyi, H.S.A., 2002. Treatment of superficial mycoses with *Ocimum gratissimum*. Int. J. Infect. Dis. 6, 151.
- Offiah, V.N., Chikwendu, U.A., 1999. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 68, 327-330.
- Olabiya, T.I., 2008. Pathogenicity study and nematotoxic properties of some plant extracts on the root-knot nematode pest of tomato, *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill. Plant Pathol. J. 7, 45-49.
- Oladunmoye, M.K., 2006. Immunostimulatory activity of ethanolic leaf extract from *Ocimum gratissimum* in albino rat orogastrically dosed with *Escherichia coli* (NCIB 86). J. Pharmacol. Toxicol. 1, 389-394.
- Oliveira, C.J., Araujo, T.L., 2007. Medicinal plants: uses and beliefs of elderly carriers of arterial hypertension. Rev. Eletrônica Enferm. 9, 93-105.
- Onajobi, F.D., 1986. Smooth muscle contracting lipid-soluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*. J. Ethnopharmacol. 18, 03–11.
- Onifade, A.K., 2007. Effect of essential oils from five *Ocimum* sp. on the pathogenicity of *Phatylenchus brachyurus* (Godfrey) in tomato. Agric. J. 2, 185-191.
- Orafidiya, L.O., Adesina Jr, S.K., Igbeneghu, O.A., Akinkunmi, E.O., Adetogun, G.E., Salau, A.O., 2006. The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against common wound-infecting organisms. Int. J. Aromatherapy 16, 57-62.
- Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Iwalewa, E.O., Adelusola, K.A., Oyedapo, O.O., 2004a. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. Phytomedicine 11, 71–76.
- Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Oyedele, A.O., Babalola, O.O., Onayemi, O., Aiyedun, F.F., 2004b. The effect of *Aloe vera* gel on the anti-acne properties of the essential oil of



- Ocimum gratissimum* Linn leaf – a preliminary clinical investigation. Int. J. Aromatherapy 14, 15-21.
- Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Oyedele, A.O., Babalola, O.O., Onayemi, O., 2002. Preliminary clinical tests on topical preparations of *Ocimum gratissimum* Linn leaf essential oil for the treatment of acne vulgaris. Clin. Drug Invest. 22, 313-319.
- Orafidiya, L.O., Oyedele, A.O., Shittu, A.O., Elujoba, A.A., 2001. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. Int. J. Pharm. 224, 177-183.
- Oussou, K.R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Koukoua, G., Dosso, M., N'Guessan, Y.T., Figueredo, G., Chalchat, J.C., 2004. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. C. R. Chimie 7, 1081-1086.
- Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sandiñas, I.G., Buena, L.I., 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine 8, 395-400.
- Parra, A.L., Capó, J.T., Montalvo, R.V., González, Y.C., 1999. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. Rev. Cubana Plant. Med. 1, 26-28.
- Paton, A.J., Springate, D., Suddee, S., Otieno, D., Grayer, R.J., Harley, M.M., Willis, F., Simmonds, M.S.J., Powell, M. P., Savolaine, V., 2004. Phylogeny and evolution of basil and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. Mol. Phylogenet. Evol. 31, 277-299.
- Pereira, R.S., Sumita, T.C., Furlan, M.R., Jorge, A.O.C., Ueno, M., 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. Rev. Saúde Públ. 38, 326-328.

- Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasit.* 109, 59-63.
- Reddy, P.R.K., Reddy, S.J., 1997. Elemental concentrations in medicinally important leafy materials. *Chemosphere* 34, 2193-2212.
- Rosset, M., Zamarion, V.M., Faccione, M., Faria, T.J., Pinto, J.P., Barbosa, A.M., Souza, J.R.P., 2005. Phytochemical investigation of dichloromethanic fraction on *Ocimum gratissimum* L. extract. *Semina: Ciências Agrárias* 26, 515-520.
- Sainsbury, M., Sofowora, E.A., 1971. Essential oil from the leaves and inflorescence of *Ocimum gratissimum*. *Phytochemistry* 10, 3309-3310.
- Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35, 275-280.
- Silva, M.I.G., Gondim, A.P.S., Nunes, I.F., Sousa, F.C.F., 2006. The use of herbal medicines in the family health care units in Maracanaú (CE). *Braz. J. Pharmacognosy* 16, 455-462.
- Silva, M.R.R., Oliveira Jr, J.G., Fernandes, O.F.L., Passos, X.S., Costa, C.R., Souza, L.K.H., Lemos, J.A., Paula, J.R., 2005. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. *Mycoses* 48, 172-175.
- Silva, M.G.V., Matos, F.J.A., Lopes, P.R.O., Silva, F.O., Holanda, M.T., 2004. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *ARKIVOC* 2004 (vi), 66-71.
- Silva, M.G.V., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Alencar, J.W., 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70, 32-34.

- Tchoumboungang, F., Amvam Zollo, P.H., Aviessi, F., Alitonou, G.A., Sohounhloue, D.K., Ouamba, J.M., Tsomambet, A., Andissa, N. O., Dagne, E., Agnaniyet, H., Bessièrè, J.M., Menut, C., 2006. Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* Species from Tropical African Area. *J. Essent. Oil Res.* 18, 194-199.
- Tchoumboungang, F., Amvam Zollo, P.H., Dagne, E., Mekonnen, Y., 2005. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta Med.* 71, 20-23.
- Tiwari, T. N., Chansouria, J.P.N., Dubey, N.K., 2003. Antimycotic potency of some essential oils in the treatment of induced dermatomycosis of an experimental animal. *Pharm. Biol.* 41, 351-356.
- Tripathi, P., Dubey, N.K., Shukla, A.K., 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 39-46.
- Tripathi, R.D., Banerji, R., Sharma, M.L., Balasubrahmanyam, V.R., Nigam, S.K., 1985. Toxicity of essential oil from a new strain of *Ocimum gratissimum* (Clocimum) against betelvine pathogenic fungi. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2277-2282.
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Maza, P.K., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Alviano, D.S., Rosa, M.S.S., Lopes, A.H.C.S., Alviano, C.S., Nakamura, C.V., 2006. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol. Int.* 55, 99-105.
- Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A., Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 287-304.

Yayi, E., Gbenou, J.D., Ahoussi, L.A., Moudachirou, M., Chalchat, J.C., 2004. *Ocimum gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. C. R. Chimie 7, 1013-1018.

Table 1

Reported uses of *Ocimum gratissimum* L. in ethnopharmacological surveys

Parts used	Ethnomedical use (Preparation(s))	References
Flowers	Digestive, expectorant and tranquilizer, in cases of flatulence, cough and itching. In cases of influenza and headache (decoction, syrup), stress and fatigue (bath).	Alcântara Júnior et al. (2005); Albuquerque et al. (2007).
Leaves	Treatment of bronchitis and cough (syrup, infusion), colds and as a diuretic (infusion). Digestive, emenagogue, expectorant, purgative and stomachic; in cases of headache (decoction, syrup). Fresh, as a condiment. In cases of flatulence, hypertension and itching, and as a tranquilizer. Treatment of influenza (bath, decoction, syrup, infusion), mycosis, and cases of stress and fatigue (bath).	Di Stasi et al. (2002); Sartorato et al. (2004); Alcântara Júnior et al. (2005); Duarte et al. (2005); Franco and Barros (2006); Albuquerque et al. (2007); Agra et al. (2007); Lima et al. (2007); Oliveira and Araújo (2007).
Roots	In cases of cough (syrup), headache (decoction and syrup), diarrhea and stomach complaints, and as a sedative for children (decoction).	Di Stasi et al. (2002).

Table 2

Nutrition aspects of the leaves of *O. gratissimum*

Composition	Labels (g%)	References
Carbohydrate	2.38	Alabi et al. (2005b)
	66.24 - 75.87	Edeoga et al. (2006)
	35.61 $\pm$ 0.05	Ifesan et al. (2006)
Crude Fibre	9.26	Alabi et al. (2005b)
	10.82	Lopes et al. (2001); Almeida et al. (2003)
	4.88 - 8.48	Edeoga et al. (2006)
	8.70 $\pm$ 0.09	Ifesan et al. (2006)
Crude Protein	11.4	Alabi et al. (2005b)
	9.19 - 17.94	Edeoga et al. (2006)
	20.18 $\pm$ 0.09	Ifesan et al. (2006)
Fat	13.7	Alabi et al. (2005b)
	1.44	Lopes et al. (2001); Almeida et al. (2003)
	1.06 - 4.90	Edeoga et al. (2006)
	11.78 $\pm$ 0.09	Ifesan et al. (2006)
	75.47	Lopes et al. (2001); Almeida et al. (2003)
Moisture	4.10 - 7.195	Edeoga et al. (2006)
	8.11 $\pm$ 0.10	Ifesan et al. (2006)
	10.25	Alabi et al. (2005b)
Total Ash	10.75	Lopes et al. (2001); Almeida et al. (2003)
	5.74 - 6.88	Edeoga et al. (2006)
	15.62 $\pm$ 0.07	Ifesan et al. (2006)
	357.68 - 373.26 mg/cal	Edeoga et al. (2006)
	0.0002	Alabi et al. (2005b)
Vitamin B1	0.00041	Alabi et al. (2005b)
Vitamin B6	0.00086	Alabi et al. (2005b)
Nicotinamide	0.01535	Alabi et al. (2005b)
Vitamin C	0.00509 $\pm$ 0.00006	Chanwitheesuk et al. (2005)
	0.0520 $\pm$ 0.0003	Oboh (2005)
	0.0206 $\pm$ 0.0018 mg	Chanwitheesuk et al. (2005)
Vitamin E	13.34 $\pm$ 0.01 mg	Ifesan et al. (2006)
	0.742	Lopes et al. (2001)
Ca	2.670	Obiajunwa et al. (2002)
	0.0648	Alabi et al. (2005b)
	1.46 - 2.46	Edeoga et al. (2006)
K	1.204	Reddy and Reddy (1997)
	0.183	Lopes et al. (2001)
	2.330	Obiajunwa et al. (2002)
	0.08624	Alabi et al. (2005b)
	1.68 - 1.90	Edeoga et al. (2006)
Mg	0.0578	Lopes et al. (2001)
	0.0841	Alabi et al. (2005b)
	0.46 - 0.91	Edeoga et al. (2006)
N	1.43 - 2.84	Edeoga et al. (2006)
Na	0.060	Lopes et al. (2001)
	0.00825	Alabi et al. (2005b)

P	0.6 - 0.85	Edeoga et al. (2006)
	0.06125	Alabi et al. (2005b)
Cu	0.37 - 0.91	Edeoga et al. (2006)
	0.00304	Reddy and Reddy (1997)
Fe	0.01381	Obiajunwa et al. (2002)
	0.00569	Alabi et al. (2005b)
	0.00335	Lopes et al. (2001)
Mn	0.03054	Obiajunwa et al. (2002)
	0.01336	Alabi et al. (2005b)
	0.000685	Lopes et al. (2001)
	0.00662	Obiajunwa et al. (2002)
Ni	0.0046	Alabi et al. (2005b)
	0.01215	Obiajunwa et al. (2002)
Pb	0.00163	Reddy and Reddy (1997)
Se	0.0130	Obiajunwa et al. (2002)
Zn	0.00796	Reddy and Reddy (1997)
	0.000222	Lopes et al. (2001)
	0.00889	Obiajunwa et al. (2002)
	0.00685	Alabi et al. (2005b)

---

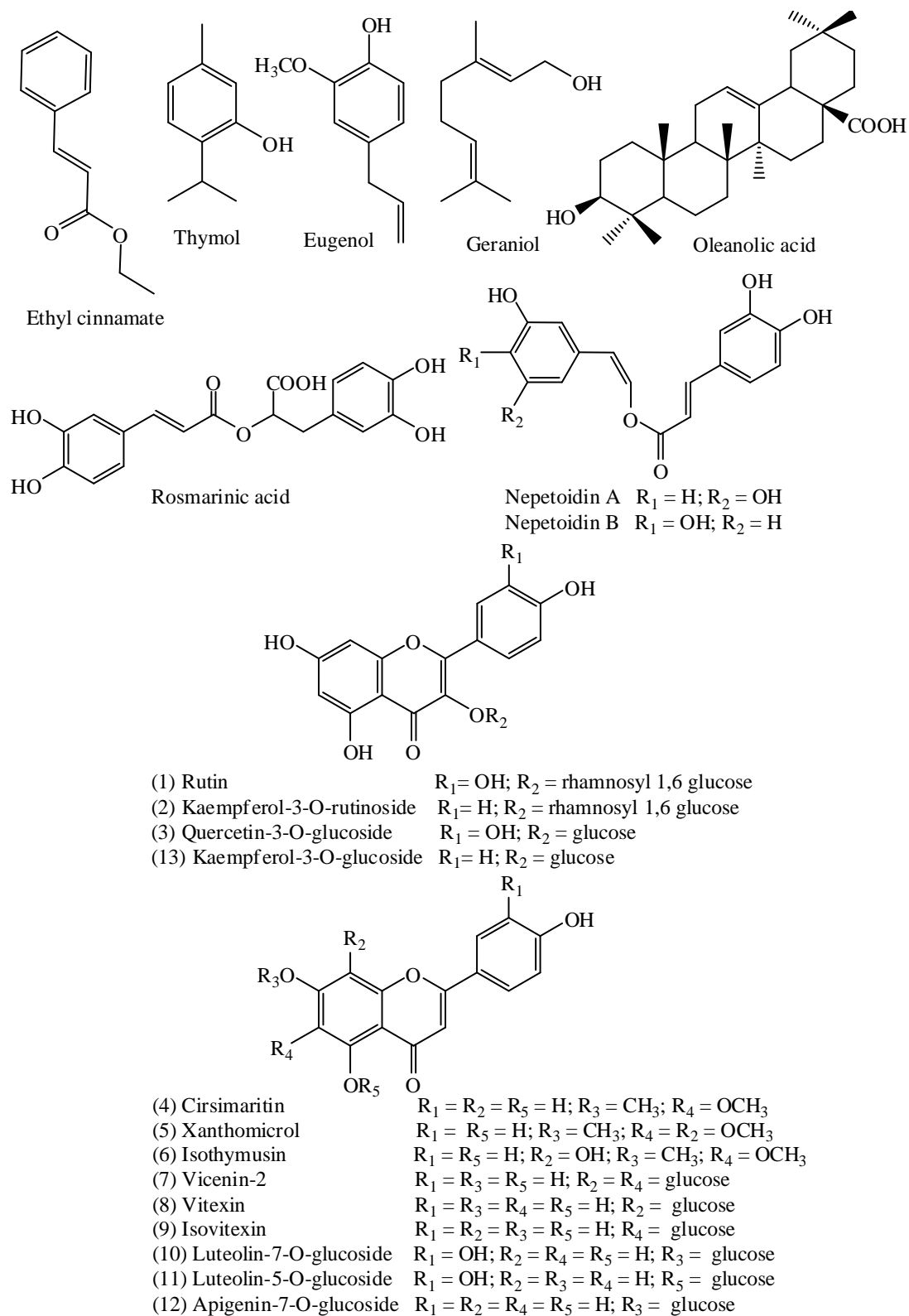


Fig. 1

Chemical constituents of *O. gratissimum*



Table 3

Antibacterial and antifungal activities of *Ocimum gratissimum* L.

Species	Plant preparation (major components or plant part used)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Other results	References
<b>Gram-positive Bacteria</b>				
<i>Bacillus cereus</i> (n. r.)	EO (47.7% thymol, 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	EO (46.7% thymol)	n. r.	GIZ	Janssen et al. (1989)
	EO (35.4% thymol, 10.7% eugenol)	n. r.	GIZ	Janssen et al. (1989)
CCT 2576	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	1100		Sartoratto et al. (2004)
(C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ ( $\mu\text{L/disc}$ )	(5 Cimanga et al. (2002)
(n. r.)	EO (47.7% thymol, 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (n. r.)	EO (47.7% thymol, 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 10541	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	300		Sartoratto et al. (2004)
CCT 5079	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	R		Sartoratto et al. (2004)
<i>Lactobacilli</i> (n. r.)	Aqueous extract (leaves)	25	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	Ethanollic extract (leaves)	30	GIZ	Ijeh et al. (2005)
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	EO	n. r.	GIZ	Nguefack et al. (2004a)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4140, 11137, 11140	EO	n. r.	GIZ	Nguefack et al. (2004a)
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2692	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	>2000		Sartoratto et al. (2004)
<i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	>2000		Sartoratto et al. (2004)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	EO (46.7% thymol)	1:3200	GIZ	Janssen et al. (1989)
	EO (57.8% eugenol, 17.19% $\alpha$ -bisabolene)	n. r.	GIZ ( $\mu\text{L/disc}$ )	(5 Franco et al. (2007)
ATCC 25923	EO (eugenol)	0.75	MBC = 1.5 ( $\mu\text{g/mL}$ ); GIZ (25-50 $\mu\text{g}$ )	Nakamura et al. (1999)
53154	EO (61.1 % thymol,	312.5	GIZ	Ndounga and

(C. i.)	17.2% <i>p</i> -cymene) EO (53.2% thymol, n. r. 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 $\mu$ L/disc)	Ouamba (1997) Cimanga et al. (2002)
	EO (43.68% thymol, n. r. 21.09% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Acosta et al. (2003)
(n. r.)	Ethanollic extract (leaves)	n. r.	GIZ (50- 1000 $\mu$ g/mL)	Oboh (2006a)
	EO (47.7% thymol, n. r. 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	1500	MBC = 2000 $\mu$ g/mL	Oussou et al. (2004)
	Aqueous extract (leaves)	12.5	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	Ethanollic extract (leaves)	30	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	EO	0.1%	GIZ	Adebolu and Oladimeji (2005)
	Aqueous extract (leaves)	R		Adebolu and Oladimeji (2005)
NICB 8588	Aqueous and ethanollic extracts	n. r.	GIZ (20 $\mu$ g/mL/disc)	Akinyemi et al. (2005)
NCTC 6571	EO	n. r.	GIZ	Orafidiya et al. (2006)
Tox A, Tox A and B, 01 and 04	EO	n. r.	GIZ	Nguefack et al. (2004a)
CCT 2740	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	1000		Sartoratto et al. (2004)
BS6a, BS11, BS12 and BS14	Methanollic extract	R		Chah et al. (2006)
MRSA (C. i.)	Aqueous and ethanollic extracts	25 22.3	and MBC = 37 and 35.2 $\mu$ g/mL; GIZ (20 $\mu$ g/mL/disc)	Akinyemi et al. (2005)
<i>Staphylococcus epidermides</i> ATCC 12228	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	R		Sartoratto et al. (2004)
<i>Streptococcus faecalis</i> 53142	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	625	GIZ	Ndonga and Ouamba (1997)
(n. r.)	EO (47.7% thymol, n. r. 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
	Aqueous extract (leaves)	12.5	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	Ethanollic extract (leaves)	15	GIZ	Ijeh et al. (2005)

### Gram-negative Bacteria

<i>Acinetobacter baumannii</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	6020	MBC = 12000 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Aeromonas sobria</i> (C. i.)	Aqueous extract (leaves)	16000	MBC = 31000 µg/mL; GIZ	Ilori et al. (1996)
<i>Citrobacter sp.</i> (C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Cimanga et al. (2002)
<i>Citrobacter diversus</i> (C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	R		Cimanga et al. (2002)
<i>Citrobacter freundii</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	300	MBC = 750 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Citrobacter kosei</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	12000	MBC = 24100 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	12000	MBC = 6020 µg/mL	Oussou et al. (2004)
(C. i.)	EO	n. r.	50% strains GI	Pereira et al. (2004)
<i>Enterobacter agglomerans</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	750	MBC = 1000 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Enterobacter cloacae</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	1200	MBC = 12000 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Escherichia coli</i> (C. i.)	Aqueous extract (leaves)	32000	MBC = 45000 µg/mL; GIZ	Ilori et al. (1996)
	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	R		Cimanga et al. (2002)
	EO	n. r.	69.6% strains GI	Pereira et al. (2004)
	Ethanollic extract (leaves)	R		Oboh (2006a)
(n. r.)	EO (47.7% thymol, 14.3% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Ngassoum et al. (2003)
	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	370	MBC = 370 µg/mL	Oussou et al. (2004)
	Aqueous extract (leaves)	12.5	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	Ethanollic extract (leaves)	30	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	EO	0.01%	GIZ	Adebolu and Oladimeji (2005)

	Aqueous extract (leaves)	R		Adebolu and Oladimeji (2005)
ATCC 8739	EO (46.7% thymol)	1:1600	GIZ	Janssen et al. (1989)
	EO (35.4% thymol, 10.7% eugenol)	n.r.	GIZ	Janssen et al. (1989)
ATCC 25922	EO (eugenol)	6	MBC = 12 µg/mL, GIZ (25-50 µg)	Nakamura et al. (1999)
	Aqueous extract (leaves)	206.3	MBC = 337.5 µg/mL; GIZ (3 µg/mL/disc)	Iwalokun et al. (2001)
CCT 0547	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	>2000		Sartoratto et al. (2004)
NCTC 10418	EO	n. r.	GIZ	Orafidiya et al. (2006)
O:158	EO (57.8% eugenol, 17.19% $\alpha$ -bisabolene)	n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Franco et al. (2007)
6223	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
BS3 and VT7b	Methanolic extract	R		Chah et al. (2006)
ETEC TR441 and 5041-1	EO	900 and 1000		Duarte et al. (2007)
ETEC 063 and 6/81H5J	EO	>1000		Duarte et al. (2007)
EPEC 0031-2 and 0119	EO	600 and 700		Duarte et al. (2007)
EPEC 0551 and E234869	EO	>1000		Duarte et al. (2007)
EIEC 240-1 and 0461-4	EO	700 and 1000		Duarte et al. (2007)
EIEC 1381-7	EO	>1000		Duarte et al. (2007)
STEC 0157 and 2781-8	EO	600 and 800		Duarte et al. (2007)
<i>Klebsiella sp.</i> (n. r.)	EO (eugenol)	6	MBC = 12 µg/mL, GIZ (25-50 µg)	Nakamura et al. (1999)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Cimanga et al. (2002)
	EO	R		Pereira et al. (2004)
<i>Klebsiella ozaenae</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	3010	MBC = 6010 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				

(C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 $\mu$ L/disc)	Cimanga et al. (2002)
	EO (43.68% thymol, 21.09% $\gamma$ -terpinene)	n. r.	GIZ	Acosta et al. (2003)
	EO	n. r.	100% strains GI	Pereira et al. (2004)
(n. r.)	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	750	MBC = 1000 $\mu$ g/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Morganella morganii</i>	EO	n. r.	50% strains GI	Pereira et al. (2004)
(C. i.)				
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Aqueous extract (leaves)	8000	MBC = 16000 $\mu$ g/mL; GIZ	Ilori et al. (1996)
(C. i.)				
<i>Proteus sp.</i>				
(C. i.)	Ethanollic extract (leaves)	n. r.	GIZ (50-1000 $\mu$ g/mL)	Oboh (2006a)
(n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	3010	MBC = 4010 $\mu$ g/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Proteus spp.</i> JH1a, JH5a and SH9a	Methanolic extract	R		Chah et al. (2006)
<i>Proteus mirabilis</i>				
(n. r.)	EO (eugenol)	12	MBC = 24 $\mu$ g/mL, GIZ (25-50 $\mu$ g)	Nakamura et al. (1999)
(C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	R		Cimanga et al. (2002)
	EO	n. r.	33.3% strains GI	Pereira et al. (2004)
<i>Proteus vulgaris</i>				
(C. i.)	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
(n. r.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 $\mu$ L/disc)	Cimanga et al. (2002)
NCIB 67	EO	n. r.	GIZ	Orafidiya et al. (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
ATCC 13388	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	R		Sartoratto et al. (2004)
ATCC 10145	EO	n. r.	GIZ	Orafidiya et al. (2006)
(C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 $\mu$ L/disc)	Cimanga et al. (2002)
	EO	R		Pereira et al. (2004)

(n. r.)	Ethanolic extract (leaves)	n. r.	GIZ (50-1000 µg/mL)	Oboh (2006a)
	EO (eugenol)	>24		Nakamura et al. (1999)
	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	R		Oussou et al. (2004)
623	Aqueous extract (leaves)	6.25	GIZ	Ijeh et al. (2005)
	Ethanolic extract (leaves)	30	GIZ	Ijeh et al. (2005)
SH2b	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	625	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
	Methanolic extract	R		Chah et al. (2006)
<i>Salmonella sp.</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene, 4.13% thymol)	1500	MBC = 1000 µg/mL	Oussou et al. (2004)
<i>Salmonella sp.</i> 8039	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	EO (57.8% eugenol, 17.19% $\alpha$ -bisabolene)	n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Franco et al. (2007)
CCT 4296	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)	600		Sartoratto et al. (2004)
<i>Salmonella enteritidis</i> (n. r.)	EO (eugenol)	3	MBC = 6 µg/mL, GIZ(25-50 µg)	Nakamura et al. (1999)
<i>Salmonella typhi</i> (C. i.)	Aqueous extract (leaves)	50000	MBC = 62000 µg/mL; GIZ	Ilori et al. (1996)
(n. r.)	EO	0.001%	GIZ	Adebolu and Oladimeji (2005)
	Aqueous extract (leaves)	R		Adebolu and Oladimeji (2005)
<i>Salmonella typhimurium</i> (C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% $\gamma$ -terpinene, 12.7% eugenol)	n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Cimanga et al. (2002)
(n. r.)	EO	0.01%	GIZ	Adebolu and Oladimeji (2005)
	Aqueous extract (leaves)	R		Adebolu and Oladimeji (2005)
<i>Serratia marcescens</i> 5386	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
<i>Serratia marcescens</i> (n. r.)	EO (46.4% <i>p</i> -cymene,	1920	MBC = 2410	Oussou et al.

<i>Shigella</i> spp. BS16	4.13% thymol) Methanolic extract	R		µg/mL	(2004) Chah et al. (2006)
<i>Shigella boydii</i> (C. i.)	Aqueous (leaves)	extract	253	MBC = 403.1 µg/mL; GIZ (3 µg/mL/disc)	Iwalokun et al. (2001)
<i>Shigella dysenteriae</i> (C. i.)	Aqueous (leaves)	extract	4000	MBC = 8000 µg/mL; GIZ	Ilori et al. (1996)
	Aqueous (leaves)	extract	337.5	MBC = 562.5 µg/mL; GIZ (3 µg/mL/disc)	Iwalokun et al. (2001)
<i>Shigella flexneri</i> (n. r.)	Ethanollic (leaves)	extract	n. r.	GIZ (50- 1000 µg/mL)	Oboh (2006a)
	EO (eugenol)		3	MBC = 6 µg/mL, GIZ(25-50 µg)	Nakamura et al. (1999)
(C. i.)	EO (53.2% thymol, 25.7% γ-terpinene, 12.7% eugenol)		n. r.	GIZ (5 µL/disc)	Cimanga et al. (2002)
	Aqueous (leaves)	extract	393.8	MBC = 703.1 µg/mL; GIZ (3 µg/mL/disc)	Iwalokun et al. (2001)
<i>Shigella sonnei</i> (C. i.)	Aqueous (leaves)	extract	403.1	MBC = 403.1 µg/mL; GIZ (3 µg/mL/disc)	Iwalokun et al. (2001)
<b>Yeast and Fungus</b>					
<i>Alternaria</i> sp. (Isolate)	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (10 and 4120 µg/disc)	Faria et al. (2006)
	Ethanollic (steam-distillation residue of aerial parts)	extract	R		Faria et al. (2006)
<i>Alternaria</i> (Isolate)	<i>alternate</i> EO (81.24% eugenol, 5.2% <i>p</i> -cymene)		250	MFC = 2000 µg/mL	Tripathi et al. (1985)
<i>Alternaria</i> (Isolate)	<i>padwickii</i> EO (46.2% thymol, 20% γ-terpinene)		800	MFC = 800 µg/mL; GIZ	Nguefack et al. (2007)
<i>Aspergillus flavus</i> (n. r.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)

	Ethanollic (leaves)	extract	R			Oboh (2006a)
IBT 3660, IBT 15606, IBT 15714, IBT 18438 and IBT 19412	EO		n.r.	GI (800 µg/mL)		Nguefack et al. (2004b)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl	>1000 µg/g			Dubey et al. (2000)
	Ethanollic (leaves)	extract	R			Oboh (2006a)
IBT 16901, IBT 17328, IBT 20466, IBT 20886 and IBT 21712	EO		n. r.	GI (600 µg/mL)		Nguefack et al. (2004b)
864641	EO (61.1% thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)		625	GIZ		Ndonga and Ouamba (1997)
<i>Aspergillus niger</i> (n. r.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)		Tiwari et al. (2003)
	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (80 µg/disc)		Faria et al. (2006)
	Ethanollic (steam-distillation residue of aerial parts)	extract	R			Faria et al. (2006)
<i>Bipolaris oryzae</i> (Isolate)	EO (46.2% thymol, 20% $\gamma$ -terpinene)		600	MFC = 600 µg/mL; GIZ		Nguefack et al. (2007)
<i>Botryosphaeria rhodina</i> (n. r.)	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (4120 µg/disc)		Faria et al. (2006)
	Ethanollic (steam-distillation residue of aerial parts)	extract	R			Faria et al. (2006)
<i>Botrytis cinerea</i> (Isolate)	EO		n. r.	GI (500 µg/mL)		Tripathi et al. (2008)
<i>Candida albicans</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl	350 µg/g			Dubey et al. (2000)
	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)		Tiwari et al. (2003)
	Ethanollic (leaves)	extract	n. r.	GIZ (50-1000 µg/mL)		Oboh (2006a)
(C. i.)	EO (67% eugenol)		750			Nakamura et al. (2004)
ATCC 10231	EO (67% eugenol)		1500			Nakamura et al. (2004)
	EO (93.8% eugenol, 4.23% germacrene D)		>2000			Sartoratto et al. (2004)
	EO		>2000			Duarte et al. (2005)



	Ethanollic (leaves)	extract	>2000		Duarte et al. (2005)
ATCC 18804	Methanolic (leaves)	extract	1250	GIZ	Braga et al. (2007)
	Methanolic (flowers)	extract	5000	GIZ	Braga et al. (2007)
4872 ATCC/023/CIP	EO (61.1% thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)		312.5	GIZ	Ndounga and Ouamba (1997)
<i>Candida krusei</i> (C. i.)	EO (67% eugenol)		750		Nakamura et al. (2004)
<i>Candida parapsilosis</i> (C. i.)	EO (67% eugenol)		380		Nakamura et al. (2004)
<i>Candida tropicalis</i> (C. i.)	EO (67% eugenol)		1500		Nakamura et al. (2004)
<i>Cladosporium herbarum</i> (n. r.)	EO (eugenol)				Faria et al. (2006)
<i>Colletotrichum capsici</i> (Isolate)	EO (81.24% eugenol, 5.2% <i>p</i> -cymene)		500	MFC = 1000 µg/mL	Tripathi et al. (1985)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (n. r.)	EO (34% ethyl cinnamate, 30% linalol)		300 µg/g		Dubey et al. (2000)
(C. i.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)
	EO (57.82% eugenol, 17.19% ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bisabolene) and hexane fraction		250		Lemos et al. (2005)
	Ethanollic (leaves)	extract	1000		Lemos et al. (2005)
	Chloroform fraction		62.5		Lemos et al. (2005)
	Ethyl acetate fraction		>1000		Lemos et al. (2005)
ATCC 32608	Methanolic (leaves)	extract	78	GIZ	Braga et al. (2007)
	Methanolic (flowers)	extract	625	GIZ	Braga et al. (2007)
<i>Epidermophyton floccosum</i> 27T	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (20 µL/disc)	Lima et al. (1992)
(n. r.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)
<i>Fusarium moniliforme</i> IBT 9490, IBT 9494, IBT 9495, IBT 9498 and IBT 9504	EO		n. r.	GI (500 µg/mL)	Nguefack et al. (2004b)
<i>Fusarium solani</i> (n. r.)	Ethanollic (leaves)	extract	R		Oboh (2006a)
<i>Fusarium verticillioides</i> (Isolate)	EO (22% <i>p</i> -cymene, 17% thymol)		n. r.	GI (2-13.3 µL/mL)	Fandohan et al. (2004)

<i>Malassezia pachydermatis</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	>1000 µg/g		Dubey et al. (2000)		
	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)		
<i>Microsporum canis</i> 73T, 85T	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (20 µL/disc)	Lima et al. (1992)		
72T	EO (eugenol)		R		Lima et al. (1992)		
(n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	200 µg/g		Dubey et al. (2000)		
(C. i.)	EO (32.6% thymol, 9.3 p-cymene)		620		Díaz et al. (2003)		
	Ethanollic extract		n. r.	100% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	Ethyl acetate fraction		n. r.	20% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	Hexane fraction		n. r.	100% strains GI (125 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	Chloroform fraction		n. r.	100% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	EO		n. r.	100% strains GI (500 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
<i>Microsporum gypseum</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	150 µg/g		Dubey et al. (2000)		
	EO		50	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)		
(C. i.)	Ethanollic extract		n. r.	80% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	Ethyl acetate fraction		R		Silva et al. (2005)		
	Hexane fraction		n. r.	100% strains GI (125 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	Chloroform fraction		n. r.	100% strains GI (500 µg/mL)	Silva et al. (2005)		
	EO		n. r.	100% strains GI (250 µg/mL)	Silva et al. (2005)		

<i>Microsporium audounii</i> (n. r.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)
<i>Microsporium nannum</i> (n. r.)	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n. r.)	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (4120 µg/disc)	Faria et al. (2006)
	Ethanollic extract (steam-distillation residue of aerial parts)		R		Faria et al. (2006)
<i>Rhizoctonia</i> sp. (n. r.)	EO (eugenol)		n. r.	GIZ (80 µg/disc)	Faria et al. (2006)
	Ethanollic extract (steam-distillation residue of aerial parts)		R		Faria et al. (2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n. r.)	Ethanollic extract (leaves)		n. r.	GIZ (200-1000 µg/mL)	Oboh (2006a)
<i>Sclerotium rolfsii</i> (Isolate)	EO (81.24% eugenol, 5.2% <i>p</i> -cymene)		50	MFC = 250 µg/mL	Tripathi et al. (1985)
	Ash		n. r.	GI (10%)	Enikuomehin et al. (1998)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	400 µg/g		Dubey et al. (2000)
	EO		n. r.	GI (50 µg/mL)	Tiwari et al. (2003)
<i>Trichophyton interdigitale</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	250 µg/g		Dubey et al. (2000)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (n. r.)	EO (34% cinnamate, linalol)	ethyl 30%	200 µg/g		Dubey et al. (2000)
(C. i.)	EO (32.6% thymol, 9.3% <i>p</i> -cymene)		620		Díaz et al. (2003)
	Ethanollic extract		n. r.	90% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)
	Ethyl acetate fraction		n. r.	20% strains GI (1000 µg/mL)	Silva et al. (2005)
	Hexane fraction		n. r.	100% strains GI (125 µg/mL)	Silva et al. (2005)
	Chloroform fraction		n. r.	100% strains GI (500 µg/mL)	Silva et al. (2005)
	EO		n. r.	100% strains GI (250 µg/mL)	Silva et al. (2005)
(Robin) Blanchard var.	EO (46.7% thymol)		1:6400	GIZ	Janssen et al.

<i>interdigitale</i> CBS 558-66						(1989)
6T, 12T, 16T and 29T	EO (eugenol)	n. r.	GIZ	(20	Lima et al.	
146563	EO (61.1 % thymol, 17.2% <i>p</i> -cymene)	625	GIZ		Ndounga and Ouamba	(1992) (1997)
<i>Trichophyton rubrum</i>						
45T, 54T, 75T, 78T, 84T, 101T and 118T	EO (eugenol)	n. r.	GIZ	(20	Lima et al.	
69T	EO (eugenol)	R			Lima et al.	(1992)
(n. r.)	EO (34% ethyl cinnamate, linalol)	150 µg/g			Dubey et al.	(2000)
	EO	n. r.	GI	(50	Tiwari et al.	
(C. i.)	EO (32.6% thymol, 9.3 <i>p</i> -cymene)	620			Díaz et al.	(2003)
	Ethanollic extract	n. r.	100% strains		Silva et al.	(2005)
	Ethyl acetate fraction	R			Silva et al.	(2005)
	Hexane fraction	n. r.	100% strains		Silva et al.	(2005)
	Chloroform fraction	n. r.	100% strains		Silva et al.	(2005)
	EO	n. r.	100% strains		Silva et al.	(2005)
<i>Trichophyton violaceum</i> (n. r.)	EO	n. r.	GI	(50	Tiwari et al.	(2003)

C. i.: clinical isolate; EIEC: enteroinvasive *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*; ETEC: enterotoxigenic *E. coli*; STEC: shiga-toxin producing *E. coli*; GI: growth inhibition; GIZ: growth inhibition zone; MBC: minimum bactericidal concentration; MIC: minimum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicidal concentration; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; n. r.: not recorded; R: resistant; STEC: shiga-toxin producer *Escherichia coli*.

Table 4

Antiparasitic activity of *Ocimum gratissimum* L.

Species (form or analyte tested)	Plant preparation (composition)	IC <sub>50</sub>	Other observations	References
<i>Ascaridia galli</i>	Methanol residue	n. r.	Effect (1500 mg/Kg) was comparable to levamisole (20 mg/Kg) on infected chickens.	Njoku and Asuzu (1998)
<i>Ascaris suum</i> (GST)	Hydroalcoholic (methanol-water 1:1) extract	10 mg/mL		Fakae et al. (2000)
<i>Entamoeba histolytica</i> (Trophozoite form)	Methanol- methylene chloride(1:1) extract	n. r.	At 100 µg/mL: 40.32% and 62.10% of mortality with 2 and 4 days of incubation <i>in vitro</i> .	Moundipa et al. (2005)
<i>Haemonchus contortus</i> (Eggs)	EO (43.7% eugenol)	n. r.	At 0.5% completely inhibited the hatching of eggs <i>in vitro</i> . Eugenol and thiabendazole showed to be equally effective in this concentration.	Pessoa et al. (2002)
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i> ATCC 30252	EO	100 and 91 µg/mL (defined and complex media)	At 250 µg/mL GI= 99.3% <i>in vitro</i> .	Holetz et al. (2002, 2003)
<i>Leishmania amazonensis</i>				
(Promastigote form)	Hydroalcoholic (ethanol-water 90:10) extract	n. r.	At 100 µg/mL GI= 54.7 ± 0.6% without haemolytic effects until 120 min.	Luize et al. (2005)

	EO	135 µg/mL	Without toxicity towards mammalian cells.	Ueda-Nakamura et al. (2006)
	Methanolic extracts (flowers and leaves)	R	Until 250 µg/mL without toxicity towards mammalian cells.	Braga et al. (2007)
(Amastigote form)	Hydroalcoholic (ethanol-water 90:10) extract	n. r.	At 100 µg/mL GI= 91.5 ± 2.0 % without haemolytic effects until 120 min.	Luize et al. (2005)
	EO	100 µg/mL	Without toxicity towards mammalian cells.	Ueda-Nakamura et al. (2006)
<i>Leishmania chagasi</i> (Promastigote form)	Methanolic extract (Flowers)	71 µg/mL	Without toxicity towards mammalian cells.	Braga et al. (2007)
	Methanolic extract (Leaves)	R	Until 250 µg/mL without toxicity towards mammalian cells.	Braga et al. (2007)
<i>Onchocerca volvulus</i> (GST)	Hydroalcoholic (methanol-water 1:1) extract	8 mg/mL		Fakae et al. (2000)
<i>Plasmodium berghei</i>	EO (21.9% $\gamma$ -terpinene, 21.1% $\beta$ -phellandrene)	n. r.	At 500 mg/Kg 77.8% supression of parasitaemia in mice.	Tchoumboungang et al. (2005)
<i>Plasmodium falciparum</i>				
(Chloroquine sensitive Ghanaian strain)	Methanolic extract	6.0 ± 2.5 µg/mL	Cytotoxic towards MRC-5 cell lines (IC <sub>50</sub> = 12.0 ± 3.1 µg/mL).	Mesia et al. (2008)
(Chloroquine resistant strain W2)	Cloromethylenic, methanolic and hydroalcoholic (methanol-water 1:1) extract	R	Until 50 µg/mL	Kaou et al. (2008)
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Methanolic extract	32.0 ± 3.4	Cytotoxic towards MRC-5	Mesia et al. (2008)

<i>Trypanosoma cruzi</i>	Hydroalcoholic (ethanol-water 90:10) extract	n. r.	μg/mL	cell lines (IC <sub>50</sub> = 12.0 ± 3.1 μg/mL). At 100 μg/mL GI= 28.3 ± 4.2% without haemolytic effects until 120 min.	Luize et al. (2005)
	Methanolic extract	26.0 ± 2.7	μg/mL	Cytotoxic towards MRC-5 cell lines (IC <sub>50</sub> = 12.0 ± 3.1 μg/mL).	Mesia et al. (2008)

---

GI: growth inhibition; n. r.: not recorded; R: resistant

Table 5

Toxicological evaluation of *Ocimum gratissimum* L.

Animal model	Plant preparation / plant part used	CL <sub>50</sub> /DL <sub>50</sub> (95% confidence limits)	Test time / route of administration)	Effects observed	References
<i>Artemia salina</i>	Aqueous-metanol (1:1) extract / leaves	< 1000 ppm	12 h		Fakae et al. (2000)
	Ethanollic extract / leaves	1807.6 µg/mL	24 h		Njoku et al. (1997)
	Fluid extract (62% alcoholic content) / foliage	18.76 (3.14-73.93) µg/mL	24 h		Parra et al. (1999)
Cockerel	Methanol residue / leaves	n. r.	24 h / oral	At 1500 mg/Kg: decreased locomotor activity for 10 min.	Njoku and Asuzu (1998)
Sprague-Dawley rat	Essential oil (4% v/v in 1% Polysorbate 80) / leaves	0.43 g/Kg	24-72 h / i.p.	Dose-dependent sedative effect, which wore out after 6 days of repeated administration in sub-chronic studies.	Orafidiya et al., 2004a.
	Essential oil (4% v/v in 1% Polysorbate 80) / leaves	2.29 g/Kg	24-72 h / oral		
Swiss albino mice	Essential oil (4% v/v in 1% Polysorbate 80) / leaves	0.27 g/Kg	24-72 h / i.p.	Dose-dependent sedative effect, which wore out after 6 days of repeated administration in sub-chronic studies.	Orafidiya et al., 2004a.
	Essential oil (4% v/v in 1% Polysorbate 80) / leaves	1.41 g/Kg	24-72 h / oral		
	Ethanollic extract / leaves	4200 (3557-4842) mg/Kg	n.r. / oral		



	Fluid extract (62% alcoholic content) / foliage	2081.41 (1873.82-2271.87) mg/Kg	24 h / oral	Sedation, accelerated breathing, locomotor incoordination and death.	Parra et al. (1999, 2001)
	Fluid extract (30%) / leaves	3.2 g/Kg	24 h / oral	Decreased locomotor activity, accelerated breathing and death.	Hernández et al. (2006)
	Methanolic extract / leaves	n. r.	24 h / oral	At 3000 mg/Kg: no death or sign of acute intoxication	Akah et al. (2007)
Wistar albino rat	Aqueous extract / leaves	1264.9 mg/Kg	24 h / i.p.	After 2-4h: decreased locomotor activity and sensitivity to touch. After 12h: decreased feed intake and prostration	Mohammed et al. (2007)
	Essential oil (diluted in corn oil) / leaves	1750 mg/Kg	24 h / oral	At 1000 and 1500 mg/Kg: 30 min and 1 day torpid behaviour.	Fandohan et al. (2008)

i.p.: intraperitoneal; n. r.: not recorded

# ANEXO

## ESPECTROS DE RMN DO EUGENOL

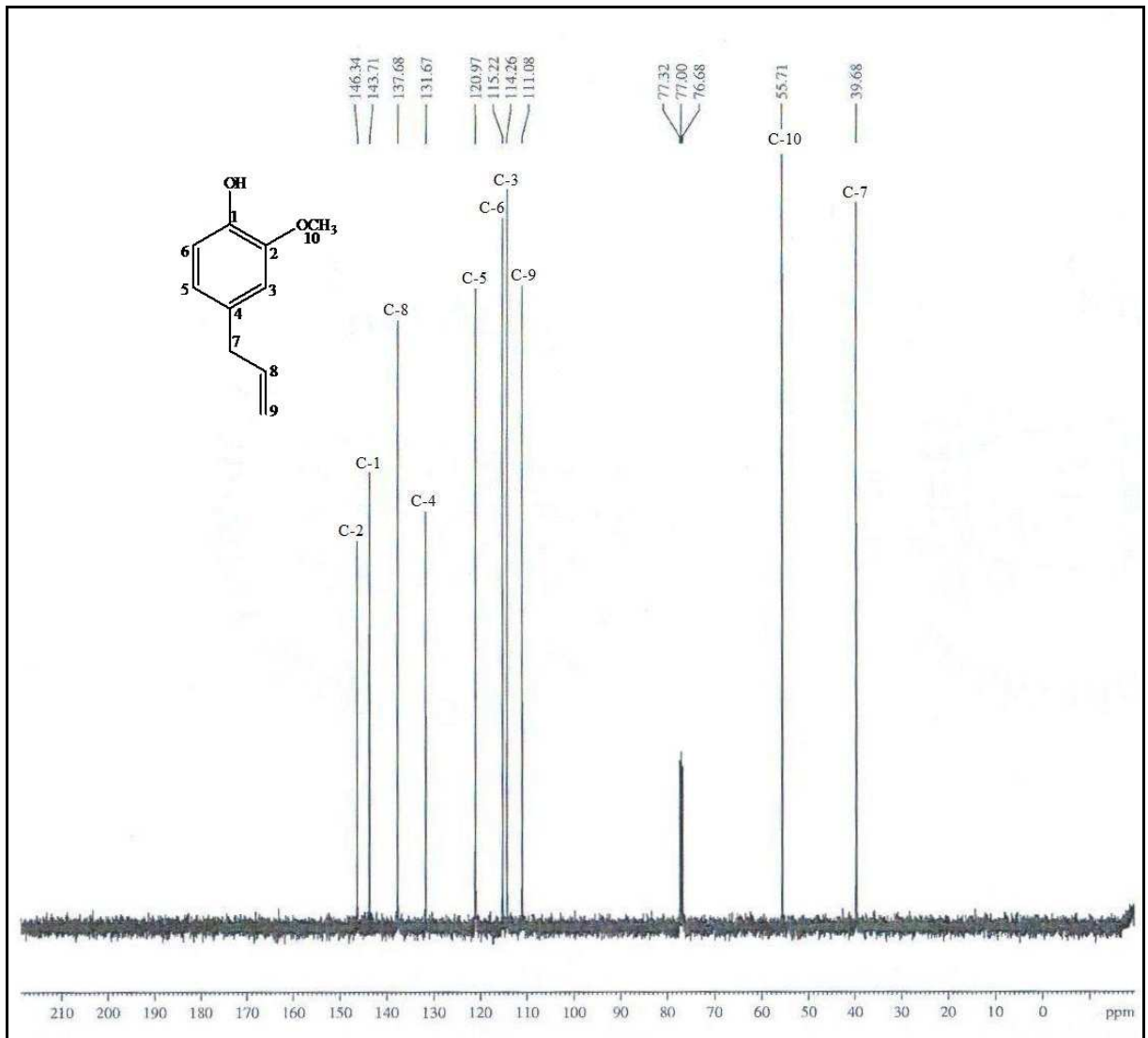


Figura 12 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do eugenol (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

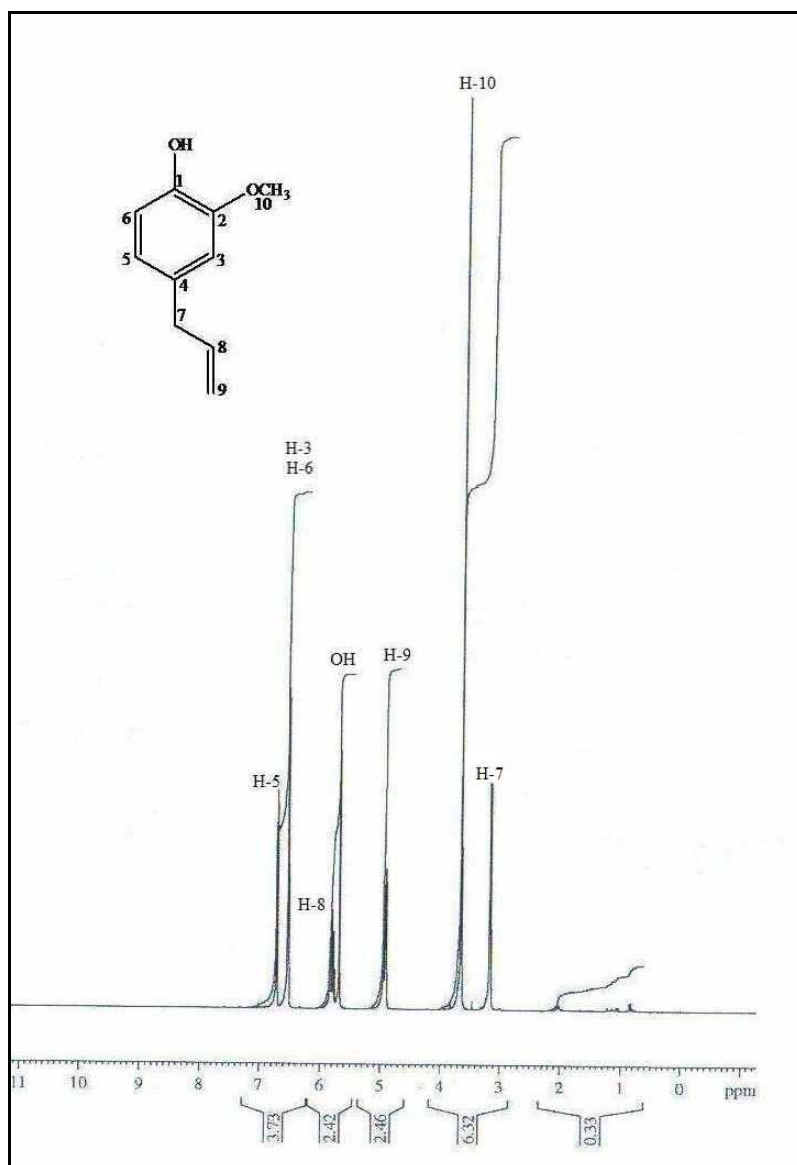


Figura 13 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do eugenol (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

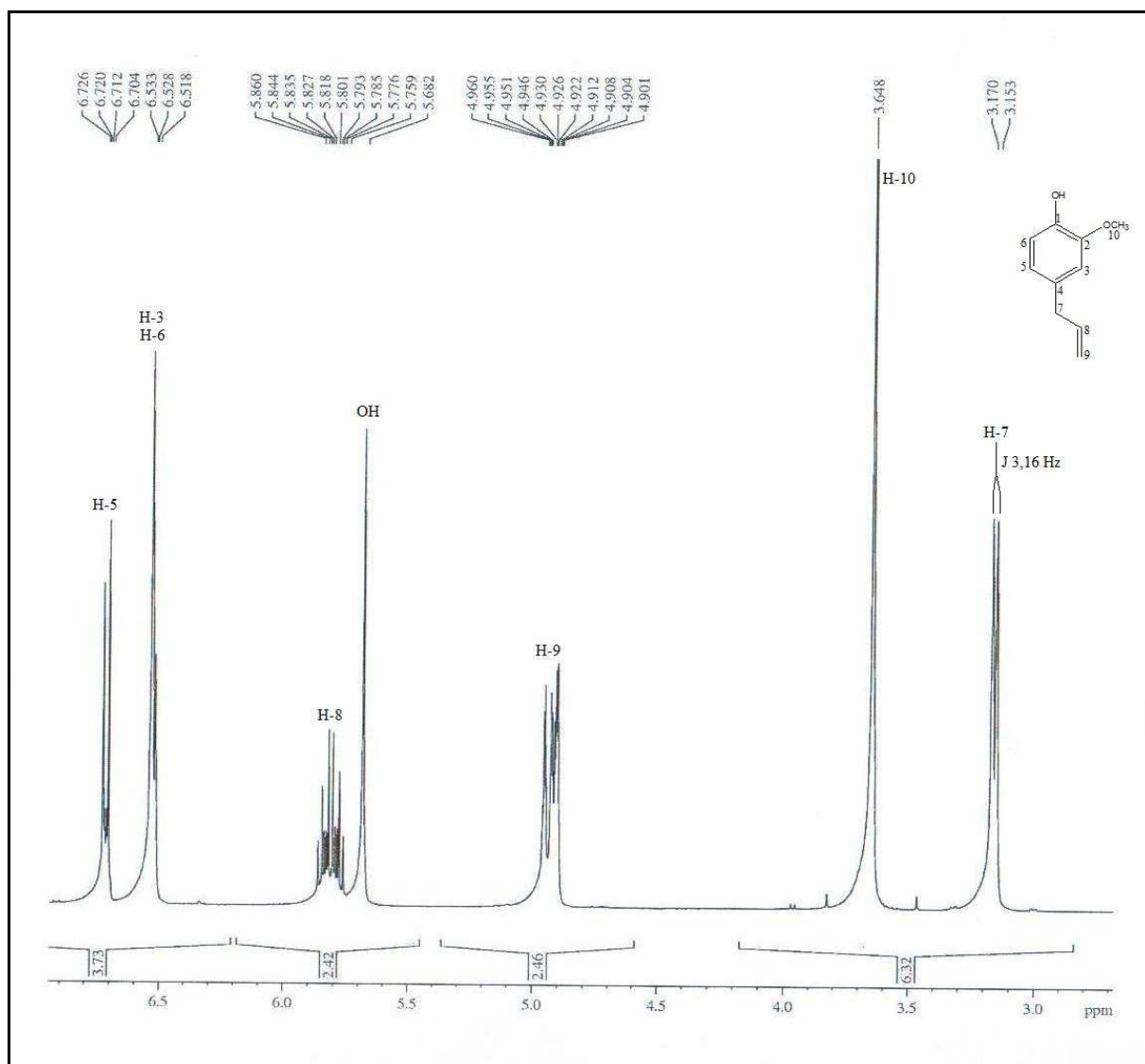


Figura 14 - Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do eugenol na região de  $\delta$  2,7 a 6,9 ppm (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

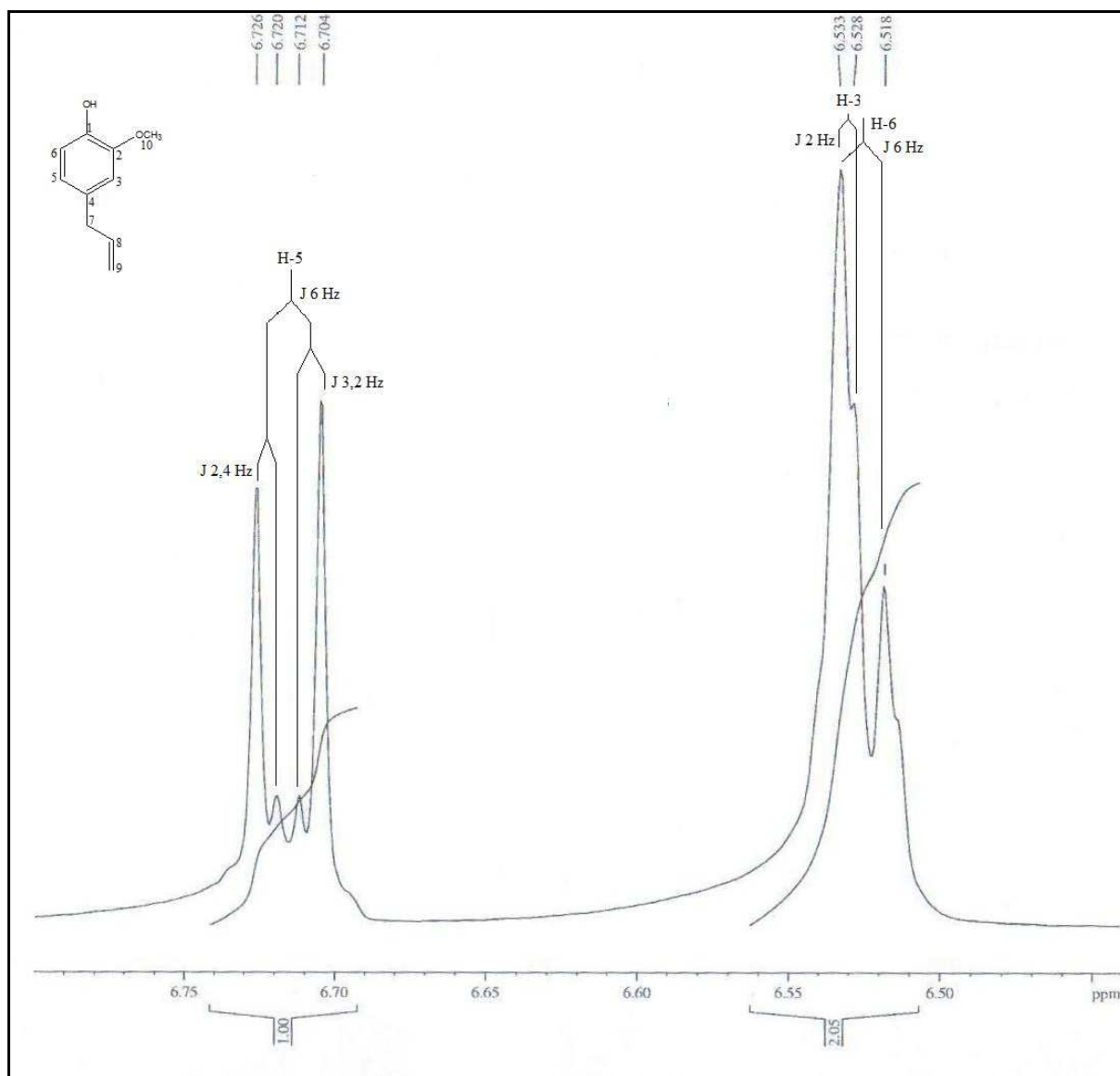


Figura 15 - Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do eugenol na região de  $\delta$  6,45 a 6,79 ppm (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).