

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

MARÍLIA RODRIGUES SERRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS
AROMÁTICAS DO CERRADO MARANHENSE**

São Luís - MA

2021

MARÍLIA RODRIGUES SERRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS
AROMÁTICAS DO CERRADO MARANHENSE**

TCC apresentado à Coordenação do curso de
Química Bacharelado da Universidade Federal
do Maranhão como requisito final para
obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro.

São Luís – MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Rodrigues Serra, Marília. Ação antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas do cerrado maranhense / Marília Rodrigues Serra. - 2021.

51 f.

Orientador(a): Odair dos Santos Monteiro.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Cândida albicans. 2. Cerrado maranhense. 3. Controle microbiano. 4. Óleos essenciais. I. dos Santos Monteiro, Odair. II. Título.

MARÍLIA RODRIGUES SERRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS
AROMÁTICAS DO CERRADO MARANHENSE**

TCC apresentado à Coordenação do curso de
Química Bacharelado da Universidade Federal
do Maranhão como requisito final para
obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro.

“Não sei o que posso parecer aos olhos do mundo, mas aos meus, pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece por descobrir à minha frente. ”

-Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ensinar a amar, valorizar a vida e a manter a minha esperança em dias melhores.

Aos meus pais que sempre fizeram tudo e um pouco mais para que eu sempre tivesse acesso à educação.

A professora Ana Paula, minha primeira inspiração na área de química, por todo seu amor e dedicação ao ensino e por transformar a minha vida.

Aos amigos queridos que fiz na UFMA e sempre estiveram ao meu lado tornando essa caminhada mais fácil, em especial “Doug”, “Carolzinha”, Daniel, Ianca, Agnaldo e todos os outros que amo e guardo no coração.

A Amanda, minha companheira, pela paciência, pelo amor e pela parceria que tem comigo, por me ajudar nos dias difíceis e por toda compreensão durante esses anos.

Aos meus colegas de trabalho da Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Naturais, Ilmo Ribeiro, Mariana Arruda, Paulo Rocha, Raiane de Jesus, por acreditarem no meu trabalho, pelas orientações e por sempre me instigar a fazer o melhor.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa para desenvolver esta pesquisa. Ao meu orientador, Prof^o.Dr. Odair dos Santos Monteiro pelos ensinamentos, dedicação e paciência; sem a sua orientação esse trabalho não seria possível.

A todos os professores do Departamento de Química e Tecnologia Química em especial aos professores: Roberto Sigfrido, por me introduzir ao LQPN, a Prof^a Jaciene por me estender a mão em dias difíceis e ao Prof. Iranaldo por todas as palavras de incentivo. A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conquista desse título, meus mais profundos agradecimentos.

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um fato recorrente nas últimas décadas como consequência do uso indiscriminado de antibióticos, pois submetem os microorganismos a mutações constantes as quais aumentam as suas chances de sobrevivência, evitando assim a ação de medicamentos sobre sua parede celular. Diante desta realidade, faz-se necessário a busca por novas alternativas, principalmente no âmbito fitoterápico. Os óleos essenciais que são extraídos de plantas medicinais do conhecimento popular demonstram potencial terapêutico no combate a esses patógenos. Os óleos essenciais são compostos principalmente de terpenos e de fenilpropanóides, que atribuem a eles uma atividade antimicrobiana variável e constituem uma alternativa no controle de microorganismos indesejáveis, como, por exemplo, o gênero *Candida*, responsável por infecções oportunistas quando há alguma imunossupressão no organismo humano. Para testar a eficiência dos óleos essenciais, foram selecionadas bactérias gram positivas tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* e *Streptococcus pyogenes* e o fungo de maior interesse deste estudo, a *Candida albicans*. Plantas do cerrado maranhense das espécies *Lippia gracilis*, *Dizygostemon riparius* e *Ocimum gratissimum* foram selecionadas para este estudo. A extração dos óleos essenciais foi feita das folhas secas de cada espécie, por meio do processo de Hidrodestilação, no Laboratório de Produtos Naturais da UFMA e a caracterização dos componentes do óleo por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi feita pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços, as diluições dos óleos variaram de 0,146µL/mL a 1,171µl/mL. A Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/ CFM) foram determinadas pelo método de Simonetti (2015), com adaptações, a partir dos poços nos quais não houve crescimento microbiano visível no teste da CIM. Os resultados mostram que dentre os óleos testados, apenas um foi particularmente eficiente em atividade contra *Candida albicans*.

Palavras-chave: Óleos essenciais, Cerrado maranhense, *Candida albicans*, Controle microbiológico.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a recurrent fact in recent decades as a result of the indiscriminate use of antibiotics, subjecting microorganisms to constant mutations which increase their chances of survival, thus preventing the action of drugs on their cell wall. In view of this reality, it is necessary to search for new alternatives, especially in the phytotherapeutic scope. Some essential oils that are extracted from medicinal plants of popular knowledge demonstrate therapeutic potential in combating these pathogens. Essential oils are mainly composed of terpenes and phenylpropanoids, which attribute to them a variable antimicrobial activity and constitute an alternative in the control of undesirable microorganisms, such as the *Candida* genus, responsible for opportunistic infections when there is some immunosuppression in the human body. To test the efficiency of essential oils, gram positive bacterias such as *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* and *Streptococcus pyogenes* was chosen along side the main fungus for this study *Candida Albicans*. Species of plants from the cerrado of Maranhão as *Lippia gracilis*, *Dizygostemon riparius*, *Ocimum gratissimum* were selected for this study. The extraction of essential oils was made from the dry leaves of each species, through hydrodistillation process in Laboratório de Produtos Naturais at UFMA and the characterization of the oil components was made by gas chromatography coupled with mass spectrometer. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was made using the microdilution technique in a 96-well plate, the oil dilutions ranged from 0.146 μ L/mL to 1.171 μ l/mL. The bactericidal and fungicidal concentration (CBM/CFM) were determined by the method of Simonetti (2015), with adaptations, from the wells in which there was no visible microbial growth in the CIM test. The results show that among the tested oils, only one was particularly efficient in activity against *Candida albicans*.

Keywords: Essential oils; Cerrado Maranhense; *Candida Albicans*, bacterial control.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismos desenvolvidos pelas plantas como resposta ao ambiente.....	16
Figura 2. Rota de biossíntese de metabólitos secundários nas plantas.....	17
Figura 3. Derivados de Terpenos e Fenilpropanóides.....	18
Figura 4. Mapeamento da região de coleta (<i>Ocimum gratissimum</i>).....	20
Figura 5a. 5b. 5c. Espécies vegetais utilizados nesse estudo - <i>Ocimum cratissimum</i> <i>Dizygostemon riparius</i> ; <i>Lippia gracilis</i>	22
Figura 6. Sistema de Hidrodestilação com Banho Ultratermostático	23
Figura 7. Fluxograma Teste de Sensibilidade microbiana.....	25
Figura 8. Cromatograma do OE das folhas de <i>Lippia gracilis</i>	28
Figura .9. Espectro de massas α -pineno.....	30
Figura 10. Estrutura α -Pineno, β -Pineno, 1,8-cineol,	30
Figura 11. Cromatograma do OE das folhas de <i>Ocimum gratissimum</i>	31
Figura 12. Espectro de massas do carvacrol.....	32
Figura 13. Estrutura Carvacrol, o- cimeno, γ -Terpineno.....	33
Figura 14. Cromatograma do óleo essencial de <i>Dizygostemon riparius</i>	34
Figura15. Espectro de massas do Acetato de fenchil.....	36

Figura 16. Estrutura Acetato de Fencil e Fenchol.....36

Figura 17. Formação de halos de inibição dos Óleos Essenciais 1, 2, 3 assim como no grupo Controle: C+ (controle positivo) e C- (controle negativo)38

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Coordenadas geográficas da coleta de <i>Ocimum gratissimum</i>	20
Tabela 2. Rendimento dos OEs das folhas das espécies coletadas.....	27
Tabela 3: Composição química do OE das folhas de <i>Lippia gracilis</i>	28
Tabela 4. Resultados obtidos pela análise de CG/EM para o Óleo de <i>ocimum gratissimum</i>	31
Tabela 5. Resultados obtidos pela análise de CG/EM para o Óleo de <i>Dizygostemon riparius</i> ...	35
Tabela 6. Zona de inibição microbiana formada após a exposição aos óleos essenciais <i>Lippia gracilis</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Dizygostemon riparius</i>	37
Tabela 7. Determinação CIM e CBM/CFM dos óleos essenciais.....	38

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.OBJETIVOS.....	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	21
4.3.1 Microorganismos utilizados	24
4.3.2 Padronização da suspensão microbiana.....	25
4.3.3 Difusão em ágar.....	25
4.3.4 Microdiluição em caldo - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	26
4.3.4 Determinação da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM).....	27
4.4 Análise da composição dos óleos essenciais	27
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	42
7.REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são fontes de diversos compostos com potencial ação biológica graças a presença de sua atividade metabólica secundária, nas quais são produzidas moléculas que desempenham um importante papel no ciclo das plantas quanto a sua interação com o ambiente, seja pela necessidade de proteção ao ataque de patógenos, competição interespecies ou outros fatores. Durante os séculos de história humana, a utilização de plantas constituiu-se como única alternativa fitoterápica de saúde assistencialista.

O advento da revolução na medicina, como a descoberta da penicilina e o desenvolvimento de antibióticos mais potentes, possibilitou que a humanidade tivesse um salto na expectativa de vida e pudesse se sobrepor a ação de microorganismos que outrora seriam letais. Hoje, devido ao uso indiscriminado desses medicamentos, um dos maiores desafios globais é a resistência antimicrobiana, para a qual torna-se necessário a busca e o desenvolvimento de novos fármacos de baixa toxicidade, baixo custo e com perspectivas de mercado. Para isto, recorre-se ao conhecimento milenar do uso de plantas fitoterápicas dando destaque para a extração e de seus óleos essenciais, na busca por novos fármacos que se sobreponham aos desafios atuais de saúde pública.

O Brasil detém 19% da flora mundial distribuída entre os seus principais biomas (MMA, 1998), dentre os quais para este estudo, destaca-se o cerrado. Segundo o Ministério de Meio Ambiente (2016), o Cerrado está presente nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal e é considerado de grande importância por conter diversas espécies de fauna e flora endêmicas (Klink & Machado, 2005) o que atribui a ele uma grande importância em assuntos de preservação ambiental e principalmente na riqueza de seus recursos para pesquisas sobre novos fármacos.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais tem sido demonstrada em diversos estudos, espécies de *Lippia gracilis*, encontradas no cerrado, indicam atividade leishmanicida, anti-inflamatória (OLIVEIRA DE MELO *et al.* 2013) e cicatrizante (RIELLA *et al.* 2012). O efeito inibitório de óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Syzygium aromaticum* L in vitro contra *E. Coli* e *Staphylococcus aureus* exibiram halos de inibição de 4,19mm para *E.Coli* (ATCC 8733) utilizando o óleo de *O. gratissimum* e halos de 3,43mm para o óleo de *S.aromaticum* evidenciando atividade frente a bactérias gram-negativas em concentrações de 400µL a 100µL (OLIVEIRA L. 2019).

No organismo humano há uma associação natural de algumas espécies de bactérias e fungos vivendo em uma relação comensal, porém quando há um desequilíbrio na relação com o hospedeiro, isso leva a uma disbiose. A *Candida albicans* pertencente ao gênero *Candida*, é uma levedura comensal encontrada com facilidade na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento, mas em circunstâncias excepcionais, como por exemplo, desequilíbrio biológico devido a fatores que podem ser de origem patológica, fisiológica, imunológica ou outros mecanismos – acontece uma multiplicação desordenada e invasão dos tecidos por estes microrganismos, ocasionando infecções denominadas candidíases (VALLE; RENDE; OKURA, 2010; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). A levedura está muito bem adaptada ao corpo humano e pode colonizá-lo sem produzir sinais de doença (RIBEIRO *et al.*, 2007). Esta relação comensal entre *Candida* e o ser humano é propiciada pela fisiologia do fungo e de sua relação com sistema imunológico hospedeiro. Em contrapartida, durante quadros de candidíase, o tratamento é feito utilizando medicamentos antimicóticos como o Fluconazol, Anfotericina B e Nistatina. Em um estudo realizado com 188 cepas de *Candida tropicalis* isoladas de candidemia, foi identificado a resistência de algumas cepas a ação do medicamento fluconazol (MENEZES *et al.*, 2006).

Diante do crescimento do número de patógenos do gênero *Candida*, que possuem resistência aos antimicrobianos sintéticos disponíveis no mercado, há a necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana eficaz e com efeitos colaterais diminutos. Estudos feitos em 2006 avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana de produtos naturais à base de *Cinnamomum cassia* (a canela da china) (PAWAR; THAKER, 2006) e em 1998 foi desenvolvida uma técnica de microdiluição para determinar as concentrações inibitórias mínimas, fornecendo resultados reproduzíveis que distinguia entre os efeitos microcidas e microstáticos, fornecia um registro permanente dos resultados obtidos (ELOFF, 1998) e que é utilizada até hoje. A ação antibacteriana e antifúngica de outras espécies como *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucaliptus citriodora* e *Eugenia uniflora* foi relatada nos trabalhos (ARAÚJO *et al.*, 2004), onde os resultados se apresentaram de forma satisfatória com inibição de crescimento de 61% a 72% e ainda segundo os autores, produtos fabricados na forma de extratos ou óleos essenciais são utilizados em pesquisas laboratoriais com o propósito de conhecer o potencial antifúngico dessas substâncias.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas aromáticas

O uso de plantas com finalidade terapêutica é uma tradição que se perpassa culturalmente por meio dos séculos de história humana e, ainda hoje, apresenta-se como um recurso de tratamento alternativo de grande aceitação popular. Dentre a variedade de plantas medicinais a disposição no Brasil, é importante destacar a riqueza de espécies que podem ser encontradas no Cerrado maranhense.

Nesse contexto, no nordeste do País, as espécies de *Lippia gracilis* do gênero *Lippia*, mais conhecidas como “alecrim do cerrado” são usadas na medicina popular para o tratamento de doenças que acometem as vias respiratórias. Há registros de que as partes mais utilizadas são flores e folhas, na forma de infusão (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os estudos de caracterização química dos óleos essenciais de espécies de *Lippia* indicam presença de componentes majoritários como Timol, α -pineno e β -pineno, com atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (MATOS *et al.*, 1998) na caracterização química feita por Bitu *et al* (2012) os compostos majoritários encontrados foram Timol como (44.42%; 21.3%), seguido pelo carvacrol (22.21%; 21.30%), e os demais constituintes identificados foram o *p*-cimeno (6.23%; 8.58%), α -pineno (5.65%; 19.42%), β -carofileno (5.61%; 3.57%).

Ainda no nordeste brasileiro, espécies endêmicas como *Ocimum gratissimum* (“Alfavaca de galinha”) são utilizadas por comunidades tradicionais na forma de chá, feito a partir das folhas, para tratamento de dores abdominais, como descrito nos trabalhos de Pinto; Amorozo & Furlan (2006). Essa espécie também possui óleos essenciais com atividade antimicrobiana, como descrito nos trabalhos de Oliveira *et al.* (2006). Estudos feitos por Brandão *et al* (2020) da espécie endêmica recém catalogada, *Dizygostemon riparius* (de nome popular “melosa”) indicam atividade larvicida de seu óleo essencial, os constituintes majoritários do OE foram os monoterpenos oxigenados, 80% de sua composição (acetato de endo-fenchil e fenchol). Devido a catalogação recente como uma espécie aromática e a falta de informação científica sobre a composição química e propriedades biológicas (BRANDÃO *et al.* 2020), torna-se importante que mais pesquisas sobre sua potencial atividade antimicrobiana sejam investigadas.

2.2 Óleos essenciais

Os processos vitais de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam diversos tecidos dos organismos animais e vegetais. Muitas dessas substâncias, especialmente as de origem vegetal, são usadas em diversas áreas, aplicadas principalmente à alimentação e saúde, o que tem estimulado estudos fitoquímicos de várias espécies (SANTOS et al., 2004).

Nos dias atuais, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades farmacêuticas. Dentre estes compostos se destacam os constituintes químicos existentes nos óleos essenciais das plantas, pois pertencem ao maior e mais diversificado grupo dentro dos produtos naturais, além de apresentarem uma grande importância terapêutica e econômica (FRANCO et al., 2007).

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos (pela solubilidade em solventes orgânicos apolares) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, frequentemente odoríferas e líquidas, formadas pelo metabolismo secundários de plantas aromáticas (MALINOWSKI, 2010). Em geral, são constituídos de hidrocarbonetos isoprenóides com 10 átomos de carbonos (monoterpenos) como o limoneno, encontrado em frutas cítricas como o limão e a laranja, e/ou 15 átomos de carbonos (sesquiterpenos) como o farnesol, encontrado em óleos essenciais de citronela ou capim-limão e/ou ainda fenilpropanóides de baixo peso molecular, como o estragol, encontrado em plantas do gênero *Ocimum*.

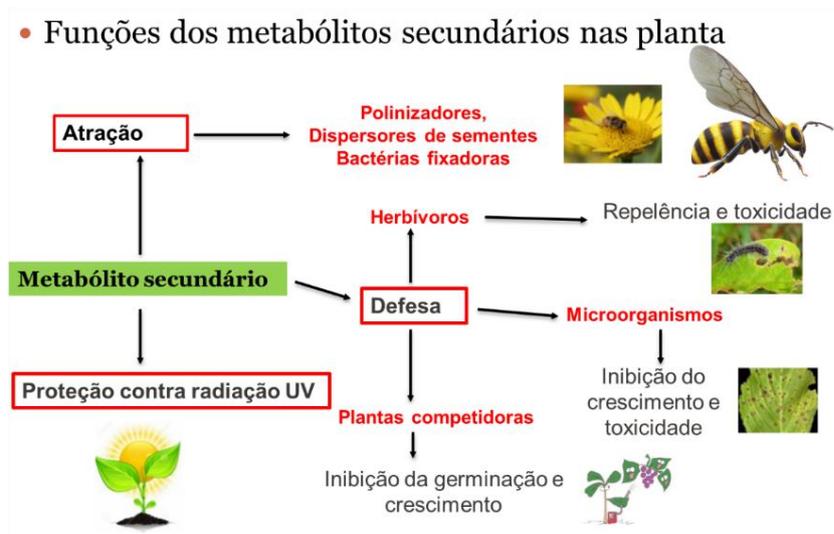
A ANVISA define os óleos essenciais como produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico, podendo se apresentar isoladamente ou misturados entre si, desterpenados ou concentrados e podendo ser encontrados em todas as estruturas vegetais, sendo mais frequente em folhas, flores, frutos e menos em raízes, rizomas, lenhos, córtex ou sementes (BRASIL, 1999).

Os óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundários produzidos em resposta ao estresse e ataque de patógenos. Sua síntese é influenciada pelas interações ecológicas entre planta e o ambiente. Na figura 1 são mostradas suas principais funções nas plantas.

Figura 1. Mecanismos desenvolvidos pelas plantas como resposta ao ambiente.

Óleos Essenciais

• Funções dos metabólitos secundários nas planta



A incapacidade de locomoção das plantas pressionou a espécie a desenvolverem mecanismos que possibilitem um desenvolvimento flexível sem comprometimento das células e processos fisiológicos primários, pelo fato de serem influenciadas ao longo do tempo pelos fatores bióticos e abióticos (ISAH, 2019).

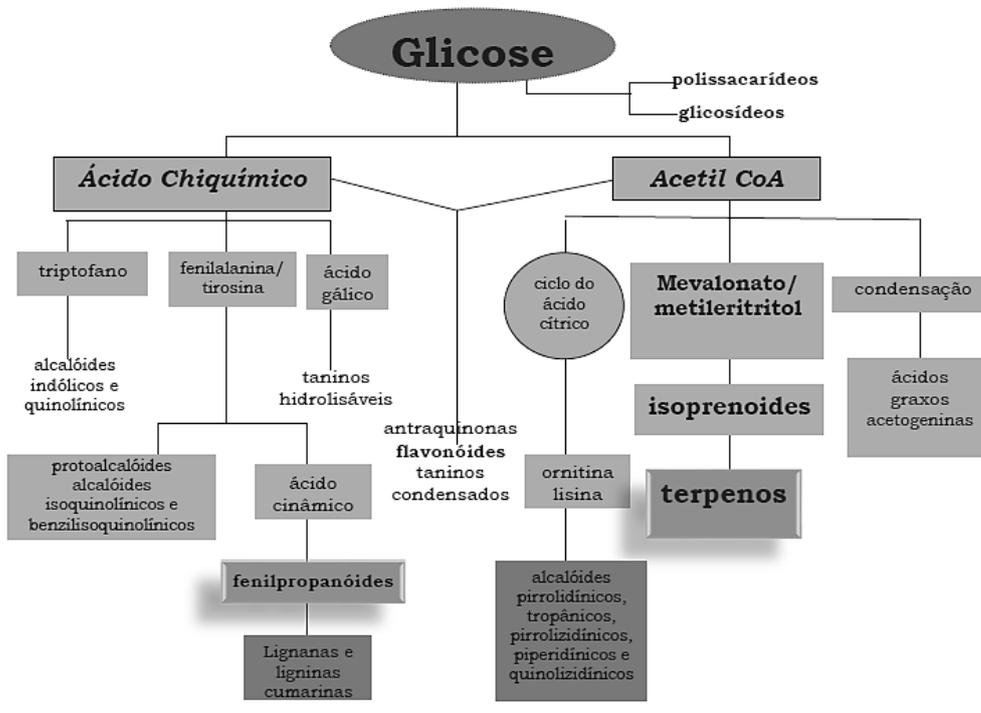
Fonte: Autoria própria (2021)

2.3 Rotas biossintéticas de metabólitos secundários

O metabolismo secundário é o responsável pela produção dos óleos essenciais em uma planta. Este sistema é especializado em produzir substâncias chamadas de metabólitos secundários, que não estão ligadas diretamente ao crescimento ou desenvolvimento do vegetal, nem aos processos de fotossíntese, assimilação de nutrientes, respiração ou síntese de proteínas, carboidratos e lipídeos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Metabólitos secundários são classificados de acordo com o caminho que percorreram para serem desenvolvidos. Existem três categorias: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2006). Na figura 2 estão representadas as principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário de uma planta, com suas respectivas relações com o metabolismo primário da mesma.

Figura 2. Rotas de biossíntese possíveis para os metabólitos secundários das plantas.

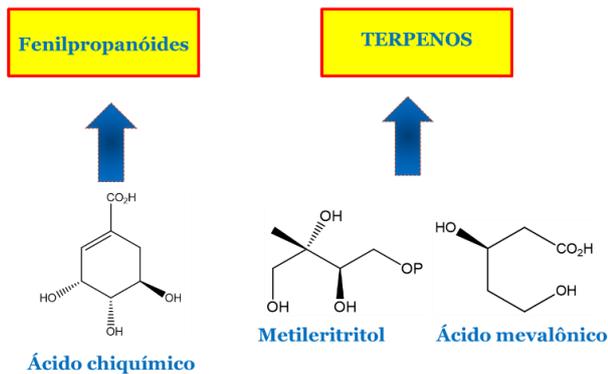


Fonte: Autoria própria (2021)

Os terpenos e os fenilpropanóides são constituintes principais dos óleos essenciais devido ao reconhecimento de seu elevado potencial antimicrobiano, que uma vez em contato com o sítio ativo das enzimas dos microorganismos, estagnam as demais funções enzimáticas destes. BURT (2004).

Figura 3. Principais Estruturas de fenilpropanóides e terpenos pertencentes aos OEs

DERIVADOS DE TERPENOS E FENILPROPANÓIDES



2.4 Técnicas analítico-instrumentais de caracterização química dos Óleos essenciais

A natureza volátil dos óleos essenciais torna necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas eficientes que possam tanto extraí-lo sem danificar sua composição quanto para quantificação e caracterização posterior dos seus compostos. Dessa forma, técnicas de separação como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas são satisfatórias na quantificação dos componentes por meio da identificação de seus fragmentos.

2.5 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica de separação na qual os componentes da amostra, em formato de vapor, são arrastados por uma fase móvel (gás de alta pureza e inerte) e interagem com uma fase estacionária que pode ser sólida ou líquida (COLLINS *et al.*, 2006), a eluição se dá pelo fluxo constante da fase móvel gasosa. Durante o trajeto percorrido pela amostra na coluna, acontece a separação dos compostos como consequência de interações intermoleculares e de forma subsequente, as substâncias separadas chegarão ao detector em tempos distintos, gerando um sinal correspondente para cada analito. Ao registro destes picos, dá-se o nome de cromatograma. A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é chamada de CG/EM. A espectrometria de massas mede a razão massa por carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. Os íons produzidos pelo espectrômetro apresentam uma carga unitária ($z = 1$), fazendo com que o equipamento apresente o valor das massas de cada composto e suas frações. A grande vantagem no uso desta técnica analítica instrumental está no uso de pequenos volumes de amostra para quantificação.

2.6 Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais

As propriedades terapêuticas e organolépticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à presença de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides dentre outros compostos voláteis, que conseguem interagir com enzimas biológicas de forma sinérgica. Os óleos essenciais têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas

na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana, atividades antifúngica e inseticida (SARTO, M., & ZANUSSO JUNIOR, G. 2014). Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentos, produtos sanitários, indústrias de cosméticos e perfumes.

Várias são as atividades farmacológicas conhecidas de alguns óleos essenciais, seja por meio da medicina popular ou pesquisas científicas. Dentre estas, cita-se: ação carminativa, antiespasmódica, estimulante sobre secreções do aparelho digestivo, cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, sobre o sistema nervoso central (SNC), analgésica local, antiinflamatória, antisséptica (inibindo crescimento de bactérias e fungos), inseticida, entre outras ((SARTO, M., & ZANUSSO JUNIOR, G. 2014).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: os terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Miranda, 2012) que são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes presentes nas plantas, essa atenção é justificada devido ao comportamento desses compostos em ensaios antibacterianos, antifúngicas e larvicida. De acordo com Negi (2012) e Oussalah *et al.* (2007), os diferentes compostos de origem das plantas e dos OE podem reduzir de forma efetiva o crescimento de patógenos. Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, éster, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (Bajpai *et al.*, 2008).

Na literatura, existem mecanismos pelos quais podem ser explicadas a ação bacteriostática e bactericida dos óleos frente aos microrganismos, uma delas é a natureza lipofílica dos óleos essenciais que permitem a eles o rompimento da parede celular de bactérias e fungos desfazendo sua estrutura de proteção primária e posteriormente outras estruturas como membrana citoplasmática (BURT, 2004; LAMBERT *et al.*, 2001) causando danos permanentes as proteínas e afetando assim o ciclo geral da célula.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas do cerrado maranhense.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair os óleos essenciais de espécies de *Lippia gracilis*, *Dizygostemon riparius* e *Ocimum* do cerrado maranhense através da hidrodestilação;
- Identificar e os compostos presentes nos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais do cerrado maranhense frente ao fungo *Candida albicans* e às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus epidermidis*.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

Folhas maduras e intactas das espécies aromáticas *Ocimum gratissimum*, *Lippia gracilis* e *Dizygostemon riparius* foram coletadas. As exsicatas foram encaminhadas para identificação no Herbário João Murça Pires, Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), em Belém – Pará, Brasil.

As coletas da espécie *Ocimum gratissimum* aconteceram entre dezembro de 2020 e agosto de 2021 no município de Axixá- MA, os pontos de coleta foram georeferenciados e disponibilizados na tabela abaixo:

Tabela 1. Coordenadas geográficas da coleta de *Ocimum gratissimum*.

Pontos de Coleta	Coordenadas	Referência Geográfica
P01	2°51'10.1"S 44°04'45.5"W	Próximo a Distribuição de Açaí
P02	2°50'58.6"S 44°04'59.3"W	Residência da “Dona Zida”

P03	2°51'03.1"S 44°05'10.4"W	Próximo ao Sítio, ao lado de uma grande árvore
P04	2°51'20.5"S 44°05'29.4"W	Residência 2 “Dona Zida”

Figura 4. Mapeamento da região de coleta (*Ocimum gratissimum*)



Fonte: Autoria própria (2021)

As coletas das espécies *Lippia gracilis* ocorreram nos períodos que compreendem dezembro de 2020 na Chapada das Mesas- MA. Para a espécie *Dizygostemon riparius* as coletas foram realizadas no município de São Benedito do Rio Preto no ano de 2020.

Figura 5. Espécies vegetais utilizados nesse estudo. 5a - *Ocimum cratissimum*; 5b *Dizygostemon riparius*; 5c *Lippia gracilis*.

Figura 5a. *Ocimum gratissimum*



Figura 5b. *Dizygostemon riparius*



Figura 5c. *Lippia gracilis*



Fonte: Autoria própria (2021)

As folhas obtidas das espécies (Figuras 5a; 5b; 5c) foram secas foram trituradas, colocadas em um balão de 1L de capacidade e a ele foi acrescentado água em quantidade suficiente para cobri-las para que fossem submetidas à hidrodestilação durante o período de 2h30min, utilizando-se de um aparelho do tipo Clevenger modificado acoplado a um Sistema de Hidrodestilação com Banho Ultratermostático (Figura 6). Os óleos obtidos foram separados

da água e secos utilizando sulfato de sódio anidro, posteriormente centrifugados por aproximadamente 15 minutos. Após este processo, eles foram retirados com auxílio de uma pipeta graduada e acondicionados em ampolas de vidro âmbar a 5 °C até serem utilizados. O rendimento dos óleos foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de folhas secas.

Figura 6: Sistema de Hidrodestilação com Banho Ultratermostático



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Testes de sensibilidade antimicrobiana

Para realização dos testes todos os materiais foram esterilizados e submetidos a testes de Controle de Qualidade para comprovar a esterilidade dos materiais que foram utilizados nos experimentos. Amostras de três óleos essenciais de *Lippia Gracilis*, *Dizygostemon riparius* e *Ocimum gratissimum*, foram utilizadas como princípio ativo, com a finalidade de testar a atividade antimicrobiana. Desta forma, foram conduzidos os testes de Disco Difusão e de Microdiluição em caldo.

4.3.1 Microorganismos utilizados

As cepas fúngica e bacteriana foram oriundas do Laboratório de Microbiologia Clínica – Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão. Para realização dos testes,

foram utilizados bactérias e fungos padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), sendo estes: *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Staphylococcus epidermidis* (isolado clínico).

4.3.2 Padronização da suspensão microbiana

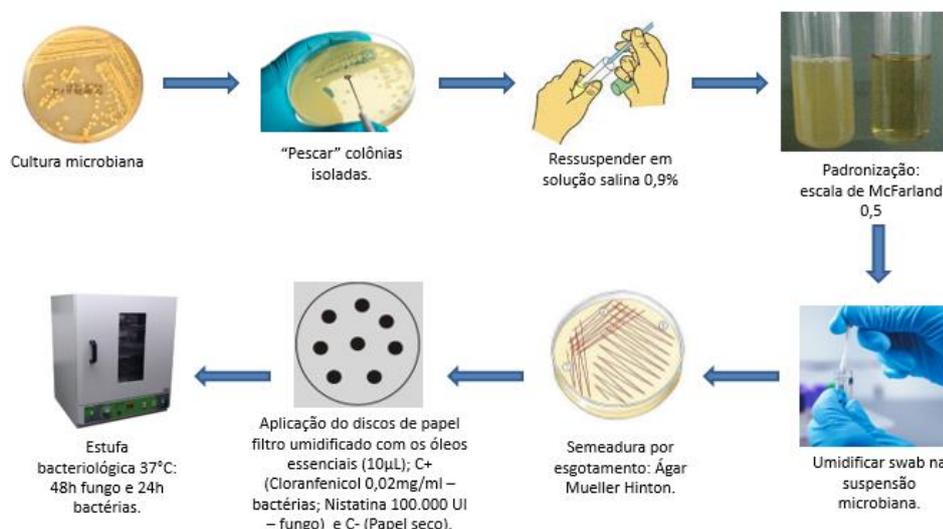
Os microorganismos foram obtidos a partir das culturas originais do estoque do laboratório, onde foram semeados em placas de Petri com o ágar adequado para cada microorganismo específico, sendo *Candida albicans* ATCC 90028 semeado em ágar batata, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Staphylococcus epidermidis* (isolado clínico) em ágar nutriente e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas para *S. aureus*, *S. pyogenes* e *S. epidermidis* e 48 horas para *C. albicans*. As colônias isoladas foram ressuspensas em solução salina 0,9% estéril, segundo o padrão de turbidez da escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bact./mL) (CLSI, 2013).

4.3.3 Difusão em ágar

Os ensaios da atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco de papel de filtro, utilizando-se o método de Kirby; Bauer (Nardeli *et al.*, 2014), com alterações. Os papéis filtro cilíndricos esterilizados, de 6 mm de diâmetro, foram embebidos de 10 µL dos óleos, conforme realizado por Haida *et al.* (2007), e os discos foram aplicados sobre os meios de cultura Ágar Mueller-Hinton contendo os microorganismos semeados. Os meios de cultura foram mantidos na estufa durante 24 horas para as bactérias e 48h para o fungo a 37 °C. Para controle positivo de sensibilidade foi utilizado Cloranfenicol 0,02mg/ml para bactérias e Nistatina 100.000UI para fungo. Após a incubação, foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro dos halos de inibição. Os testes foram realizados em duplicata. Foi considerado como resultado a média das duas medidas expressas em diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano (AZEVEDO 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2010). A representação sistemática do procedimento está organizada no fluxograma da figura 7.

Figura 7. Fluxograma do teste de sensibilidade microbiana

Fluxograma -Disco Difusão



Fonte: NARDELI et al., 2014; AZEVEDO, 2014; GUIMARÃES et al., 2010, HAIDA et al., 2007 (Com adaptações).

4.3.4 Microdiluição em caldo - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, para tanto foram utilizadas placas de 96 poços, estéreis e com adaptações do CLSI (2013). O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller Hinton associado a 1% de Tween 80 para todos os microorganismos.

Diante disso, foram adicionados 150 µL do meio de cultura em cada um dos 96 poços da placa e, em seguida, uma alíquota de 150 µL de cada óleo a ser testado foi colocado no primeiro poço de cada fileira, prosseguindo-se assim com as diluições seriadas do meio. Após as diluições, 6 µL da suspensão microbiana foram adicionados em todas as diluições e nos grupos controle. Como controle positivo foi utilizado 30 µL de Cloranfenicol (0,02 mg/mL) para as bactérias e 30 µL de Nistatina (100.000 UI/mL) para o fungo. Como controle negativo foi utilizado nos poços somente o meio de cultura com a suspensão bacteriana. O procedimento foi feito em duplicata para cada microorganismo, sendo as placas acondicionadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas para as bactérias e 48 horas para o fungo. Após o período de incubação foram adicionados em todos os poços 30 µL de Resazurina 0,01% (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) observando-se no decorrer de 2 horas a presença de cor azul

representando ausência de crescimento microbiano e de cor rosa representando a presença do crescimento.

4.3.4 Determinação da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM)

As CBM/CFM foram determinadas com base na metodologia de Simonetti (2015), com adaptações a partir dos poços nos quais não houve crescimento microbiano visível no teste da CIM. Foram utilizadas placas com o meio de crescimento Ágar Nutriente para todos os microorganismos que foram demarcadas de acordo com a CIM, onde foi retirada uma alçada de cada diluição até a CIM e semeada nas placas para se verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) que é a menor concentração do ativo que inibe, pelo menos, 99,9% do inóculo bacteriano (NAKANO, 2011).

4.4 Análise da composição dos óleos essenciais

As amostras de óleos essenciais foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás (CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da marca Shimadzu, utilizando uma coluna capilar DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). O fluxo do gás de arraste (Hélio), a uma velocidade linear de 30 cm/sec e fluxo da coluna 1,0 mL/min, razão de Split 1/30. A programação do forno foi de 35 °C por 6 minutos com rampa de aquecimento de 10 °C/min até 240 °C, permanecendo até 10 minutos. A temperatura do injetor e da fonte de íons de 250 °C e 200 °C, respectivamente. O modo de injeção Split com razão de 1/30. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 36,50 minutos.

O preparo da amostra para injeção deu-se por 1µL do óleo solubilizado em 500µL de Hexano, grau HPLC. A Identificação dos compostos foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação através da Biblioteca do Equipamento NIST08 (National Institute of Standards and Technology).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação botânica e Análise de rendimento

As análises de semelhança feita com as exsicatas de cada amostra foram consideradas suficientes para a identificação botânica das espécies. Os herbários consultados foram o Herbário MAR (UFMA) e o Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG).

Na extração do óleo essencial das espécies vegetais (Figuras 4a, 4b e 4c), foram adicionados aproximadamente 50g no balão volumétrico. Ao final do procedimento de hidrodestilação, para cada espécie, foi calculado o rendimento e os resultados estão expressos na tabela abaixo:

Tabela 2. Rendimento dos OEs das folhas das espécies coletadas.

Espécie	<i>Lippia Gracilis</i>	<i>Dizygostemon riparius</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>
Rendimento	4,21%	1,54%	4,12%

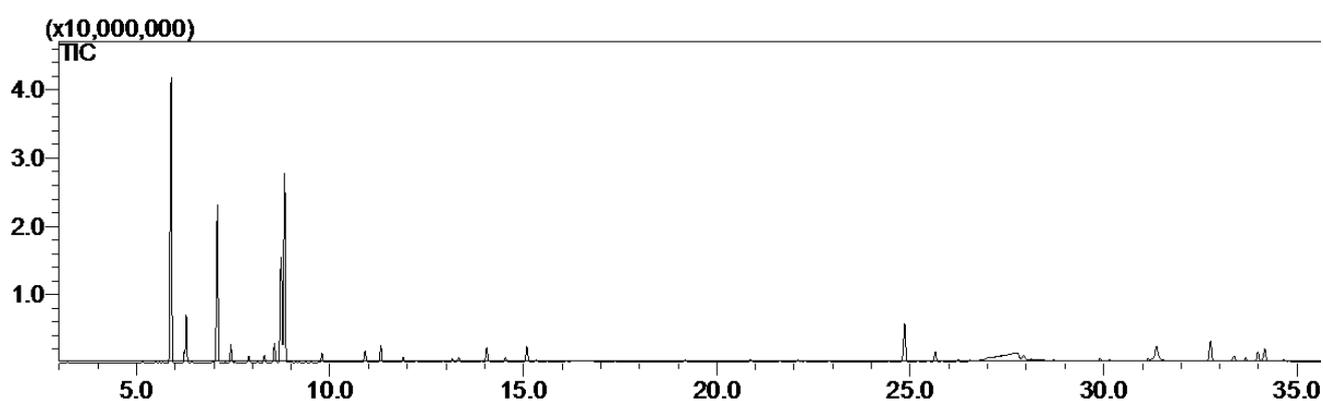
Os rendimentos encontrados para *Lippia Gracilis* neste estudo, são compatíveis aos valores previamente descritos no trabalho de Lacoste *et al* (1998) de com rendimentos entre 1,5% a 5,2%. Para a espécie *Dizygostemon riparius* o rendimento encontrado converge ao descrito no trabalho de Brandão *et al.* (2020) cujos valores encontrados são respectivamente 1,3%. Na espécie *Ocimum gratissimum* o rendimento encontrado para este trabalho foi ligeiramente maior que os valores encontrados por Cardoso Romão *et al.* (2017), de 1,46% utilizando 100g de biomassa vegetal já no trabalho de Pereira dos Santos *et al.* (2016) foram encontrados rendimentos variáveis de 2,35% e o mais alto de 4,66%, que se aproxima do rendimento do OE de *Lippia gracilis* encontrados neste estudo. Os valores não são conflitantes, pois em um estudo circadiano feito por Castro *et al.* (2019) sobre a composição do óleo de *O.gratissimum* a variação dos óleos foi de 0,46% (6p.m) a 0,58% (9a.m) dessa forma, o autor concluiu que as condições climáticas influenciam diretamente no rendimento do óleo e na sua composição.

5.2 Análise da composição química de *Lippia gracilis*

Esta espécie faz parte da família Verbenaceae conhecida popularmente como alecrim-do-tabuleiro, é amplamente estudada devido a sua alta capacidade de produzir óleo essencial. Santos *et al.* (2014) conseguiram uma alta atividade antibacteriana com um OE da espécie em que o carvacrol era seu componente majoritário. Também já foram estudadas suas atividades antifúngicas de óleos cujos quimiotipos eram o timol e o carvacrol (FERNANDES *et al.*, 2015) além de moderada atividade antioxidante de um óleo com alto teor de timol (CARVALHO, 2012).

As figuras a seguir representam o cromatograma obtido e na tabela 3 a lista de constituintes do óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis*. Essa análise química permitiu a identificação dos compostos em maiores teores, sendo identificados o α -pineno (24,47%), β -pineno (11,89%) e 1,8-cineol (16,18%). A determinação do índice de retenção é essencial para ajudar na identificação, por comparação com o IR da biblioteca, dos constituintes químicos, nesse sentido, os IR encontrados para esta espécie são compatíveis com os valores encontrados nos estudos de Chaves *et al* (2017).

Figura 8: Cromatograma do OE das folhas de *Lippia gracilis*



Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 3: Composição química do OE das folhas de *Lippia gracilis*

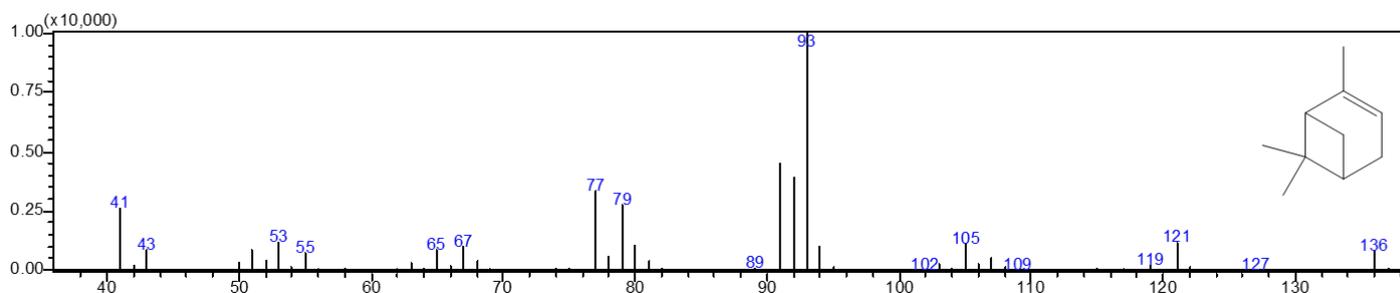
TR	Constituinte	%	IR ^a	IR ^b
5,895	α-Pineno	24,47	934	932
6,285	Fencheno	0,72	947	945
6,285	Canfeno	3,25	950	946
6,425	Tuja-2,4-dieno	0,04	954	956
7,090	β-Pineno	11,89	978	974
7,440	Mirceno	1,25	991	988

7,905	α -Felandreno	0,54	1006	1001
8,305	α -Terpineno	0,58	1017	1010
8,565	<i>p</i> -Cimeno	1,56	1024	1018
8,735	Limoneno	9,64	1029	1024
8,830	1,8-Cineol	16,18	1031	1026
8,995	β -Ocimeno	0,05	1036	1032
9,790	γ -Terpineno	0,8	1058	1054
10,910	Terpinoleno	1,05	1089	1086
11,315	Linalol	1,45	1100	1100
11,900	<i>endo</i> -Fenchol	0,51	1116	1113
12,220	Hidrato de <i>trans</i> -Pineno	0,2	1122	1127
12,935	<i>trans</i> -Pinocarveol	0,12	1139	1142
13,155	Cânfora	0,37	1144	1141
13,325	Canfeno Hidratado	0,45	1148	1156
14,045	Borneol	1,61	1166	1165
14,535	Terpinen-4-ol	0,52	1177	1174
15,090	α -Terpineol	1,51	1191	1186
15,340	Mirtenol	0,22	1197	1207
Total		99%		

Legenda ■ Componentes majoritários; TR = Tempo de retenção na coluna cromatográfica. IR^a = Índice de Retenção Calculado. IR^b = Índice de Retenção biblioteca (NIST08)

A figura 12 mostra a fragmentação do composto majoritário, α -Pineno (figura 13.a), do OE de *Lippia gracilis* após análise de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas os demais componentes majoritários estão representados nas figuras 13b e 13c.

Figura 9. Espectro de massas do α -Pineno



No espectro de massas do α -Pineno é possível identificar o pico do íon molecular $m/z = 136$, sendo $C_{10}H_{16}$ a fórmula molecular do α -Pineno. O pico $m/z = 121 [M - 15]^+$ é formado após perda de um grupo metila $(CH_3)^+$, já o pico $m/z = 93$, que representa o pico base, é originado pela perda do grupo $(C_2H_4)^+$.

Figura 10a. Estrutura α -Pineno

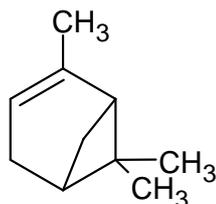


Figura 10b. Estrutura β -Pineno

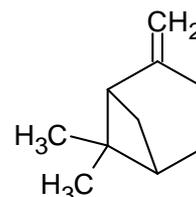
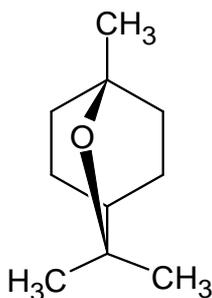


Figura 10c. Estrutura 1,8-cineol



Fonte: Autoria própria (2021)

Os compostos majoritários do OE de *Lippia gracillis* são classificados em terpenos e fenilpropanóides. O estudo de Zhang *et al* (2017), com o óleo essencial de *Piper nigrum* apresentou forte atividade antibacteriana, demonstrada por halos que variaram de 17 mm a 26 mm. Esse potencial foi atribuído à presença de monoterpens, como α -pineno, β -pineno entre como constituintes majoritários do óleo. Estudos de determinação dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *L. gracilis Schauer* feitos por Neves *et al.* (2008) mostraram a presença dos constituintes: carvacrol e p-cimeno. A divergência encontrada na literatura com os componentes desse estudo dá-se ao fato da constituição dos OE estar sujeita a mudanças pelo tipo de solo, clima e efeitos intempéricos as quais as plantas são submetidas. Os Índices de Retenção para o 1,8-cineol estão próximos com o descrito no trabalho de A.Apel *et al* (2006) onde o valor encontrado foi de 1026.

5.3 Análise da composição química de *Ocimum gratissimum*

A espécie *Ocimum gratissimum*, pertencente à família Lamiaceae, possui diversas aplicações e, seu óleo essencial, comprovadas atividades farmacológicas. O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* foi analisado por CG-EM e em seguida, foi avaliada sua composição química sua atividade antifúngica. Um total de 28 compostos foram identificados na amostra do óleo, onde o carvacrol (31,46%), o γ -terpineno (21,43%) e o o-cimeno (17,61%) apresentaram-se como os componentes majoritários (Tabela 4).

Figura 11: Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

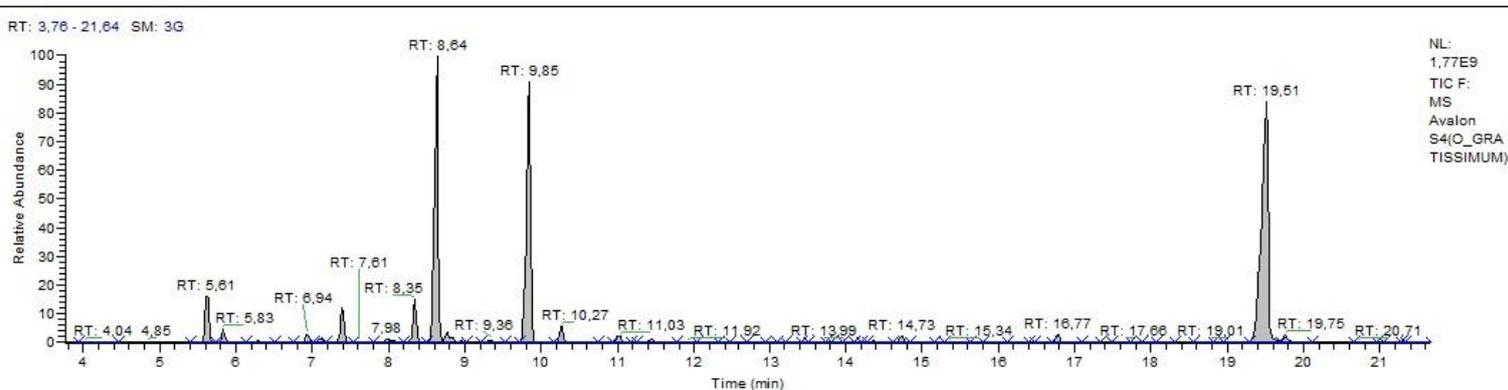


Tabela 4. Resultados obtidos pela análise de CG/EM para o Óleo de *ocimum gratissimum*

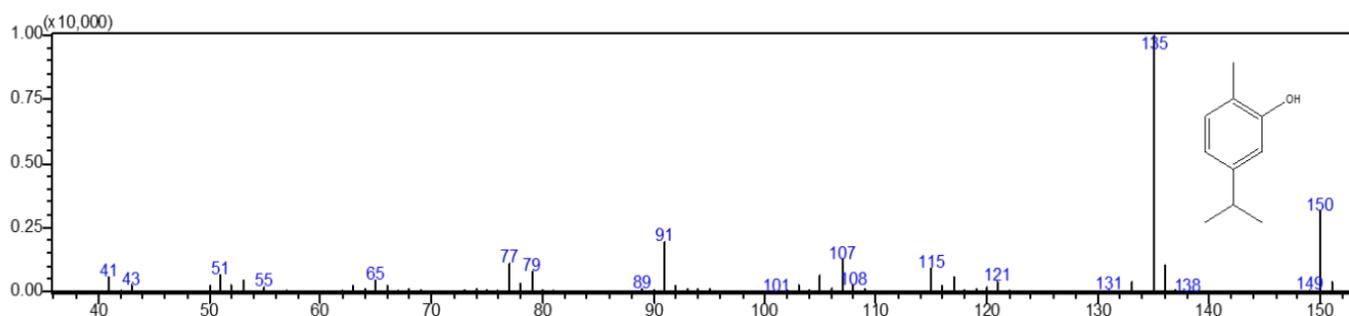
Composto	%	IR ^a	IR ^b
α -Felandreno	3,71	969	967
α -Tujeno	0,73	902	904
β -Tujeno	0,6	873	871
β -Terpineno	0,20	993	989
β -Mirceno	3,74	958	956
α -Felandreno	0,28	964	961
α -Terpineno	4,87	998	995
o-Cimeno	17,61	1042	1039
Limoneno	0,86	1018	1017
γ-Terpineno	21,43	998	994
β -Terpineol	1,18	1158	1155
β -metil-propenil-benzeno	0,81	1077	1071
<i>cis</i> - β -Terpineol	0,21	1158	1153
Terpinen-4-ol	1,32	1137	1134
2-isopropil-5-metil-Anisol	2,19	1231	1227
Carvacrol	31,46	1262	1258

	Cariofileno	2,21	1494	1489
	α - Cubebeno	0,51	1344	1341
	Azuleno	1,75	1490	1485
	β -Bisaboleno	4,31	1500	1497
TOTAL (% ÁREA)		90,72%		

Legenda Componentes majoritários; TR = Tempo de retenção na coluna cromatográfica. IR^a = Índice de Retenção Calculado. IR^b = Índice de Retenção biblioteca (NIST08)

A figura 12 mostra a fragmentação do composto majoritário, carvacrol, do OE de *Ocimum gratissimum* após análise de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas.

Figura 12. Espectro de massas do carvacrol



No espectro de massas do carvacrol é possível identificar o pico do íon molecular $m/z = 150$, sendo $C_{10}H_{14}O$ a fórmula molecular do carvacrol. O pico base $m/z = 135 [M - 15]^+$ é formado após perda de um grupo metila $(CH_3)^+$, já o pico $m/z = 91$ é típico de aromáticos, denominado de íon tropílio $(C_7H_7)^+$ (PAVIA et al., 2015).

Figura 13. Estrutura Carvacrol.

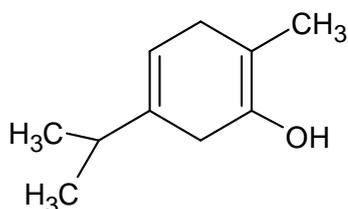


Figura 13a. Estrutura o-cimeno

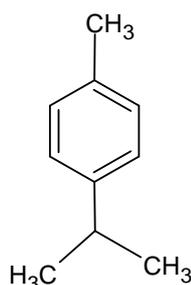
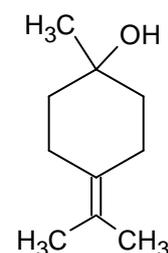


Figura 13b. γ -Terpineno



O carvacrol é um fenol monoterpênóide com nomenclatura IUPAC de 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol ou isopropyl-0-cresol, com fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, de peso molecular 150,22 g/mol. Em temperatura ambiente, se apresenta na forma líquida e possui coloração amarelo claro com densidade igual a 0,975 g/ml. Esse composto é uma substância lipofílica com pouca solubilidade em água (coeficiente de solubilidade igual a 0,04%) e seu ponto de fusão é de 2° C e seu ponto de ebulição é de 234° C (CARVALHO et al., 2003).

Estudos de Hyldgaard *et al* (2012) demonstram que o carvacrol possui forte atividade antimicrobiana, com destaque para a atividade sobre bactérias Gram positivas, pois causa dano na membrana celular da bactéria, resultando em sua dissolução por uma série de pequenos mecanismos que incluem a diminuição de síntese do ATP e conseqüentemente provocando uma diminuição na síntese de outras enzimas necessárias para o ciclo de vida bacteriano (Nostro e Papalia, 2012). A composição do OE de *Ocimum gratissimum* como constituinte majoritário carvacrol está em conformidade com a literatura. Os Índices de Retenção obtidos para o carvacrol (1262), o-Cimeno (1042) e γ -Terpineno (998) estão em conformidade com os valores descritos no estudo de Chaves *et al* (2017). O γ -terpineno de nomenclatura IUPAC 1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) (Figura 13.c) é um monoterpene encontrado nos óleos de espécies de plantas farmacologicamente ativas descritas na literatura. Em sua estrutura química possui uma insaturação de cadeia cíclica no qual atribui a ele características altamente lipofílicas, permitindo a interação desse composto com membranas biológicas, refletindo em uma boa atividade antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória (GEDARA, 2008; PASSOS; LOPES; DE SOUSA; *et al.*, 2015; PIARU *et al.*, 2012).

Castro (2019) realizou um estudo circadiano do óleo de *O.gratissimum* onde no período de dezembro os constituintes majoritários encontrados por ele foram Timol (37,7%), γ -terpineno (26,2%) e *p*-cimeno (15,8%) apresentando uma similaridade na caracterização encontrada neste estudo para o mesmo período.

5.4 Análise da composição química da espécie *Dizygostemon riparius*

A espécie *Dizygostemon riparius*, pertencente à família Plantaginaceae, é uma planta aromática ripária comumente conhecida como “melosa”, pertencente a um gênero raro e endêmico do Brasil.

O método de hidrodestilação foi empregado para extração do óleo essencial, a partir da biomassa foliar seca obtendo-se rendimento médio de 1,54%. A figura 14 representa o cromatograma do óleo essencial da espécie *Dizygostemon riparius* onde analisou-se o perfil químico do óleo essencial, utilizando-se as técnicas de CG-EM. Identificou-se na tabela 5 um percentual de 96,34% de constituintes terpênicos, sendo os compostos majoritários na matriz do óleo essencial, acetato de fenchil e fenchol com variações de 43,41% e 36,52%, respectivamente.

Figura 14: Cromatograma do óleo essencial de *Dizygostemon riparius*

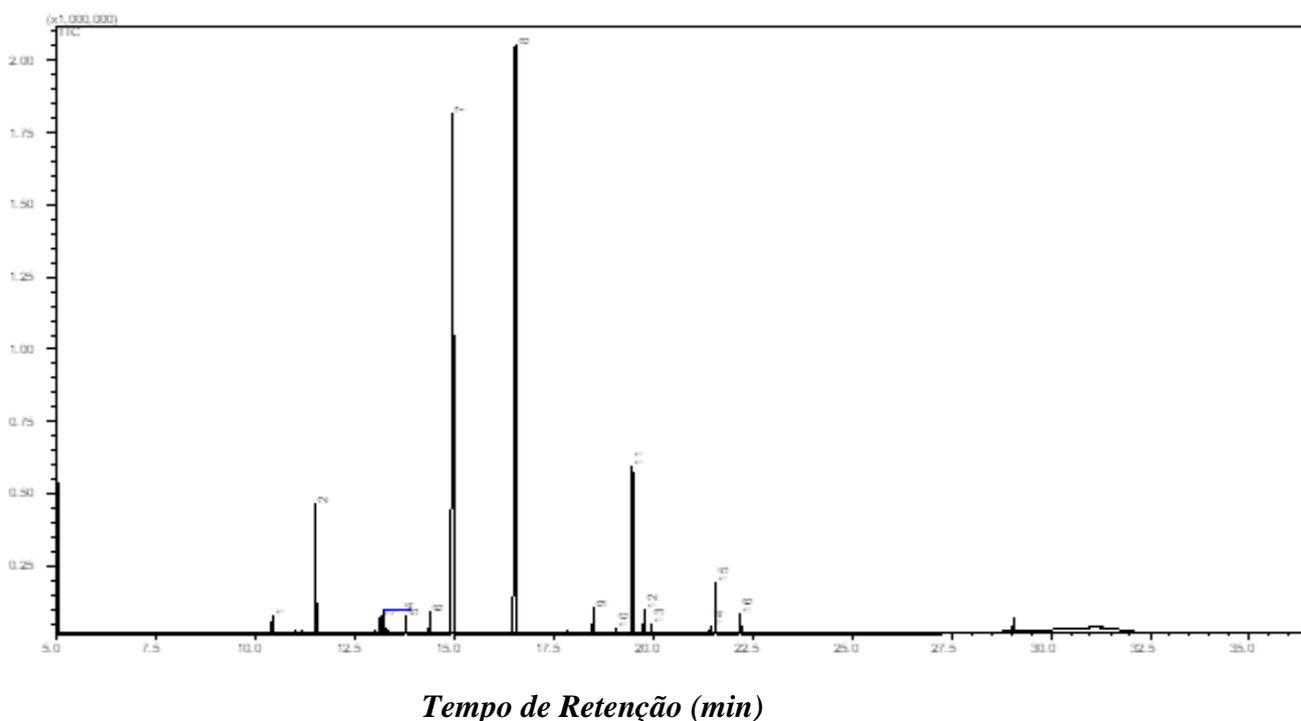


Tabela 5. Resultados obtidos pela análise de CG/EM para o Óleo de *Dizygostemon riparius*

Compostos	%	IR ^a	IR ^b
1,7,7-trimetil- Biciclo[2.2.1]hept-2-eno	0,67	932	927
7,7-dimetil-2-metileno- Norbornano	5,37	943	939
o-Cimeno	0,60	1042	1042
Limoneno	0,87	1018	1017

γ -Terpineno	0,58	998	994
1,3,3-trimetil-Fenchona	0,78	1121	1119
Fenchol	36,52	1138	1138
Acetato de Fenchil	43,41	1277	1277
2,6,10,15,19,23-hexametil-Tetradeca-2,6,10,14,18-pentaen-22-ona	0,84	1785	1785
Metil-Eugenol	0,15	1361	1359
Cariofilleno	6,34	1494	1494
Ácido pentanóico-1,3,3-trimetil-biciclo[2.2.1]hept-2-il ester	0,84	1576	1573
α -Cariofileno	0,29	1579	1579
1,2,3,4,5,6-hexametil-1,3-Cicloexadieno	0,25	1164	1164
Óxido de cariofileno	1,86	1507	1507
4,4-dimetil-Tetraciclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol	0,63	1490	1490

TOTAL (% ÁREA)

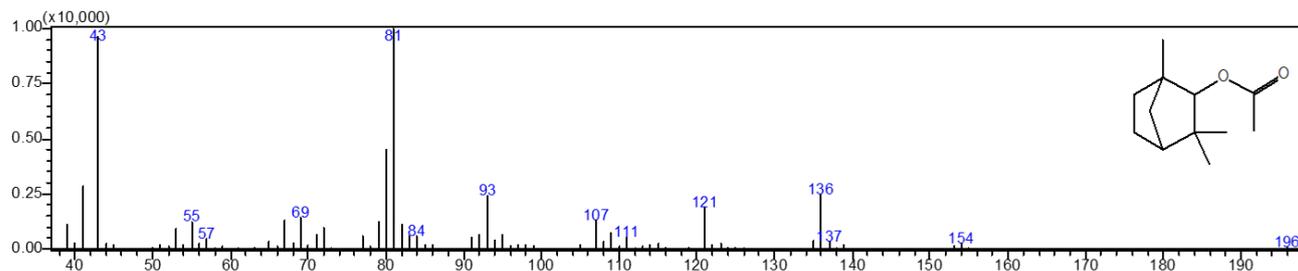
100%

Legenda Componentes majoritários; TR = Tempo de retenção na coluna cromatográfica. IR^a = Índice de Retenção Calculado. IR^b = Índice de Retenção biblioteca (NIST08)

Fonte: Autoria própria (2021)

A figura 15 mostra a fragmentação do composto majoritário, acetato de fenchil, do OE de *Dizygostemon riparius* após análise de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas.

Figura 15. Espectro de massas do acetato de fenchil



Fonte: Autoria própria (2021)

No espectro de massas do acetato de fenchil ($C_{12}H_{20}O_2$) é possível identificar o pico do íon molecular $m/z = 196$. O pico $m/z = 136 [M - 60]^+$ é formado após perda de um grupo alcóxi, típico de ésteres. Já o pico base $m/z = 81$ é identificado como o cátion radical bicíclico $[M-115]$ (PAVIA et al., 2015).

Figura 16a. Estrutura Acetato de Fenchil

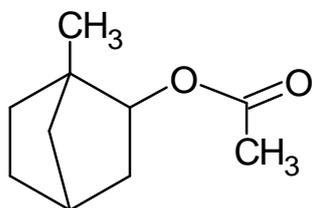
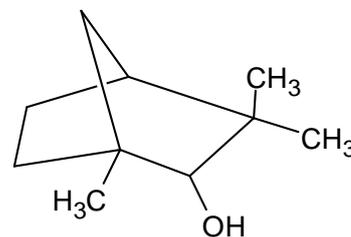


Figura 16b. Estrutura Fenchol



Fonte: Autoria própria (2021)

O índice de retenção do Acetato de Fenchil de 1277, encontrado nesta caracterização química é compatível com o que foi encontrado no trabalho de Brandão *et al* (2020). O acetato de fenchil classifica-se como um monoterpene oxigenado de nomenclatura IUPAC Acetato de fenila ou ainda acetilfenol, possui peso molecular 136,1g/mol e densidade 0,98g/mL. A composição majoritária do OE de *Dizygostemon riparius* por constituintes terpênicos, está em acordo com os estudos de Brandão *et al* (2020) o que atribui a esse óleo atividade larvicida,.

5.5 Análise antimicrobiana

Em conjunto com o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, elaborou-se um protocolo para avaliação das atividades dos óleos frente a cepas bacterianas tendo como principal alvo a atividade contra *Candida albicans*. Os óleos foram previamente identificados, a fins de teste, com números em sequência: *Lippia gracilis* como óleo 1; *Dizygostemon riparius* como óleo 2; *Ocimum gratissimum* como óleo 3. Os óleos foram submetidos a testes de sensibilidade microbiana e teste de difusão com discos de caráter qualitativo.

Com a realização do teste de difusão, foi possível observar que todos os óleos exerceram atividade frente aos microrganismos experimentados. No teste, os halos de inibição formados foram medidos e os seus tamanhos registrados em milímetros. Destaca-se os halos formados pelo Óleo 3 para o fungo *C. albicans* (ATCC 90028) com 44 milímetros de diâmetro (Tabela 6) quando em comparação com o halo de 6mm apresentado pelo controle positivo (Nistatina 1000.000UI) e para as demais bactérias, o controle positivo Cloranfenicol 0,02mg/ml apresentou os maiores halos de inibição quando comparado aos demais óleos.

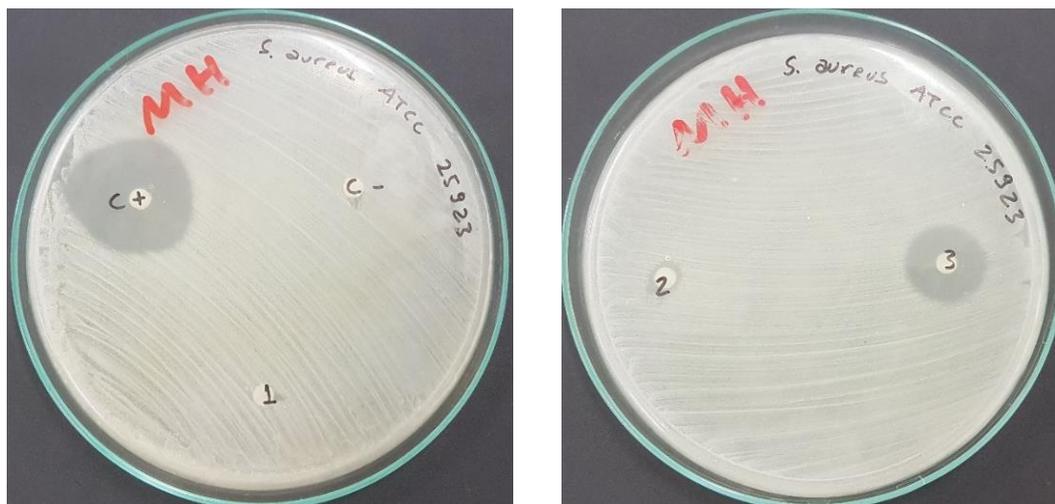
Tabela 6. Zona de inibição microbiana formada após a exposição aos óleos essenciais *Lippia gracilis*, *Ocimum gratissimum* e *Dizygostemon riparius*.

Microorganismos	Zona de inibição (mm)				
	Óleo 1	Óleo 2	Óleo 3	C+	C-
<i>C.albicans</i>	4	1	44	6	0
<i>S. aureus</i>	1	1	18	28	0
<i>S. pyogenes</i>	1	4	10	20	0
<i>S. epidermidis</i>	1	1	6	20	0

Legenda: **Óleo 1.** *Lippia gracilis*; **Óleo 2.** *Dizygostemon riparius*; **Óleo 3.** *Ocimum gratissimum*

Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 17. Formação de halos de inibição dos Óleos Essenciais 1, 2, 3 assim como no grupo Controle: C+ (controle positivo) e C- (controle negativo).



Fonte: Autoria própria (2021)

A CIM determina a concentração mínima que o ativo exerce sua função bacteriostática, concentração em que o microrganismo deixa de se multiplicar, de aumentar em quantidade, porém o microrganismo ainda permanece viável. A CBM/CFM visa determinar a concentração mínima que o ativo exerce função bactericida, concentração que é capaz de matar o microrganismo.

Os óleos essenciais deste estudo, apresentaram atividade frente a todos os microrganismos testados, tendo como maior Concentração Inibitória Mínima (CIM) (resultado menos significativo) o Óleo 2 para os microrganismos *C. albicans* (ATCC 90028) com inibição até a concentração de 4,687 μL e *S. aureus* (ATCC 25923) com inibição até a concentração de 0,292 μL . O óleo 3 não apresentou atividade bacteriostática, apenas atividade bactericida para *C. albicans* (ATCC 90028) com concentração de 0,009 μL como destacado na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação CIM e CBM/CFM ($\mu\text{L}/\text{mL}$) os óleos essenciais.

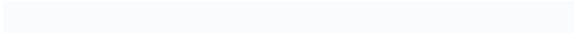
Óleos	Microorganismos							
	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. pyogenes</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	CIM	CFM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1	1,171	2,343	1,171	9,375	1,171	4,687	0,585	1,171
2	0,585	4,687	0,292	-	1,171	4,687	1,171	18,750
3	0,009	0,009	0,292	1,171	0,292	9,375	0,292	1,171

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM/CFM: Concentração Bactericida/Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo; -: Sem atividade. **Óleo 1.** *Lippia gracilis*; **Óleo 2.** *Dizygotemon riparius*; **Óleo 3.** *Ocimum gratissimum*
Fonte: Autoria própria (2021)

De modo geral, os óleos essenciais demonstraram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, seja com atividade bacteriostática ou bactericida, em diferentes diluições. Destaca-se, dentre os óleos, o óleo 3 por sua grande atividade antifúngica e antibacteriana, respectivamente.

O óleo 3, que possui o melhor indicativo de atividade antimicrobiana pertence a espécie de *Ocimum gratissimum*, de nome popular alfavaca. A efetiva inibição de fungos pelo OE de *Ocimum gratissimum* pode ser justificada pela grande porcentagem de carvacrol em sua composição, um composto fenólico de conhecida ação antisséptica, sem excluir o efeito sinérgico entre os demais componentes do OE. O trabalho feito por La Stora (2010) utilizando microscopia de força atômica, descreve e observa o mecanismo de ação do carvacrol sobre as células bacterianas e foi observado que esse composto danifica a membrana externa desta e sob a concentração de 6mM nenhuma cepa consegue permanecer viável. Di-Pascua *et al.* (2006, 2007) sugere que o mecanismo de ação do carvacrol faz com que a permeabilidade da estrutura bacteriana seja alterada, aumentando sua fluidez. Estudos realizados por Ait-Ouazzou *et al.* (2011) frente a cepas de *E. coli* com terpenóides (como carvacrol) demonstraram que ocorre uma lesão sub-letal nas membranas externas e citoplasmáticas, ocasionando a ruptura celular. Uma possível explicação para ação do óleo, pode ser atribuída a natureza ácida do grupo hidroxila nos constituintes majoritários, que forma uma ligação de hidrogênio com o sítio ativo das enzimas do microorganismo, impedindo que ela desenvolva suas demais funções (Burt. 2004). A baixa inibição observada nos óleos 1 e 2 podem ser atribuídas aos constituintes majoritários encontrados nos OE. Para o OE de *Lippia gracilis* estudos de Lacoste *et al* (1998) atribuem que quando a composição majoritária dos óleo das espécies do gênero *Lippia* são monoterpenos, carvacrol e timol, apresenta-se então uma forte atividade contra bactérias e fungos. Os constituintes majoritários encontrados neste estudo foram o α -pineno, β - pineno e 1,8- cineol. Nos trabalhos de Dorman e Deans (2000) o α -pineno, β -pineno, e outros compostos mostraram atividade antimicrobiana baixa ou nula frente a 25 gêneros de bactérias afetam animais, plantas e produtos alimentícios, podendo-se dar ênfase a *E.Coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Staphylococcus aureus*, uma das bactérias utilizadas neste trabalho, o que reforça a falta de atividade bactericida do óleo de *Lippia* frente a esta cepa.



6 CONCLUSÕES

Os processos de extrações dos óleos das plantas aromáticas obtiveram, segundo a literatura, bons rendimentos, que variaram entre 1,54% e 4,21%. Todas as extrações geraram óleos de alta qualidade, onde a presença de impurezas foi imperceptível.

Em sequência, as análises instrumentais de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, concedeu dados suficientes à elucidando desde seus componentes majoritários e, também, dos compostos minoritários. Destacando-se o α -Pino (24,47%) para *Lippia gracilis*, o carvacrol (31,46%) para o *Ocimum gratissimum* e o acetato de fenchil (43,41%) para a *Dizygostemon riparius*.

As análises microbianas demonstraram que os óleos essenciais das espécies vegetais tiveram atividade para todos os microorganismos testados, destacando-se a atividade dos óleos frente ao fungo *Candida albicans*. Dentre os óleos essenciais testados, o óleo de *Ocimum gratissimum* apresentou resultados mais satisfatórios, de grande valia para este trabalho, fruto do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – PIBITI, cujo propósito era a elaboração de um produto com potencial comercialização e dado a atividade do óleo de *O. gratissimum*, seguindo as instruções da Farmacopéia brasileira (2011) para formulações, desenvolver um sabonete de atividade antifúngica especificamente contra a candidíase. Dado o estado de pandemia do SARS-COVID-19, não foi possível a realização deste último ensaio.

7. REFERÊNCIAS

AIT- OUAZZOUA, A., CHERRAT, L., ESPINA, L., LORÁN, S., ROTA, C. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov Food Sci Emerg* 12: 320– 329, 2011.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319- 327, 2007.

ARAÚJO, J.C.L.V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**. Goiânia, v.33, n. 1, p.55-64, 2004.

A. APEL, Miriam et al. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, ano 2006, ed. 16, p. 402-407, 8 jun. 2006.

AZEVEDO, S.M. Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos. 70f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2014.

BAJPAI, A.K., SHUKLA, S.K., BHANU, S. e KANKANE, S. Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery. *Progress in Polymer Science*, 33, 1088-1118. (2008)

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2021. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/medicamentos/manuais/clsi/clsi_opasm7_a6.pdf . Acesso em: 02 mar. 2021.

BITU, Vanessa et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2012, v. 22, n. 1 Acessado em 8 de outubro 2021, pp. 69-75. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000173>.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.94,n.3.p.223-253, 2004.

CARDOSO ROMÃO *et al.* **Variação Circadiana do Teor de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais**. 2017. 24 f. Projeto de Iniciação Científica Integrada (Curso Técnico em Química integrado ao Ensino Médio) - Instituto Federal Catarinense. Campus Araquari, [S. l.], 2017. Acesso em: 5 set. 2021.

CARVALHO, A.F.; MELO, V.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94, p. 569–571, 2003

CASTRO, Joaquim A. M. de et al. Seasonal and Circadian Study of a Thymol/ γ -Terpinene/p-Cymene Type Oil of *Ocimum gratissimum* L. and Its Antioxidant and Antifungal Effects. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2019, v. 30, n. 5 [Acessado 6 setembro 2021] , pp. 930-938. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180237>. Epub 08 Apr 2019. ISSN 1678-4790..

C. M. Brandão, K. S. B. Cavalcante, R. de M. Teles, G. E. de C. Marques, O. S. Monteiro, E. H. A. Andrade, J. G. S. Maia, *Chem. Biodiversity* **2020**, *17*, e2000462.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada** – 6ª ed - M7-A6, 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada** – 6ª ed - M7-A6, 2013.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

De Melo, J. O., Bitencourt, T. A., Fachin, A. L., Cruz, E. M., de Jesus, H. C., Alves, P. B., de Fátima Arrigoni-Blank, M., de Castro Franca, S., Belebani, R. O., Fernandes, R. P., Blank, A. F., & Scher, R. (2013). Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta tropica*, 128(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.024>

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, v. 64, n.8, p. 711-713, 1998. Doi: 10.1055/s-2006-957563. PMID: 9933989.

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2745e2749.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Mauriello, G., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4863e4870

Dorman, H., Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88: 308–316. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x

GUIMARAES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO, C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, v. 11, n. 3, p. 185- 192, 2007.

ISAH, T. Stress and Defense Responses in Plant Secondary Metabolites Production. *Biological Research*, v. 52, n. 39, p. 52- 39, 2019.

GEDARA, S. R. Terpenoid content of the leaves of *Thymus algeriensis* Boiss. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 24, n. 2, p. 133-143, 2008.

HYLDGAARD, M., MYIND T., e MEYER, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the brazilian cerrado. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 707-713, jun. 2005.

La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F., & Mauriello, G. (2011). Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in microbiology*, 162(2), 164–172.

LACOSTE E.; CHAUMONT JP.; MANDIN D.; PLUMEL MM.; MATOS FJ. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. *Ann Pharm Fr.* 1996;54:228-30.

López de Dicastillo, C., Bustos, F., Valenzuela, X., López-Carballo, G., Vilariño, J. 786 M., & Galotto, M. J. (2017). Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. fruit and 787 leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase 788 inhibitory properties. *Food Research International*, 102, 119-128.

MAGI G.; MARINI E.; FACINELLI B.; Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*.

MENEZES, E.A.; MONTEIRO, M.N.R.; PARENTE, T.M.A, CUNHA, F.A., AUGUSTO, K.L, FREIRE, C.C.F. Frequency and enzymatic activity of *Candida albicans* isolated from the

oral cavity of HIV-positive patients at Fortaleza, Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, p. 253-256, 2006.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em 02/09/2021.

NAKANO, V. **Antimicrobianos Teste de Susceptibilidade**. Universidade de São Paulo – USP

NARDELI, J.V.; CARVALHO, C.T.; ARRUDA, E.J.; NOVA, P.V.; OLIVEIRA, L. S.; ARAKAKI, A. H. Síntese, Caracterização e Atividade Biológica do Acetato de Cu (II) para Larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e Bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Lysteria monocytogenes*. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 122–129, 2014

NEVES, L. A.; OLIVEIRA, J. C. S.; CAMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical Composition of the Leaf Oils of *Lippia gracilis* Schauer from two Localities of Pernambuco. *The Journal of essential oil research*, 2008, v. 20, n.2, p. 157-160.

NOSTRO, A.; PAPALIA T.. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 7, 28–35. doi: 10.2174/157489112799829684. (2012).

OLIVEIRA, L.B.S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online]. 2016, v. 18, n. 2 [Acessado 16 Setembro 2021], pp. 511-523. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_222>.

OLIVEIRA, L. de .; SALES, S. de S. Efeito inibitório e atividade antisséptica de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* L. e *Ocimum gratissimum* L contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de carcaça de ovinos. **Caderno de Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 11, p. 1–12, 2019. DOI: 10.35699/2447-6218.2019.15951. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/15951>. Acesso em: 6 out. 2021

PAVIA, D.L. et al. Introdução à espectroscopia, revisão técnica, Paulo Sergio Santos; tradução: Pedro Barros e Roberto Torrejon. 2 ed. – São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PAWAR, V.C.; THAKER, V.S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, v. 49, n.4, p. 316-23, 2006.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -TerpineneMediated Antinociception. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

PEREIRA DOS SANTOS, Clesivan *et al.* Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 79, p. 205-210, 19 nov. 2015. DOI 09266690. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0926669015305136?token=67FCAE111490B60DDCA3CA1732C845CEEB30C426A0F7270D1AC6B7B3FBB8D51D0B7D3A332B8AFE12A8D4EA5EF4435144&originRegion=us-east-1&originCreation=20211008210131>. Acesso em: 6 set. 2021.

PIARU, S. P. et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, n. 3, p. 593-597, 2012.

PINTO, E. P. P., AMOROZO, M. C. M., FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* [online]. 2006, v. 20, n. 4 [Acessado 05 setembro 2021], pp. 751-762. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000400001>>. Epub 20 Mar 2007. ISSN 1677-941X. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000400001>.

RAUT, J.S. e KARUPPAVIL, S.M. (2014) A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>

RIBEIRO, E. L., *et al.* *Candida albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down: Comportamento de tubos germinativos, exoenzimas e sensibilidade a toxinas “killer”. *Rev. Odonto Ciênc.*, Porto Alegre, v. 22, n. 57, 2007.

RIELLA, K.R; MARINHO, R.R; SANTOS, J.S; PEREIRA-FILHO *et al.* Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, [S. l.], v. 143, n. 2, p. 656-663, 28 set. 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.028>. Acesso em: 7 out. 2021.

SANTOS. P. C.; PINTO O. A. J, SANTOS. A. *C et al Harvest time and geographical origin affect the essential oil of Lippia gracilis Schauer*, *Industrial Crops and Products*, Vol. 79, 2016, Pages 205-210,ISSN 0926-6690

SANTOS *et al.* Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* "in vitro". *Summa Phytopathologica* [online]. 2014, v. 40, n. 3 [Acessado 05 Setembro 2021], pp. 277-280. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1958>. Epub 30 Out 2014. ISSN 1980-5454.

SARTO, MARCELLA PAULA MANSANO; ZANUSSO JUNIOR, GERSON. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, [S.l.], v. 20, n. 1, out. 2014. ISSN 2178-2571. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1559>. Acesso em: 04 out. 2021.

SILVA, Lenise L. *et al.* Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2010, v. 20, n. 5 [Acessado 6 setembro 2021], pp. 700-705. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000010>. Epub 27 Ago 2010. ISSN 1981-528X.

SILVA, M. A. S; PEREIRA, M. S; ANDRADE. E; CIGOLINI, C. A; MARQUES, M.O.M. Efeito da época de colheita sobre a produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. sob as condições do norte do Mato Grosso. In: Simpósio

Brasileiro de Óleos Essenciais, 4, 2007, Fortaleza. Resumos... Fortaleza: Instituto Agronômico de Campinas, 2007.

SIMONETTI, E. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Lajeado. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES. Lajeado, RS., 2015.

TAIZ, L. and ZEIGER, E. Plant physiology. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.2006

VALLE, G. C.; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. NewsLab., São Paulo, v.17, n.101, p. 202-222, 2010.

ZHANG, J. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Black Pepper Essential Oil on Meat-Borne *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, [Lausanne, Switzerland], vol. 7, p. 2094, jan. 2017.