

Inibição e inativação *in vitro* de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos

PASSOS, M.G.; CARVALHO, H.; WIEST, J.M.

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. * Correspondência: J.M.Wiest – ICTA/UFRGS, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91505-970, Porto Alegre – RS/Brasil. E-mail: jmwiest@ufrgs.br*

RESUMO: Através de testes de diluição em sistema de tubos múltiplos determinou-se a intensidade de atividade de inibição bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB/bactericida) de soluções conservantes contendo extratos etanólicos (alcooolatura/planta *in natura*, hidroalcooolatura/planta seca) e hídricas (decoctos /planta *in natura* ou seca) de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae (Lamiaceae), sobre inóculos padronizados de *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todas as diferentes formas de extração apresentaram capacidade de inibição e/ou inativação seletivas sobre os inóculos bacterianos, tendo o extrato alcóólico apresentado a atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes. A bactéria mais sensível à atividade antibacteriana em todas as soluções conservantes foi *Salmonella enteritidis*. *Staphylococcus aureus* apresentou a menor sensibilidade às formas de decoção, enquanto *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade frente ao extrato hidroalcoólico.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, atividade antibacteriana, inibição bacteriana, inativação bacteriana, extratos vegetais

ABSTRACT: *In vitro* inhibition and inactivation of different extraction methods in *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae (Lamiaceae) against foodborne bacteria of interest. Dilution tests in multiple tube system were used to evaluate the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasis) and bacterial inactivation activity (IINAB/bactericide) of conserver solutions containing ethanolic (alcoholature/*in natura* plant, hidroalcoholature/dry plant) and aqueous (decoctions/*in natura* or dry plant) extracts of *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae - (Lamiaceae) on standardized inocula of *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). All the different extraction methods presented selective inhibition and/or inactivation on the bacterial inocula. The alcoholic extract had the highest antibacterial activity (inhibition/inactivation) against the three agents. *Salmonella enteritidis* was the most sensitive to the antibacterial activity in all conserver solutions. *Staphylococcus aureus* showed the lowest sensitivity to decoctions, whereas *Escherichia coli* was the least sensitive to the hydroalcoholic extraction.

Key words: *Ocimum gratissimum*, antibacterial activity, bacterial inhibition, bacterial inactivation, plant extracts

INTRODUÇÃO

Os recursos naturais renováveis representados pelas plantas medicinais, condimentares e aromáticas, participam do cotidiano das ações de saúde e de

alimentação, através de seus inúmeros princípios ativos e biocomplexos extraídos de diferentes modos e processos incluindo os decoctos, os infusos, os

Recebido para publicação em 21/01/2008
Aceito para publicação em 19/05/2008

macerados, as tinturas, as alcoolaturas, envolvendo diferentes solventes, permitindo o estudo dos extratos na condição de droga crua ou purificada, partindo-se de plantas *in natura* ou verdes ou plantas desidratadas, entre outros processos (Sullivan, 1997).

O gênero *Ocimum* pertence à família *Labiatae* (*Lamiaceae*), abrangendo trinta espécies que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. *Ocimum gratissimum* L. é uma planta que possui aroma forte e agradável, popularmente chamado de “alfavacão”, “alfavaca” ou “alfavaca-cravo”, com origem no oriente, subespontâneo em todo o Brasil e do qual existem diversos quimiotipos. Várias espécies de *Ocimum* são plantas classicamente fornecedoras de óleos essenciais, largamente utilizados como temperos de pratos especiais e como aromatizantes de licores e de perfumes finos (Lorenzi & Matos, 2002).

Medicinalmente, *Ocimum gratissimum* é utilizado frente a várias doenças tais como: leishmanioses, infecções do trato respiratório superior, diarreia/antidiurese, desordem gastrointestinal, febre tifóide, dor de cabeça, doenças de pele e oftalmológicas, sendo muito comum na medicina caseira o uso de seu chá como carminativo, sudorífico e diurético. A planta apresenta inúmeros compostos, sendo o eugenol o composto majoritário (Ueda-Nakamura et al., 2006; Sartoratto et al., 2004; Lorenzi & Matos, 2002; Ilori et al., 1996).

A utilização de óleos essenciais de plantas como redutor de microrganismos patogênicos para a conservação de alimentos vem crescendo devido ao interesse em substituir compostos químicos sintéticos por substâncias naturais. Estes compostos podem ser responsáveis por atributos carcinogênicos, teratogênicos e também apresentar toxicidade residual (Moreira et al., 2005). Outro fator relevante para a busca por conservantes naturais é que muitos microrganismos patogênicos adquirem resistência aos antibióticos, havendo a necessidade de serem substituídos por produtos de origem natural (Sartoratto et al., 2004). Estudos vêm sendo realizados para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica de plantas medicinais (Chah et al., 2006; Faria et al., 2006). *Ocimum gratissimum*, por sua vez, apresenta esta propriedade conservante devido às substâncias encontradas em seu óleo essencial tais como: cimen-8-ol, eugenol e trans-cariofileno, entre outras (Sartoratto et al., 2004; Nguéfack, 2004; Nakamura et al., 1999; Ilori et al., 1996). Orafidiya et al., (2002) descrevem atividade antibacteriana em formulações com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* utilizadas como antissépticas no tratamento de feridas ou lesões com solução de continuidade. Oussou et al., (2004)

testaram óleo essencial do gênero *Ocimum*, entre estes *O. gratissimum*, frente a 14 bactérias diferentes originárias da Costa do Marfim demonstrando atividade bacteriostática e bactericida relevantes nesta planta.

Eugenol é o composto químico em maior percentual no óleo essencial da planta *Ocimum gratissimum*, podendo este valor variar em função da técnica de extração e do acesso. Este composto apresenta uma série de atributos farmacológicos tais como: agente aromático para alimentos, anticonvulsivo, anestésico, analgésico dentário, antibactericida e fungicida (Ueda-Nakamura, 2006; Sartoratto et al., 2004; Lorenzi & Matos; 2002).

Este trabalho tem como objetivo determinar *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos (alcoolatura/planta verde e hidroalcoolatura /planta seca, com evaporação do etanol em sistema rota-vapor com reconstituição hídrica posterior sob condições de assepsia) e extratos hídricos (decocto de planta verde e seca, idem quanto à reconstituição) de um acesso de *Ocimum gratissimum*, constituído de um “pool” de exemplares subespontâneos, originários do Município de Eldorado do Sul/RS, frente a agentes bacterianos padrões internacionais de interesse em alimentos, respectivamente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076), atividade esta expressa como IINIB (Intensidade de Inativação Bacteriana/bacteriostasia) e como IINAB (intensidade de Inativação Bacteriana/bactericida), relacionando-a, outrossim, como tempo de confrontação bactérias *versus* diferentes extratos. Em síntese, manipulam-se as variáveis: bactérias, os diferentes tipos de extração, os tempos de confrontação e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, permanecendo constante em 50% a concentração final de uso dos diferentes extratos nas denominadas soluções conservantes.

MATERIAL E MÉTODO

A planta *Ocimum gratissimum* foi colhida em propriedade agroecológica familiar em Parque Eldorado, Município de Eldorado do Sul, região metropolitana de Porto Alegre, RS/Brasil, Depressão Central (coordenadas de 30° 05' S e 51° 40' W), constituindo um “pool” de partes vegetativas e reprodutivas de exemplares subespontâneos, ruderais. Segundo a escala ACFOR de Kent & Coker (1992), nesta propriedade *Ocimum gratissimum* se classificou na categoria de “frequente”. Aplicando a escala de sociabilidade de Braun-Blanquet (1979) a planta se apresentava em pequenos grumos ou tufos de indivíduos não cultivados.

O material foi herborizado segundo Ming (1996) e catalogado pela bióloga Sílvia Marodin (CRBio/RS n.17268), sendo a duplicata botânica

incorporada ao Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo número de registro 150160.

Talos, folhas e flores da planta foram submetidos aos processos de extração alcoólica (alcoholatura/planta *in natura*), extração hidroalcoólica (hidroalcoholatura/planta seca) e decocção (planta seca e *in natura*) para obtenção das soluções conservantes ou antibacterianas, segundo Farmacopéia (1959). As amostras vegetais recém colhidas foram trituradas grosseiramente e colocadas em álcool etílico, de cereais (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR) a 96°GL, na proporção de 400 g de planta para 1000 mL de álcool, na extração alcoólica. O extrato hidroalcoólico foi elaborado a partir de planta seca, colocado em álcool etílico, de cereais, a 70°GL, na proporção de 100 g de planta para 1000 mL de álcool. Após um período de quinze dias, ambos os extratos foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais da planta.

O decocto de planta seca foi preparado a partir da planta desidratada na proporção de 100 g de planta para 1000 mL de água destilada estéril, mantido sob fervura durante 20 minutos em aquecedor com refluxo repondo-se o volume inicial. Já o decocto de planta *in natura* foi realizado no momento da chegada da planta ao Laboratório de Higiene, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo realizado na proporção de 400 g da planta para 1000 mL de água destilada estéril. Para viabilizar a extração hidroalcoólica e o decocto de planta seca, parte da planta foi pesada e colocada em estufa com circulação de ar forçada e temperatura constante de 40°C, procedendo-se varias pesagens até a estabilização de seu peso. Para o controle permanente da assepsia destes procedimentos de extração e reconstituição, determinou-se a esterilidade de todos as soluções conservantes ou antibacterianas, retirando-se alíquota de 5 mL, semeada em tubos de Caldo BHI (Brain Hearth Infusion, ACUMEDIA, USA), incubados aeróbiamente à 37°C por até 48 horas, confirmando-se por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA, USA).

Foram utilizadas amostras de inóculos padrões American Culture Colletion (ATCC), para a avaliação da atividade antibacteriana (IINIB/bacteriostasia e IINAB/bactericidia) dos diferentes extratos de plantas tendo sido estas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia*

coli (ATCC 11229) e *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), provenientes da coleção-bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do ICTA/UFRGS. Os inóculos foram reativados em meio de cultura BHI à 37°C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para confrontação com os diferentes extratos de *O. gratissimum*, através de diluições seriais logarítmicas (Avancini, 2002). A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica da microgota segundo Romeiro (2007) e a contagem de microrganismos viáveis foi concretizada em placas de Petri contendo meio de cultura PCA (Plate Count Agar, HIMEDIA, Índia).

As diluições seriadas foram realizadas a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1 mL deste para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (BIOBRÁS, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil) para obter a diluição 10⁻¹, e assim sucessivamente até a diluição 10⁻¹². De cada diluição foram transferidas três gotas para placas de Petri utilizando micropipetas de 15 µL e a leitura realizada em 24 horas de incubação aeróbia à 37°C. O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de *Ocimum gratissimum*, lida como intensidade de atividade de inibição bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e intensidade de atividade de inativação bacteriana/bactericidia (IINAB), utilizou-se o teste de diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1981), com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini (2002), confrontando-se os quatro diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas (10⁻¹ a 10⁻¹² UFC mL⁻¹) dos diferentes inóculos bacterianos.

Entende-se por IINIB/bacteriostasia, o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, e por IINAB/bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescidos ao BHI (DVG, 1981; Andrade & Macedo, 1996; Reybrouck, 1979, 1998). Estes valores são, segundo Avancini (2002), representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre os microrganismos.

Os resultados de intensidade de atividade de inibição bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e intensidade de atividade de inativação bacteriana/bactericidia (IINAB) foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a

0, sendo que o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, como demonstra a Tabela 1 a seguir.

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) das diferentes soluções

conservantes extraídas de *Ocimum gratissimum* foram tratados através do programa de análises estatísticas Sisvar 5.0 (2007). Os resultados foram avaliados através da Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey.

TABELA 1. Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	n.a	UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	n.a	UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana; UFC.mL⁻¹: unidades formadoras de colônias por mL.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antibacteriana das quatro formas de extração de *Ocimum gratissimum* à 50%, independentes dos fatores tempo de confrontação, espécie bacteriana e presença ou ausência de desinibidores bacterianos, encontram-se na Tabela 2.

Quando avaliada a sensibilidade das três espécies bacterianas frente a soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independentemente das demais variáveis manipuladas, houve diferença significativa entre as bactérias, como mostra a Tabela 3. A bactéria que apresentou maior sensibilidade à

atividade antibacteriana foi *Salmonella enteritidis*, superior às demais, seguida de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Quando avaliados os dois tratamentos com desinibidores/bactericidia (IINAB) e sem desinibidores/bacteriostasia (IINIB), independentemente das demais variáveis manipuladas, observou-se diferenças significativas como mostra a Tabela 4. O tratamento IINIB (bacteriostasia/inibição pela ausência de desinibidores) apresenta resultado superior ao de IINAB (bactericidia/inativação pela presença de desinibidores), ou seja, a ação bacteriostática das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* é

TABELA 2. Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana /bacteriostasia (IINIB) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos à 50% de *Ocimum gratissimum* - Labiatae (Lamiaceae) - segundo diferentes tempos de exposição e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, observados em triplicata.

Tipo de Extrato	Tempos (h)	<i>Staphylococcus aureus</i>						<i>Salmonella enteritidis</i>						<i>Escherichia coli</i>					
		IINIB		IINAB		IINIB		IINAB		IINIB		IINAB		IINIB		IINAB			
Alcoolatura	24	3	3	3	2	2	2	11	11	11	8	8	8	11	11	11	4	4	4
	48	3	3	3	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
	72	2	2	2	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
	144	1	1	1	2	2	2	12	12	12	8	8	8	12	12	12	2	2	2
Hidroalcoholatura	24	2	2	2	0	0	0	6	6	6	0	0	0	3	3	3	0	0	0
	48	2	2	2	0	0	0	8	8	8	0	0	0	2	2	2	0	0	0
	72	2	2	2	0	0	0	8	8	8	0	0	0	2	2	2	0	0	0
	144	3	3	3	0	0	0	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocto Verde	24	0	0	0	0	0	0	4	4	4	1	1	1	3	3	3	1	1	1
	48	0	0	0	0	0	0	4	4	4	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	72	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	144	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocto Seco	24	2	2	2	0	0	0	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	48	1	1	1	0	0	0	3	3	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0	0	0
	144	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0

TABELA 3. Avaliação da sensibilidade de três espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Espécies bacterianas	Número Arbitrário
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,91 ^{a*}
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	2,34 ^b
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 11076)	4,50 ^c

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

TABELA 4. Avaliação da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, tipo de extração e espécie bacteriana.

Tratamentos com presença ou ausência de desinibidores	Número Arbitrário
IINAB / bactericida (presença dos desinibidores bacterianos)	1,31 ^a
IINIB / bacteriostasia (ausência de desinibidores bacterianos)	3,85 ^b

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

superior a ação bactericida. Souza (2005), Girolometto (2005) e Carvalho et al. (2005) testando outras plantas e aplicando a mesma metodologia também obtiveram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

A Tabela 5 avalia a atividade antibacteriana dos extratos de *Ocimum gratissimum* obtidos a partir de diferentes tipos de extração sobre as principais bactérias causadoras de toxinfecções alimentares. Dentre estas *Staphylococcus aureus* apresentou diferença significativa em todos os tipos de extração. Sendo o extrato alcoólico aquele que apresenta maior ação sobre *Staphylococcus aureus*, seguido da forma hidroalcoólica e da decoção de planta seca, sendo que a atividade antiestafilocócica do extrato obtido através da decoção de planta *in natura* foi nula. A atividade antibacteriana de *O. gratissimum* sobre *Salmonella enteritidis* apresenta diferença significativa entre

todos os tipos de extração, sendo que a atividade mais intensa foi observada no extrato alcoólico. Já as atividades dos extratos obtidos por hidroalcoólatura e decoção de planta seca sobre *Escherichia coli* não apresentam diferença significativa. Observa-se, novamente, maior ação anti-*Escherichia coli* no extrato obtido por alcoólatura.

Quando avaliadas os quatro métodos de extração (Tabela 5), independentemente das demais variáveis manipuladas, estas diferiram significativamente entre si. A extração alcoólica apresenta valor superior aos demais tipos de extração, seguido pela hidroalcoólatura, pelo decocto de planta seca e pelo decocto de planta *in natura*. Souza (2005) e Girolometto (2005), embora testando outras plantas, com a mesma metodologia, também obtiveram resultados superiores para a forma de extração alcoólica e inferiores para os decoctos. Uma hipótese

TABELA 5. Avaliação da relação entre as espécies bacterianas de interesse em alimentos e os diferentes tipos de extração de *Ocimum gratissimum*, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

Tipos de Extração	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Decocto com planta verde	0,00 ^{aA}	2,00 ^{aB}	0,75 ^{aC}
Decocto com planta seca	0,38 ^{bA}	2,50 ^{bB}	0,63 ^{abB}
Hidroalcoólatura (planta seca)	1,13 ^{cA}	3,63 ^{cB}	0,88 ^{bc}
Alcoólatura (planta verde)	2,13 ^{dA}	9,88 ^{dB}	7,13 ^{ac}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de extração e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

para estas diferenças pode estar relacionada à perda de componentes como óleos essenciais, mais especificamente o eugenol, cimen-8-ol e trans-cariofileno, nas extrações por decocção, quando se utilizam temperaturas mais elevadas (ebulição), em comparação com a hidroalcoólatura e alcoólatura.

Quando avaliada a ação antibacteriana individualmente, relacionada a cada método de extração, sobre as três diferentes bactérias, houve diferença significativa em todos os tipos de extração. *Salmonella enteritidis* apresenta a maior sensibilidade antibacteriana em relação a todos os tipos de extração. *Staphylococcus aureus* apresenta a menor sensibilidade à extração alcoólica, à decocção da planta verde e da planta seca. Já na forma de extração hidroalcoólica, a menor sensibilidade antibacteriana é demonstrada por *Escherichia coli*.

Em números absolutos, os três maiores valores de sensibilidade antibacteriana são encontrados, em ordem decrescente, nas formas de extração alcoólica atuando sobre a *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*, bem como na forma de extração hidroalcoólica atuando sobre a *Salmonella*

enteritidis, embora menor.

A Tabela 6 avalia a presença ou ausência de desinibidores atuando sobre as diferentes bactérias. Os resultados apresentam uma maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor) frente a *Salmonella enteritidis*, seguida da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. Já a maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada frente a *Salmonella enteritidis*, seguida de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. Nos resultados obtidos destaca-se, novamente, como na Tabela 4, que a ação bacteriostática foi maior que a bactericida (IINIB > IINAB).

Outros autores descrevem atividade bactericida usando a planta *Ocimum gratissimum* sobre as mesmas três bactérias, porém com outras técnicas de avaliação de sensibilidade antimicrobiana. Sartorato et al. (2004) e Nguetack et al. (2004) observaram atividade bactericida frente *Staphylococcus aureus*. Por sua vez, Nakamura et al. (1999) também descreveram atividade bactericida significativa sobre

TABELA 6. Avaliação da relação entre a sensibilidade das espécies bacterianas de interesse em alimentos e as soluções conservantes de *Ocimum gratissimum*, na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e tipo de extração.

Bactérias	Tratamentos com presença ou ausência de desinibidores	
	IINAB	IINIB
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50 ^{aA}	1,31 ^{aB}
<i>Escherichia coli</i>	0,81 ^{bA}	3,88 ^{bB}
<i>Salmonella enteritidis</i>	2,63 ^{cA}	6,38 ^{cD}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos com presença e ausência de desinibidor bacteriano, para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Staphylococcus aureus, porém menor frente a *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

A Tabela 7 avalia os tipos de tratamento com e sem desinibidor, mostrando a atuação destes (IINIB/ bacteriostasia e IINAB/bactericida) relacionando-os às diferentes formas de extração, independentemente dos demais fatores. Os resultados mostraram que a forma de extração alcoólica produz extratos de *Ocimum gratissimum* com maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor), enquanto que o extrato obtido por hidroalcoólatura apresenta atividade nula, sendo que todos os valores são diferentes significativamente entre si. A maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada também na forma de extração alcoólica, seguida da hidroalcoólica, da decocção de planta seca e da decocção de planta *in natura*, sendo que todos os valores foram diferentes significativamente entre si.

Quando avaliadas individualmente para cada tipo de extrato, as atividades bactericida (IINAB, com desinibidor) e bacteriostática (IINIB, sem desinibidor), apresentam sempre diferenças significativas.

Em síntese, todos os extratos de *Ocimum gratissimum* originados das diferentes tipos de extração, apresentam capacidade de inibição e/ou inativação seletivas *in vitro* sobre os três inóculos bacterianos de interesse em alimentos estudados, tendo a forma de extração alcoólica (etanol evaporado em sistema de rota-vapor com reconstituição hídrica sob assepsia) apresentado atividade antibacteriana mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes. A bactéria mais sensível à atividade antibacteriana de todos os extratos é *Salmonella Enteritidis*. *Staphylococcus aureus* apresenta a menor sensibilidade às formas de decocção, enquanto que *Escherichia coli* apresenta menor sensibilidade ao

TABELA 7. Avaliação da relação entre as diferentes formas de extração das soluções conservantes de *Ocimum gratissimum* na presença ou ausência de desinibidores bacterianos, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos.

Tipos de Extração	Tratamento com presença ou ausência de desinibidores	
	IINAB	IINIB
Decocto com planta verde	0,42 ^{bA*}	1,42 ^{aB*}
Decocto com planta seca	0,67 ^{cA}	1,67 ^{bB}
Hidroalcooolatura (planta seca)	0,00 ^{eA}	3,75 ^{cB}
Alcooolatura (planta verde)	4,17 ^{dA}	8,58 ^{dB}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as diferentes formas de extração e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos com presença e ausência de desinibidor bacteriano para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

extrato de *Ocimum gratissimum* obtido por extração hidroalcoólica. Os resultados *in vitro* sugerem a perspectiva da continuidade de estudos objetivando a aplicação de diferentes métodos de obtenção de extrato de *Ocimum gratissimum*, tanto para serem utilizados como solução conservante como condimentos alimentares, com perspectiva de qualidade, segurança e sensorialidade alimentar.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento continuados.

REFERÊNCIA

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela. 1996. 182p.
 AVANCINI, C.A.M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. Hypericaceae (Guttiferae) - ("escadinha"/"sinapismo") para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
 BRAUN-BLANQUET, J. **Fitossociologia: bases para el estudio de las comunidades vegetales**. 1.ed. Madrid: Ed. M. Blume Ediciones, 1979. 820p.
 CHAH, K.F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.164-7, 2006.
 CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistik (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-4.
 CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.
 DVG-Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel

fur die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária). In: SCHLISSER, T.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. p.47-55.

FARIA, T.J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.6, p.867-71, 2006.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 532p.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. ("erva mate") frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ILORI, M.O. et al. Antidiarrhoeal activities of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Journal Of Diarrhoeal Diseases Research**, v.14, p.283-5, 1996.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach**. London: Blackwell, 1992. 363p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da UNESP, 1996. p.69-86.

MOREIRA, M.R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v.38, p.565-70, 2005.

NAKAMURA, C.V. et al. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 9, n.5, p.675-78, 1999.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.329-34, 2004.

ORAFIDIYA, A.O. et al. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, n.1, p.16-21, 2002.

OUSSOU, K.R. et al. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. **Chimie**, v.7, p.1081-6, 2004.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene. Abteilung I. Originale B**, v.68, p.480-92, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.269-72, 1998.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Disciplina FIP-640. Bactérias Fitopatogênicas. Roteiro das aulas práticas. Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-80, 2004.

SISVAR 5.0. **Softwares Downloads**. Disponível em <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>>. Acesso em: 23 set. 2007.

SOUZA, A.A. **Aspectos etnobiológicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. - Verbenaceae - (“garupa”, “erva santa”) sobre agentes de importância em saúde e produção animal**. 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SULLIVAN, K. **The complete family guide to natural home remedies**. Boston: ELEMENT, 1997. 256p.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v.55, p.99-105, 2006.