



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ARIANA AZEVEDO VASCONCELOS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO**  
**DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE *Ruellia asperula* (Mart. ex Ness) Lindau e *Ruellia***  
***paniculata* L. (ACANTHACEAE)**

**SOBRAL**

**2014**

ARIANA AZEVEDO VASCONCELOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE *Ruellia asperula* (Mart. ex Ness) Lindau e *Ruellia  
paniculata* L. (ACANTHACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.  
Coorientador (a): Prof. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

SOBRAL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

---

V45c Vasconcelos, Ariana Azevedo.  
Composição química e avaliação do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* (mart. ex ness) e *Ruellia paniculata* L. (acanthaceae). / Ariana Azevedo Vasconcelos. – 2014.  
88 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.

Área de Concentração: Microbiologia.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

1. Antimicrobianos 2. Acanthaceae. 3. Óleos essenciais I. Título.

ARIANA AZEVEDO VASCONCELOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE *Ruellia asperula* (Mart. ex Ness) Lindau e *Ruellia  
paniculata* L. (ACANTHACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.  
Coorientador (a): Prof. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque (coorientadora)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, meu refúgio e fortaleza.

Aos meus pais, razão dos meus esforços e da  
minha vontade de vencer.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por renovar minha fé a cada dia e fazer-me perseverar mesmo quando os obstáculos pareciam-me intransponíveis.

À minha família, em especial meus pais Rogério e Deleide, pelo amor, apoio e por tudo o que sou.

À minha amada sobrinha Clarinha, pelo carinho e amizade sinceros. A titia te ama!

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, que me acolheu tão bem em seu grupo de pesquisa, aceitando contribuir para meu aprendizado. Agradeço pela orientação, dedicação e paciência.

À minha coorientadora, amiga e “mãe científica” Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque, um verdadeiro exemplo de profissional, dedicada, competente e humilde que terei como espelho profissional por toda a vida. Agradeço pelos ensinamentos, apoio, amizade, confiança, paciência e por todas as oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos, por aceitar compor a banca examinadora, por suas sugestões, correções e valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Elnatan Bezerra de Sousa do Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, pelo auxílio na coleta e identificação das espécies vegetais. Além da amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Victor Alves Carneiro, pela amizade e principalmente pelas dicas e ensinamentos compartilhados.

Ao Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda, pelo agradável convívio e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar.

Às minhas amigas Idia Nara e Simone Torres pela parceria, incentivo, ensinamentos, por terem aguentado pacientemente meus estresses e acima de tudo pela grande ajuda na execução deste trabalho, minha gratidão e minha amizade são eternas.

Aos meus amigos, em especial Lidiane Linhares, Kariane Souza, Ricardo Braga, Evelyne Marques e Jardel Rodrigues, agradeço a amizade, carinho, apoio e o incentivo que sempre me deram em todos os momentos.

À minha amiga Érica Rabelo, pelo agradável convívio e pela ajuda ao longo da caminhada no mestrado. Sempre me mostrando que podemos realizar muito mais do que imaginamos.

Aos meus irmãos e contemporâneos do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú: Fábio Ávila, Willian Paulo, Gilvânia Cavalcante, Adriano Rodrigues, Léo Rugieri e Elaine de Fátima, pela a agradável convivência nos tempos de Iniciação científica, amizade, ensinamentos e boas energias que sempre me transmitiram.

Aos meus colegas do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), pelo companheirismo e pelos momentos de descontração proporcionados.

À minha turma do mestrado: Débora, Raulzito, Thales, Thiago, Francisco, Sérgio, Tânia, Taiã, Kátia, Simone e Idia. Pelos momentos compartilhados de estudos, de dificuldades e de alegrias.

À Universidade Federal do Ceará, em especial a Faculdade de Medicina *Campus* Sobral e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por terem me fornecido condições acadêmicas para a execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro a este projeto, tanto na forma de bolsa auxílio, como na aquisição de equipamentos e materiais necessários à sua conclusão.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, deixo aqui consignados sinceros agradecimentos.

“Os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.”

(Isaías 40:31)

## RESUMO

O gênero *Ruellia* L., compreende aproximadamente 300 espécies, as quais estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Dentre as espécies que compõem o gênero, estão *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, conhecidas popularmente como “Melosa” e “Melosa-roxa”. Pesquisas fitoquímicas e de atividade antimicrobiana sobre as espécies pertencentes ao gênero *Ruellia* são escassas, entretanto a literatura revela que algumas dessas espécies são largamente empregadas na medicina popular. Assim, o presente trabalho buscou descrever a composição química e avaliar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais das partes aéreas de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, tanto na forma planctônica como na de biofilmes. Os óleos essenciais foram obtidos e seus constituintes analisados por cromatografia de gás e espectrometria de massa (CG/MS). Diferentes metodologias foram empregadas para a verificação do potencial antimicrobiano. Dentre estas estão a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), determinação da curva de morte e avaliação da concentração bactericida mínima (CBM). Além disso, a quantificação da biomassa e do número de células viáveis do biofilme foram realizadas, respectivamente, através da coloração pelo cristal violeta e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os controles negativo e positivo utilizados em todos os ensaios foram, respectivamente, DMSO 4% e Gluconato de Clorexidina com concentração ajustada de acordo com os dados da CIM de cada micro-organismo. Os principais constituintes do óleo de *R. asperula* foram cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol (14,1%), (E)-cariofileno (22,7%) e óxido de cariofileno (29,4%), enquanto (E)-cariofileno (11,0%), espatulenol (13,1%) e  $\delta$ -amorfeno (14,9%), foram os constituintes majoritários do óleo de *R. paniculata*. Os dados mostraram que os óleos testados exerceram melhores resultados sobre as linhagens de bactérias Gram-positivas, e que o óleo essencial de *R. paniculata* apresentou o melhor efeito sendo capaz de inibir o crescimento planctônico, bem como o desenvolvimento de biofilmes da cepa de *S. oralis*. Assim, os óleos essenciais de *R. asperula* e *R. paniculata* surgem como importantes alternativas para o controle bacteriano.

**Palavras-chave:** Bactérias, ação antibacteriana, óleos essenciais, *Ruellia asperula*, *Ruellia paniculata*.

## ABSTRACT

The genus *Ruellia* L. comprises about 300 species, which are broadly distributed in tropical and subtropical regions of the planet. Among the species that comprise the genus, are *Ruellia asperula* and *Ruellia paniculata*, known popularly as "Melosa" and "Melosa-purple". Phytochemical research and antimicrobial activity against species belonging to the genus *Ruellia* are scarce, however the literature reveals that some of these species are widely used in folk medicine. Thus, this study sought to describe the chemical composition and evaluate the antibacterial effect of essential oils from aerial parts of *Ruellia asperula* and *Ruellia paniculata*, on the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, both in planktonic form as in biofilms. The essential oils were obtained and their constituents analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC / MS). Different methodologies were used to check the antimicrobial potential. Among these are the minimum inhibitory concentration (MIC) determination of the death curve and evaluation of minimum bactericidal concentration (MBC). Furthermore, quantification of biomass and the number of viable cells in the biofilm were conducted, respectively, by staining with crystal violet and counting of colony forming units (CFU). The negative and positive controls used in all tests were, respectively, 4% DMSO and chlorhexidine gluconate adjusted according to the concentration data from the MIC of each micro-organism. The main constituents of the oil *R. asperula* were caryophylla-4 (12)-8-(13)-dien-5 $\beta$ -ol (14.1%), (E)-caryophyllene (22.7%) and caryophyllene oxide (29.4%) as (E)-caryophyllene (11.0%), spathulenol (13.1%) and  $\delta$ -amorphenone (14.9%) were the major constituents of oil *R. paniculata*. The data showed that the tested oils have had best results on the strains of Gram-positive bacteria, the essential oil of *R. paniculata* showed the best effect being able to inhibit planktonic growth, and the development of biofilms of *S. oralis* strain. Thus, the essential oils and *R. asperula* and *R. paniculata* emerge as important alternatives to control bacterial.

**Keywords:** bacteria, antibacterial action, essential oils, *Ruellia asperula*, *Ruellia paniculata*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Ruellia asperula</i> encontrada na região da Meruoca – Ceará, Brasil.....	27
Figura 2 -	<i>Ruellia panicullata</i> encontrada na região da Meruoca – Ceará, Brasil.....	28
Figura 3 -	Esquema dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes.....	32
Figura 4 -	Fatores envolvidos na ocorrência de Infecções nosocomiais.....	34
Figura 5 -	Fatores etiológicos primários da cárie dentária.....	36
Figura 6 -	Aspecto da cárie dentária em um estágio grave.....	37
Figura 7 -	Diagrama dos fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie dentária.....	37
Figura 8 -	Média do CEO/CPO e respectivos componentes, segundo o grupo etário.....	38
Figura 9 -	Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais das partes aéreas de <i>R. asperula</i> (OERA) e <i>R. paniculata</i> (OERP).....	51
Figura 10 -	Curva de morte de <i>S. sobrinus</i> após exposição ao OERA por diferentes intervalos de tempo.....	56
Figura 11 -	Curva de morte de <i>S.oralis</i> (A) e <i>S. sobrinus</i> (B) após exposição ao OERP por diferentes intervalos de tempo.....	56
Figura 12 -	Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do OERA sobre a formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>S. oralis</i> ATCC 10557, <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903, <i>S. salivarius</i> ATCC 7073, <i>S. sobrinus</i> ATCC 6715, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 e <i>K. oxytoca</i> ATCC 13182.....	58
Figura 13 -	Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do OERP sobre a formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>S. oralis</i> ATCC 10557, <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903, <i>S. salivarius</i> ATCC 7073, <i>S. sobrinus</i> ATCC 6715, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 e <i>K. oxytoca</i> ATCC 13182.....	59

Figura 14 -	Contagem das UFCs de <i>S. mutans</i> (A), <i>S. sobrinus</i> (B), <i>S.oralis</i> (C) e <i>P. aeruginosa</i> (D) quando em contato com OERA em diferentes concentrações.....	61
Figura 15 -	Contagem das UFCs de <i>S. mutans</i> (A), <i>S. sobrinus</i> (B), <i>S.oralis</i> (C) e <i>P. aeruginosa</i> (D) quando em contato com OERP em diferentes concentrações.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Infecções humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.....	33
Tabela 2 - Micro-organismos envolvidos na maioria das infecções nosocomiais e sítios comuns de isolamento do patógeno.....	35
Tabela 3 - Constituintes químicos identificados dos óleos essenciais das partes aéreas de <i>R. asperula</i> (OERA) e <i>R. paniculata</i> (OERP).....	50
Tabela 4 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos micro-organismos testados frente ao OERA e Clorexidina (CHX).....	53
Tabela 5 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos micro-organismos testados frente ao OERP e Clorexidina(CHX).....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEO-D	Índice de Dentes Decíduos Cariados, com Indicação de Extração
CG/EM	Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPO-D	Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
CHX	Clorexidina
Des-re	Processo de desmineralização/remineralização
DMSO	Dimetilulfóxido
DNAe	Ácido Desoxiribonucleico extracelular
DO	Densidade Óptica
EPS	Substância polimérica extracelular
g	Gramas
Gtfs	Glicosiltransferases
LPS	Lipopolissacarídeo
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
OE	Óleo essencial

OERA	Óleo essencial <i>Ruellia asperula</i>
OERP	Óleo essencial <i>Ruellia paniculata</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A.	Para análise
UFC	Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

$\delta$  Delta

$\mu$  Micro

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1	INTRODUÇÃO.....	19
---	-----------------	----

### CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA – PRODUTOS NATURAIS

2	PRODUTOS NATURAIS.....	22
2.1	Plantas Medicinais.....	22
2.2	Ação antimicrobiana de plantas medicinais.....	23
2.3	Óleos essenciais.....	24
2.4	Considerações sobre a planta em estudo.....	25
2.4.1	<i>Acanthaceae</i> .....	25
2.4.2	<i>Ruellia</i> .....	26
2.4.3	<i>Ruellia asperula (Mart. ex Ness)Lindau</i> .....	27
2.4.4	<i>Ruellia paniculata L.</i> .....	28

### CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA – BIOFILMES E DOENÇAS

3	BIOFILMES.....	30
3.1	O Biofilme Bacteriano.....	30
3.2	Formação de Biofilmes.....	31
3.3	Biofilmes e doenças.....	32
3.3.1	<i>Infecções nosocomiais</i> .....	33
3.3.2	<i>Cárie dentária</i> .....	36

### CAPÍTULO 4– OBJETIVOS

4	OBJETIVOS.....	41
4.1	Objetivo geral.....	41
4.2	Objetivos específicos.....	41

### CAPÍTULO 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5.1	Material Vegetal.....	43
5.2	Extração e identificação dos óleos essenciais.....	43
5.3	Micro-organismos.....	43
5.4	Condições de cultivo.....	44
5.5	Preparação das substâncias-teste.....	44
5.6	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	44

5.7	Ensaio de atividade antibiofilme.....	45
5.7.1	<i>Quantificação de biomassa</i> .....	45
5.7.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i> .....	46
5.8	Curva do tempo de morte.....	46
5.9	Análise estatística .....	47
<b>CAPÍTULO 6– RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
6.1	Identificação da composição química dos óleos essenciais de <i>Ruellia asperula</i> e <i>Ruellia paniculata</i> .....	49
6.2	Atividade antimicrobiana.....	52
6.2.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) E Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i> .....	52
6.2.2	<i>Curva de tempo de morte</i> .....	55
6.2.3	<i>Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta(CV)</i> .....	57
6.2.4	<i>Enumeração das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i> .....	61
<b>CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES</b>		
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
	<b>ANEXO A- CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE <i>Ruellia asperula</i></b> .....	82
	<b>ANEXO B- CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE <i>Ruellia paniculata</i></b> .....	82
	<b>ANEXO C- ESPECTRO DE MASSA DO ISOVALERATO DE HEXENILA</b> .....	83
	<b>ANEXO D - ESPECTRO DE MASSA DO ACETATO DE ISOBORNILA</b> .....	83
	<b>ANEXO E- ESPECTRO DE MASSA DO <math>\alpha</math>-COPAENO</b> .....	83
	<b>ANEXO F - ESPECTRO DE MASSA DO <math>\beta</math>-BOURBONEO</b> .....	84
	<b>ANEXO G- ESPECTRO DE MASSA DO E-CARIOFILENO</b> .....	84
	<b>ANEXO H- ESPECTRO DE MASSA DO E-BERGAMOTENO</b> .....	84
	<b>ANEXO I - ESPECTRO DE MASSA DO ALLO-AROMADENDRENO</b> .....	85
	<b>ANEXO J - ESPECTRO DE MASSA DO CURCUMENO</b> .....	85
	<b>ANEXO K - ESPECTRO DE MASSA DO GERMACRENO-D</b> .....	85

<b>ANEXO L- ESPECTRO DE MASSA DO <math>\delta</math>-AMORFENO.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO M- ESPECTRO DE MASSA DO E-NEROLIDOL.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO N- ESPECTRO DE MASSA DO ESPATULENOL.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO O- ESPECTRO DE MASSA DO ÓXIDO DE CARIOFILENO.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO P- ESPECTRO DE MASSA DO CARIOFILA-4(12),8(13)- DIEN-5<math>\alpha</math>-OL.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO Q- ESPECTRO DE MASSA DO CARIOFILA-4(12),8(13)- DIEN-5<math>\beta</math>-OL.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO R- ESPECTRO DE MASSA DO KUSINOL.....</b>	<b>88</b>

## *Capítulo 1 – Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas com fins medicinais desde o início da civilização humana com a finalidade de prevenção, tratamento e cura de diversas doenças (DE CARVALHO *et al.*, 2013). A evolução do conhecimento científico intensificou os estudos das plantas medicinais, relacionando a sua composição química com os seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular (CAVALCANTE *et al.*, 2013).

As plantas apresentam inúmeras substâncias ativas, que as tornam uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem. Dentre os diversos produtos biologicamente ativos obtidos de vegetais, encontram-se os óleos essenciais, que são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Estas misturas estão presentes em vários órgãos vegetais, e são relacionados a diversas funções essenciais à sobrevivência vegetal, exercendo assim um papel fundamental na defesa contra fitopatógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além dessas características, possuem valor terapêutico podendo ser utilizados em diversas áreas, como farmacêutica, cosmética e alimentícia (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).

Nos últimos anos, tem sido observado um crescente interesse por compostos naturais para a elaboração de fitomedicamentos. Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma importante fonte para obtenção de medicamentos (CARVALHO *et al.*, 2007).

No entanto, apesar desse percentual, os estudos nessa área ainda são insuficientes. Segundo Miller (2011) existem inúmeros compostos bioativos medicinalmente úteis, aguardando por descoberta em espécies de plantas, cujos constituintes químicos ainda não foram avaliados, conseqüentemente a biodiversidade vegetal representa uma fonte pouco explorada de princípios ativos que podem potencialmente tratar ou curar doenças.

O Brasil hospeda em seus vários ecossistemas grande diversidade de plantas, constituindo-se uma das mais ricas floras do mundo e, portanto, um arsenal de matéria-prima para a produção de fitofármacos e fitoterápicos (PINTO *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas das plantas, a antimicrobiana vem sendo amplamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos, devido a exposição excessiva, por longos períodos, aos fármacos (WRIGHT, 2005). Frequentemente é observado relatos na literatura sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso na rotina, mas que se tornaram resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2002).

O Brasil é um importante centro para estudos de novos antimicrobianos devido ao fato de possuir a maior biodiversidade do planeta. Considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; SILVA; FERNANDES JR., 2010).

Nesse contexto, têm sido desenvolvidos estudos em todo o mundo, baseados nas propriedades biológicas de muitas plantas de utilização rotineira pela medicina popular que poderão contribuir de forma inovadora, na terapêutica antimicrobiana (HOLETZ *et al.*, 2002; YAMAMOTO; OGAWA, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2001).

Diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de micro-organismos, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento das espécies existentes na região, especificamente das espécies de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, que permita principalmente contribuir para identificação de novas substâncias com atividades biológicas definidas.

*Capítulo 2 – Revisão de literatura*

*Produtos Naturais*

---

## 2 PRODUTOS NATURAIS

### 2.1 Plantas medicinais

A utilização de espécies vegetais pelos seres humanos tem um longo histórico que remonta a antiguidade. Desde o momento em que o homem iniciou o percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício, estas plantas têm sido utilizadas para vários fins, inclusive para o tratamento e prevenção de diversos tipos de enfermidades (MAGALHÃES, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), medicina tradicional é a soma dos conhecimentos, habilidades e práticas com base nas teorias e crenças de diferentes culturas, usadas na manutenção da saúde. Durante a última década, o uso da medicina tradicional tem se expandido globalmente e ganhou popularidade. Em grande parte dos países em desenvolvimento, 70-95 % da população dependem de medicamentos naturais como principal forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WHO, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos atualmente empregados na terapêutica são derivados, direta ou indiretamente, a partir de plantas medicinais, principalmente através da aplicação conjunta do conhecimento tradicional com a tecnologia moderna (CALIXTO, 2000).

Nas últimas décadas, tem sido observado mundialmente um crescente interesse no aproveitamento da biodiversidade, particularmente no que se refere às plantas medicinais, é notável o avanço científico envolvendo estudos para o conhecimento e obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas (CAMARGO, 2010). Com o conhecimento obtido através de trabalhos relacionados às propriedades terapêuticas das plantas, foi possível obter inúmeros medicamentos de extrema importância para medicina como os digitálicos, quinina, atropina, pilocarpina, artemisinina, além de algumas drogas usadas no tratamento de câncer como: vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas (SIMÕES *et al.*, 2007).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, possuindo a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (SILVA, 2010).

O uso das plantas medicinais representa uma fonte de acesso em potencial para as

camadas mais carentes da sociedade e também possibilita a descoberta de novas moléculas ou de novos tratamentos de doenças que apresentem tratamento e/ou prognóstico difíceis. Entretanto, assim como qualquer outro medicamento, aqueles baseados em plantas devem comprovar sua eficácia e segurança para uso (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008).

## **2.2 Ação antimicrobiana de Plantas Medicinais**

As plantas são conhecidas por produzir uma enorme variedade de compostos ativos que as tornam importantes para a busca de novos fármacos. Estas moléculas são sintetizadas pelos vegetais no metabolismo secundário e são importantes por apresentar diversas propriedades biológicas (SILVA, 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem estar presentes em diversos órgãos como folhas, flores, frutos, sementes e raízes. Estes compostos são alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, terpenos, poliacetilenos, que por vezes servem como marcadores taxonômicos de determinadas famílias, gêneros e espécies (COWAN, 1999; SIMÕES *et al.*, 2007). Estas substâncias desempenham importantes funções nos vegetais, como por exemplo, auxiliam na defesa contra fitopatógenos e herbívoros (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Algumas dessas moléculas são denominadas fitoalexinas, produzidas em resposta a agressões por fungos, bactérias, vírus, nematóides ou em função de estímulos motivados por injúrias físicas sofridas pela planta (MAGALHÃES, 2010).

No Brasil, estudos sobre atividade antimicrobiana de origem vegetal, tiveram início com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes tipos de plantas. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Proteus* X-19 (SARTORI, 2005).

A busca de novos fármacos para tratamento de infecções causadas por bactérias aumentou consideravelmente nos últimos anos, em razão do aumento da resistência bacteriana as drogas já existentes, ocasionado pelo uso indiscriminado de antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi observada em vários trabalhos na literatura. Por exemplo, o extrato de *Vitex negundo* apresentou efeito bactericida sobre diversas bactérias patogênicas (KAMRUZZAMAN; BARI; FARUQUE, 2013). Óleos essenciais de *Euphorbia macrorrhiza*, apresentaram um forte efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus* (LIN *et al.*, 2012), Chatterjee e colaboradores (2011), relataram atividade antibacteriana de uma fração isolada do extrato das folhas de *Vangueria spinosa* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Óleos essenciais de *E. camaldulensis* e *M. spicata* tiveram ação contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes*, interferindo significativamente na formação do biofilme (RASOOLI; SHAYEGH; ASTANEH, 2009). Além disso, um composto isolado de *Psoralea corylifolia*, uma planta nativa da China, apresentou atividade bactericida sobre vários micro-organismos orais, incluindo *S. mutans*, *S. sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Actinomyces viscosus*, and *Porphyromonas gingivalis* (KATSURA *et al.*, 2001).

### 2.3 Óleos essenciais

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES *et al.*, 2007). Entretanto estes óleos podem ser obtidos através de outros métodos de extração como: hidrodestilação, prensagem, enfloração, extração de fluido supercrítico e extração com solventes orgânicos (DAWIDOWICZ *et al.*, 2008).

De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos e de aparência oleosa a temperatura ambiente, originando daí a designação de óleo. Sua principal característica, entretanto, é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso, sendo, por isso, chamados de essências (FONTENELLE, 2008).

Os constituintes químicos desses óleos aromáticos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lacto-

nas, cumarinas, até compostos contendo nitrogênio e enxofre (SIMÕES *et al.*, 2007).

Podem ser extraídos a partir de flores, folhas, frutos, sementes, parte aérea, raízes, casca, tubérculos, capítulos florais e bulbos (BAKKALI *et al.*, 2008). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização anatômica das estruturas produtoras (DESCHAMPS *et al.*, 2008).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e características para o seu estágio de desenvolvimento (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007), no entanto, fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa, duração total de exposição ao sol, regimes de ventos, grau de hidratação do terreno e presença de micronutrientes neste terreno, podem influenciar a composição dos óleos essenciais (MORAIS *et al.*, 2006).

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (AMARAL, 2004). Dentre estas ações estão à antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, diurético, antimalárico, antihemorroidário, miorelaxante, antiespasmótico, anti-inflamatório, anticonvulsivante e gastroprotetora (AHMED *et al.*, 2011; BASER; BUCHBAUER, 2010; DHARMAGADD *et al.*, 2005; DUARTE *et al.*, 2004; EDRIS, 2007; FONTENELLE *et al.*, 2007; HAMMER *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011).

## **2.4 Considerações sobre as plantas em estudo**

### **2.4.1 *Acanthaceae***

A família Acanthaceae, compreende cerca de 240 gêneros e 3.250 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo pouco representada nas regiões temperadas. Brasil, Sudeste Asiático, Malásia, Índia, Madagascar, África Tropical, América Central, México e Andes são as regiões de maior concentração de espécies. O Brasil constitui um de seus principais centros de diversidade, com aproximadamente 40 gêneros e 542 espécies dispersos em todos os tipos de vegetação, especialmente nas formações florestais (INDRIUNAS, 2011; SILVA; MELO; SALES, 2010).

Tradicionalmente esta família é subdividida em quatro subfamílias: Acanthoideae, Nelsonioideae, Thunbergioideae e Mendonciaceae, definidas principalmente pela diferença na tipologia dos frutos e sementes (INDRIUNAS, 2011).

São plantas herbáceas, subarbustivas ou arbustivas. Suas folhas são simples, sem

estípulas, opostas, muitas vezes oposta cruzada. As flores são grandes, vistosas, dispostas em inflorescências, muitas com brácteas coloridas (SOUZA; LORENZI, 2008 *apud* LIMA, 2012)

A família apresenta significativo valor econômico devido ao grande número de plantas cultivadas como ornamentais. Os gêneros *Aphelandra* R.Br., *Justicia* L., *Ruellia* L.e *Thunbergia* Retz., *Eranthemum* L., *Hemigraphis* Nees, *Hypoestes* Sol. ex R.Br., *Odontonema* Nees são muito utilizados para ornamentação no mundo todo (LIMA, 2012).

Várias espécies também são importantes pelo seu valor medicinal, como *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl., cujo extrato metanólico apresenta compostos com atividade antioxidante, é empregada na medicina popular no tratamento de doenças cutâneas (ADESEGUN *et al.*, 2009). *Adhatoda vasica* Nees possui alcalóides que combatem problemas respiratórios (NATH; BURAGOHAİN, 2005). *Graptophyllum pictum* L. é utilizada na Índia para cura de doenças cutâneas e a infusão das folhas é usada para prisão de ventre (KOILPILLAI; WILSON, 2010). *Asteracantha longifolia* (L.) Nees reduz os níveis de glicose no sangue, tem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (CHAUHAN; DIXIT, 2010). Além disso, apresentam uma grande diversidade de compostos, como, flavonóides, glicosídeos iridóides, aminas quaternárias, triterpenos e compostos alifáticos de cadeia longa (FACUNDO; PINTO; REZENDE, 2005).

#### 2.4.2 *Ruellia*

*Ruellia* L. é o segundo maior gênero de Acanthaceae apresentando cerca de 300 espécies, sendo as Américas o seu principal ponto de diversidade com aproximadamente 275 espécies, possuindo 100 táxons para a América do Sul (TRIPP; MANOS, 2008). No Brasil ocorrem em torno de 84 espécies, sendo 55 dessas, endêmicas (PROFICE *et al.*, 2013).

Economicamente, o gênero tem importância no mercado de plantas ornamentais, principalmente pelo tamanho e variação das cores da corola (PESSÔA, 2012). Ecologicamente *Ruellia* L. apresenta importância na produção de néctar para seus polinizadores como beija-flores, morcegos, borboletas, mariposas e abelhas (TRIP; MANOS, 2008).

Pesquisas fitoquímicas sobre as espécies pertencentes ao gênero *Ruellia* são escassas, entretanto a literatura revela que algumas dessas espécies são largamente empregadas na medicina popular. Sendo utilizadas como vermífugo (DE-LA-CRUZ; VILCAPOMA; ZEVALLOS, 2007), diurético e no tratamento de febre (HOUT *et al.*, 2006), doenças da pele (THAS, 2008), gonorréia, sífilis e infecções renais (AHMAD *et al.*, 1990),

estando também associadas a patentes, envolvendo formulações utilizadas no tratamento da amigdalite aguda (LI; GUO, 2008), infecções cutâneas (ZHANG; JIN, 2008), psoríase (FU, 2008) e como estimulante do crescimento do cabelo (OKA *et al.*, 2008).

#### 2.4.3 *Ruellia asperula* (Mart. ex Nees) Lindau

Conhecida popularmente como “Melosa”, *R. asperula* (Figura 1) é caracterizada pelas folhas com aspecto viscoso, inflorescências em dicásio axilares, flores com corola tubulosa vermelha com lobos patentes e reflexos e pelos estames exsertos, sendo facilmente identificada. Distribuída de forma endêmica do Brasil, ocorrendo em vegetação de caatinga e nas florestas montanas também denominadas brejos de altitude, *R. asperula* é encontrada em Goiás, Minas Gerais, Bahia, Alagoas e demais estados do Nordeste (PROFICE *et al.*, 2013; SALES; MAYO; RODAL, 1998). Ocupa os baixios de solos argilosos, onde há uma melhor disponibilidade de água. No interior do Nordeste suas flores, folhas e raízes são maceradas e usadas para tratar asma, bronquites, febres, gripe e inflamação no útero (CASTRO, 2011).

Figura 1 – *Ruellia asperula* encontrada na região da Meruoca – Ceará, Brasil.



Fonte: Jamilli Menezes de Brito. A – Inflorescência; B – Flor.

#### 2.4.4 *Ruellia paniculata* L.

*Ruellia paniculata*, conhecida popularmente como “Melosa-roxa” (Figura 2) é um arbusto piloso, grudento, de folhas opostas, ásperas e caule quadrangular. É encontrada naturalmente em solos afetados por saís, os quais ocorrem em baixios, mais favorecidos pela umidade. Os frutos têm uma forma curiosa de liberar as sementes, as quais, em forma de disco, são lançadas longe de modo semelhante a uma catapulta. A flor roxa com corola em forma de funil é visitada por diferentes espécies de abelhas, sendo importante por compor sua dieta no período seco do ano (CASTRO, 2011).

Espécie amplamente distribuída nas Américas, ocorrendo desde o México até o Brasil onde é frequente na região Nordeste (Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia), crescendo associada à vegetação de caatinga, no domínio do semi-árido (SILVA; MELO; SALES, 2010).

Figura 2 – *Ruellia panicullata* encontrada na região da Meruoca – Ceará, Brasil.



Fonte: Jamilli Menezes de Brito. A – Inflorescência; B – Flor.

*Capítulo 3 – Revisão de literatura*

*Biofilmes e doenças*

---

### 3 BIOFILMES

#### 3.1 O Biofilme Bacteriano

Biofilmes foram observados pela primeira vez no século XVII quando van Leeuwenhoek descreveu pequenos “animalículos” da placa dental. Mas, tornaram-se amplamente conhecidos em 1978, quando Costerton e colaboradores relataram que em sistemas aquáticos as comunidades de bactérias encontravam-se envolvidas numa matriz de natureza polissacarídica, capaz de mediar o processo de adesão celular. Era criada a Teoria dos Biofilmes, que alavancou os estudos nesta área (DONLAN; COSTERTON, 2002; ERRIU *et al.*, 2014).

Atualmente biofilmes são definidos como comunidades microbianas complexas, caracterizadas por células ligadas aos mais diversos tipos de superfícies e envolvidas por uma matriz extracelular de biopolímeros derivados do próprio metabolismo bacteriano (ABEE, 2011; BATONI, 2011).

Estima-se que cerca de 99% dos micro-organismos que habitam o planeta vivam nestas comunidades microbianas (COGAN, 2006). Biofilmes são ubíquos, estando distribuídos em ambientes como o solo, em tecidos vivos, dispositivos médicos e/ou industriais, sistemas de tubulação de água ou até mesmo ambientes marinhos (AKCALI *et al.*, 2013; BORDI; BENTZMANN, 2011; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010; ONURDAG *et al.*, 2010; PERCIVAL *et al.*, 2011; WILLCOX, 2013).

Os biofilmes são um exemplo de adaptação fisiológica e uma das fontes mais importantes de resistência bacteriana aos antibióticos (SIMÕES, 2011). Bactérias incorporadas em biofilmes podem apresentar níveis de resistência mais elevados aos produtos antimicrobianos do que suas formas planctônicas (COS *et al.*, 2010; DONLAN; COSTERTON, 2002; JAGANI; CHELIKANI; KIM, 2009; MAH; O'TOOLE, 2001; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2011; STEWART; COSTERTON, 2001). Isso devido a capacidade de bactérias inseridas nos biofilmes passarem a exibir características fenotípicas distintas de suas formas planctônicas, com relação a taxa de crescimento e a transcrição de genes (MAH; O'TOOLE, 2001).

Outra particularidade do biofilme bacteriano é a presença da matriz polimérica extracelular, que pode ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, substâncias húmicas e heteropolímeros, tais como glicoproteínas (FLEMMING, WINGENDER, 2010). A matriz polimérica é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos

biofilmes, a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (ALLISON, 2003).

Independentemente da sua composição, as substâncias poliméricas extracelulares são consideradas elementos-chave da matriz de um biofilme (ALLISON, 2003; SUTHERLAND, 2001). Estas substâncias permitem a adesão célula-célula e às superfícies, conferindo estabilidade mecânica à estrutura dos biofilmes. Assegurando também, um ambiente altamente hidratado, que permite não só a sobrevivência dos micro-organismos que integram os biofilmes, mas também a manutenção da atividade de enzimas, capazes de degradar compostos a serem utilizados como nutrientes e compostos tóxicos que coloquem em risco a integridade celular (DAVEY; O'TOOLE, 2000; JEFFERSON, 2004).

Biofilmes ainda contam com um sistema de comunicação de grande importância, haja vista que a adaptação bem sucedida de bactérias às mudanças nas condições naturais é dependente da sua capacidade de detectar e responder de acordo ao ambiente externo e a expressão gênica modulada (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004).

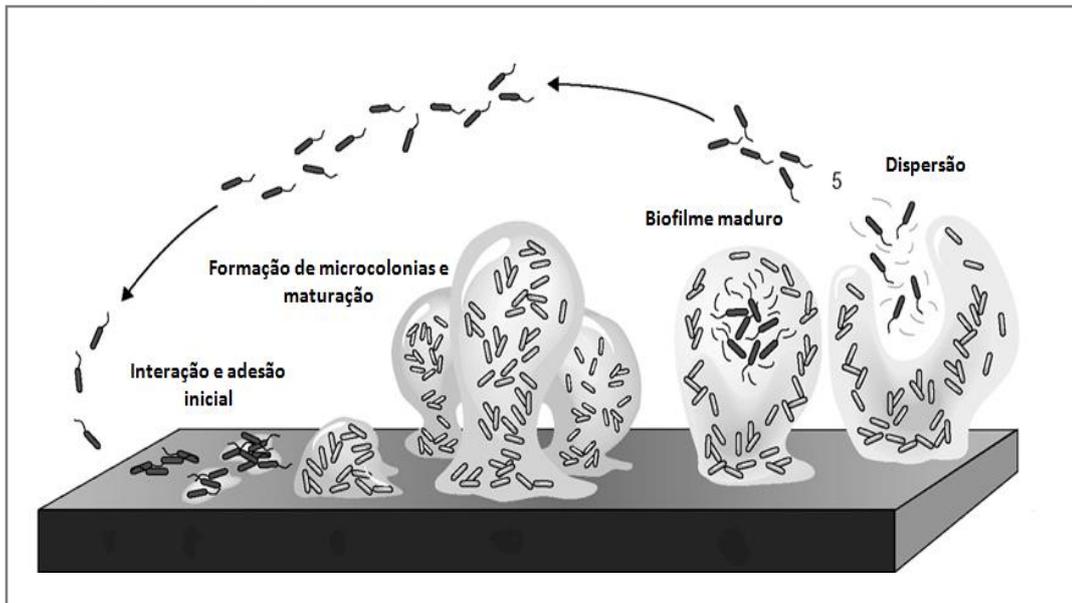
Esse mecanismo de comunicação entre espécies bacterianas denominado de *quorum sensing*, caracteriza-se pela liberação de sinais químicos (auto-indutores) secretados pelas células bacterianas, capazes de induzir diversas alterações como por exemplo a regulação da expressão de genes em resposta à densidade populacional (KELLER; SURETTE, 2006; MILLER; BASSLER, 2001). Assim, altas densidades celulares resultarão em concentrações elevadas de sinal, que irá induzir a expressão de certos os genes e/ou de alterações fisiológicas em células vizinhas (PARSEK; GREENBERG, 2005).

Este mecanismo de comunicação célula-célula em bactérias (*quorum sensing*) controla um grande número de processos de desenvolvimento, incluindo os relacionados com a formação de biofilme (CAMILLI; BASSLER, 2006).

### **3.2 Formação de Biofilmes**

A formação de biofilmes pode ser considerada um mecanismo de proteção para a comunidade bacteriana contra stress externos. O desenvolvimento de biofilmes consiste em mecanismos complexos e altamente regulados, que envolve uma cronologia bastante criteriosa (BATONI, 2011). Na Figura 3, p. 32, estão esquematizados os estágios de desenvolvimento de um biofilme.

Figura 3- Esquema dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes.



Fonte: SAUER, 2003. Adaptado.

O primeiro passo na formação de um biofilme é a adesão dos micro-organismos a uma superfície. Esta adesão inicial pode ocorrer através de forças fracas, do tipo interações eletrostáticas ou de Van der Waals, e/ou através de moléculas de adesão celular (adesinas, pili, fímbrias) pelas quais se estabelece uma ancoragem mais permanente (AGARWAL; SINGH; JAIN, 2010; SINGH ; PAUL; JAIN, 2006).

À medida que o biofilme se desenvolve, colonizadores secundários se ligam aos receptores das bactérias já aderidas, por processos denominados coadesão ou coagregação (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). As bactérias já estabelecidas produzem polímeros extracelulares (matriz) que consolidam a fixação do biofilme. Nesta etapa, ocorre a maturação do biofilme, e microcolônias desenvolvem-se em um biofilme maduro adquirindo uma arquitetura típica, com canais para o transporte de água, oxigênio e nutrientes para as células formadoras do biofilme (BATONI, 2011; DONLAN, 2002).

Por último, ocorre a fase de dispersão, onde porções de células do biofilme maduro se desprendem e migram para outras regiões, que ao se fixarem a um substrato, poderão dar início a um novo biofilme (LINDSAY; VON HOLY; 2006).

### 3.3 Biofilmes e doenças

Biofilmes tem uma importância clínica, estando associados a uma grande quantidade de infecções (HOIBY *et al.*, 2010). Estima-se que mais de 80% das infecções

microbianas no corpo humano são mediadas por biofilmes que contribuem significativamente para a morbidade e mortalidade, especialmente em ambiente hospitalar (COGAN, 2006).

Muitas destas infecções estão relacionadas com implantes em que as populações microbianas podem aderir a superfícies de dispositivos médicos, tais como cateteres urinários, válvulas cardíacas, dispositivos intra-uterinos, lentes de contato e próteses dentais (BATONI, 2011). Causando problemas de saúde comuns como infecções do trato urinário, otite média, placa dentária, gengivite, endocardite e fibrose cística (DORLAN; COSTERTON, 2002).

Tais infecções são de difícil diagnóstico e não são tratáveis com as abordagens convencionais, pois os biofilmes tem mecanismos intrínsecos responsáveis pela sua alta resistência aos agentes antimicrobianos (COX; WRIGHT, 2013).

A Tabela 1 descreve vários exemplos de infecções clinicamente relevantes associada ao desenvolvimento de biofilme. De particular interesse são as infecções de biofilme em pacientes com dispositivos médicos, infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, e as doenças infecciosas como cárie dentária e doença periodontal.

Tabela 1 – Infecções humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.

<b>Doenças associadas a biofilmes</b>	<b>Principais micro-organismos envolvidos</b>
<b>Endocardite valvular nativa</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Otite</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>Infecção do trato urinário</b>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<b>Fibrose cística</b>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i>
<b>Doenças periodontais</b>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Treponema denticola</i>
<b>Cárie</b>	<i>Streptococcus mutans</i>
<b>Artrite séptica aguda</b>	<i>S. aureus</i>
<b>Prostatite bacteriana crônica</b>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>

Fonte: BATONI *et al.*, 2011 com modificações.

### 3.3.1 Infecções nosocomiais

Infecções associadas aos cuidados de saúde estão entre as principais causas de aumento da mortalidade, morbidade, tempo de internação e custos para saúde no mundo (DERELI *et al.*, 2013; DONLAN, 2009 ).

Aproximadamente 60 % de todas as infecções associadas aos hospitais, mais de um milhão de casos por ano, são devido a biofilmes que se formaram sobre dispositivos médicos (SHIRTLIFF; LEID, 2009).

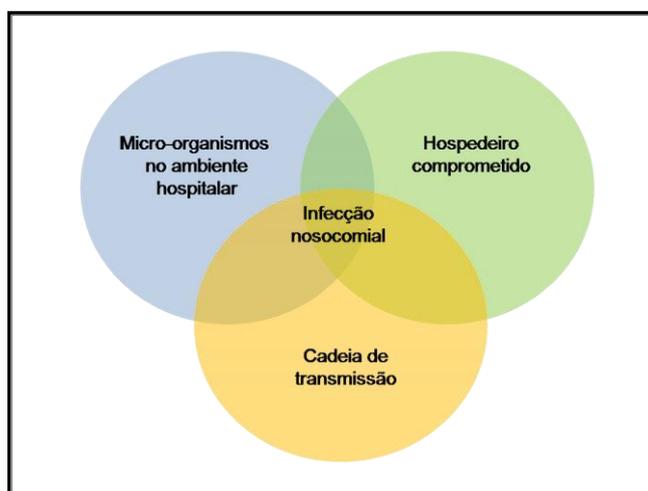
O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), define infecções associadas aos cuidados de saúde como aquelas adquiridas após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou a procedimentos hospitalares (SYDNOR; PERL, 2011).

Tais infecções foram observadas pela primeira vez no início de 1980, quando estudos usando microscopia eletrônica revelaram depósito de bactérias sobre a superfície de dispositivos de longa permanência, tais como cateteres intravenosos e cardíacos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Apesar dos avanços em técnicas de esterilização e materiais descartáveis, a taxa de infecções aumentou 36% nos últimos 20 anos. Nos Estados Unidos, cerca de dois milhões de pessoas contraem infecções hospitalares por ano, e mais de cem mil morrem como consequência. Infecções hospitalares representam a oitava causa de mortes nos Estados Unidos, após doenças cardíacas, câncer e acidentes vasculares cerebrais (TORTORA, 2010). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de infecção hospitalar é de cerca 15% (ANVISA, 2004).

As infecções nosocomiais resultam da interação de diversos fatores: (1) a existência de micro-organismos nos ambientes hospitalares, (2) a presença de hospedeiros em condições comprometidas, e (3) a cadeia de transmissão no hospital. A figura 4 ilustra a interação dos três fatores (TORTORA, 2010).

Figura 4- Fatores envolvidos na ocorrência de Infecções nosocomiais.



Fonte:TORTORA, 2010.

Diferentes micro-organismos como bactérias, fungos, e vírus causam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias. Os patógenos mais comuns associados às infecções hospitalares estão descritos na Tabela 2 (ANVISA, 2004).

Tabela 2 – Micro-organismos envolvidos na maioria das infecções nosocomiais e sítios comuns de isolamento do patógeno.

<b>Patógeno</b>	<b>Sítios comuns de isolamento do patógeno</b>
<b>Bactérias Gram negativas</b>	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Klebsiella sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus sp</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<b>Bactérias Gram positivas</b>	
<i>Streptococcus sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<b>Fungi</b>	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue

Fonte: ANVISA, 2004. Com modificações.

Bactérias Gram-negativas multirresistentes, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp., são relativamente importantes, pois estão associados a um número significativo de infecções (AODHÁN, 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* é um micro-organismo que pode causar infecções nosocomiais graves. Relatos da literatura revelam *Pseudomonas* como um dos patógenos mais frequentemente relacionados a infecções hospitalares, tais como pneumonia, infecções do trato urinário e bacteremia. Sendo responsáveis por uma em cada dez infecções nosocomiais (ORTOLANO *et al.*, 2005; SHARMA, 2014; TORTORA, 2010).

*Klebsiella oxytoca* aparece associada a casos de colite infecciosa e infecções do trato urinário (HOFFMANN *et al.*, 2010; SADER *et al.*, 2014). Outras espécies pertencentes a este gênero podem causar complicações graves de saúde é o caso de *K. pneumoniae*, responsável por um tipo grave de pneumonia em humanos (TORTORA, 2010).

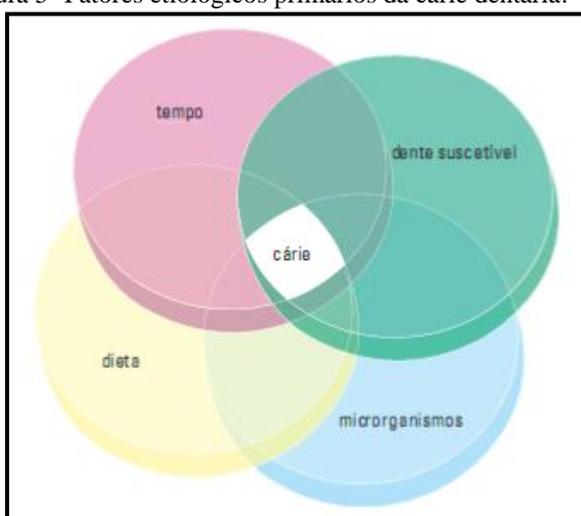
### 3.3.2 Cárie dentária

A cárie dentária é uma doença crônica, infecciosa e de caráter multifatorial. De acordo com Newbrun (1983) sua etiologia é atribuída a fatores como microbiota cariogênica, dieta inadequada, hospedeiro susceptível e o tempo (Figura 5). Caracteriza-se por dissolução localizada dos tecidos duros do dente, devido à produção de ácidos a partir do metabolismo bacteriano na placa dental, a cárie prevalece como a principal causa de dor orofacial e perda dentária em populações em todo o mundo (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Trata-se de uma doença com alta prevalência na espécie humana, atingindo quase 100% da população mundial adulta, e 60-90% de crianças em idade escolar (AIMUTIS, 2012). Considerada um grave problema de saúde pública não apenas para países em desenvolvimento, mas também para países desenvolvidos (SELWITZ *et al.*, 2007).

Como já referido, a cárie não é um evento singular, mas sim o resultado de uma acumulação de eventos, que se propaga por um período de tempo (LIMA, 2007). Para Fejerskov (1997), o processo cariioso é a dinâmica do fenômeno de desmineralização-remineralização (des-re) resultante do metabolismo microbiano na superfície dentária que, com o passar do tempo, pode resultar em perda de mineral e, possivelmente, conduzirá a cavitação.

Figura 5- Fatores etiológicos primários da cárie dentária.



Fonte: LIMA, 2007. Fatores etiológicos primários da cárie dentária: 1) microbiota da placa dental, 2) substratos (originados principalmente da dieta), 3) hospedeiro susceptível, 4) tempo.

A placa dental (biofilme) aparece como um fator etiológico fundamental na cárie dentária (MARSH *et al.*, 2010). As bactérias no biofilme são metabolicamente ativas, causando flutuações no pH. Essas flutuações podem causar uma perda de minerais do dente

quando o pH está baixo ou um ganho de mineral quando o pH aumenta ( MANJI *et al.*, 1991). O resultado cumulativo destes processos des-re pode ser uma perda líquida de mineral, conduzindo a dissolução dos tecidos duros dentárias e à formação de uma lesão de cárie (Figura 6).

Figura 6- Aspecto da cárie dentária em um estágio grave.



Fonte: MELO; AZEVEDO;HENRIQUES, 2008

Outro aspecto relevante na epidemiologia da cárie é a influência de fatores socioeconômicos e comportamentais, para a prevalência e severidade da doença. Principalmente no que diz respeito à renda familiar e a escolaridade do chefe da família (PERES *et al.*, 2000). Neste âmbito, diversos autores demonstram a importância de variáveis como: renda, educação, fatores comportamentais, conhecimento, escolaridade e atitudes, no desenvolvimento da cárie dentária (Figura 7) (BALDANI; NARVAI; ANTUNES, 2002; CORTELLAZZI *et al.*, 2009; FEJERSKOV; MANJI, 1990; NARVAI *et al.*, 2006).

Figura 7- Diagrama dos fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie dentária.

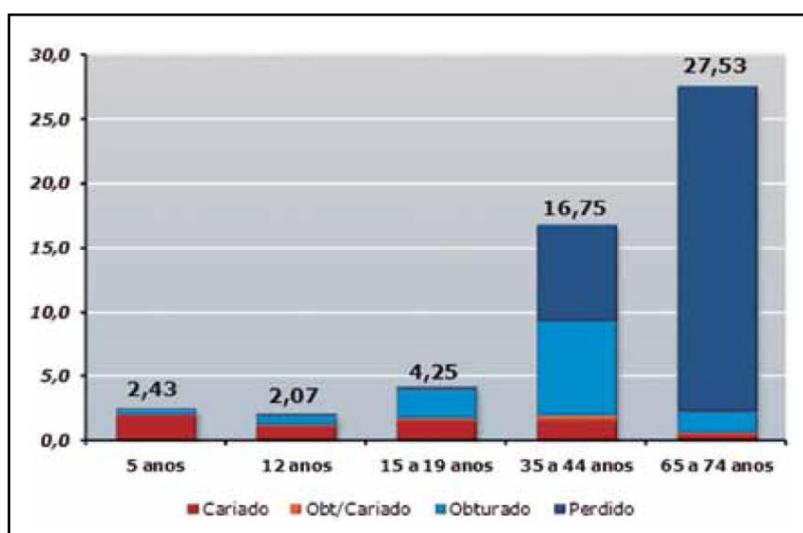


Fonte: CERQUEIRA, 2010. Ilustração esquemática da relação entre os fatores etiológicos (círculos amarelos), determinantes (círculo verde) e relacionados (círculo roxo) com a iniciação e desenvolvimento da cárie dentária. Os fatores determinantes interagem diretamente com a superfície dentária. Os fatores relacionados não estão em contato com o dente, porém influenciam o processo de aparecimento das lesões cariosas.

O conhecimento da epidemiologia da doença cárie é essencial para determinar o programa de prevenção e tratamento da doença. A experiência da doença cárie pode ser expressa pela severidade das suas lesões, mensurada por índices como o CPO-D (número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados) e o CEO-D (número de dentes decíduos, com indicação de extração e obturados) (CERQUEIRA, 2010).

Levantamentos epidemiológicos nacionais em saúde bucal foram realizados nos anos de 1986, 1996, 2003 e 2010. Comparando os achados dos referidos estudos, percebe-se um expressivo declínio na prevalência de cárie em crianças de 12 anos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Os dados também mostram uma tendência de crescimento na prevalência da doença em função da idade (Figura 8) (COIMBRA, 2012).

Figura 8 – Média do CEO/CPO e respectivos componentes, segundo o grupo etário.



Fonte: BRASIL, 2011.

Os últimos dados oficiais mostram que entre 2007 e 2010, o Ministério da Saúde investiu R\$ 2,7 bilhões para melhorar a saúde bucal da população do país. As principais ações foram delimitadas por meio da execução do programa Brasil Sorridente. (MOREIRA, 2011). Através desse programa, a saúde bucal passou a ser ofertada de forma integral. Houve a inserção de procedimentos, laboratórios de próteses dentárias, a distribuição de *kits* de escova e pasta dentária, e a ampliação do acesso à água tratada e fluoretada. O programa proporcionou que diversos brasileiros tivessem pela primeira vez uma consulta odontológica e ajudou a diminuir a incidência de doenças bucais entre os brasileiros (BRASIL, 2011).

Apesar das consideráveis melhoras nas condições da saúde bucal nas últimas décadas, a cárie dentária continua a afetar milhões de pessoas, tanto no Brasil como em gran-

de parte do mundo. Prevalendo ainda como a maior causa das perdas dentárias (GIACAMAN; ARANEDA; PADILLA, 2010).

A chave para a prevenção e tratamento desta doença oral, está no controle efetivo dos patógenos e biofilmes orais. Até agora, muitos agentes antimicrobianos, tais como clorexidina, hexetidina, delmopinol e os compostos fenólicos, pôde inibir o desenvolvimento de biofilme e afetar o metabolismo bacteriano. No entanto, eles podem ocasionar efeitos colaterais, como vômitos, interferência gustativa, pigmentação dos dentes, podendo induzir a resistência de micro-organismos quando o uso for prolongado (WANG *et al.*, 2012).

## *Capítulo 4 – Objetivos*

---

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Avaliar a composição química e o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* (Mart. ex Ness) Lindau e *Ruellia paniculata* L. sobre bactérias de importância clínica.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Identificar a composição química dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Ruellia asperula* (OERA) e do óleo essencial de *Ruellia paniculata* (OERP) sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182;
- Descrever a cinética de morte das cepas que forem suscetíveis quando submetidas à ação bactericida do OERA e do OERP;
- Avaliar o efeito do OERA e do OERP sobre a formação de Biomassa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182;
- Verificar viabilidade de células incrustadas no biofilme monoespécie de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 quando submetido à ação do OERA e do OERP;

*Capítulo 5 – Material e Métodos*

---

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Material Vegetal

As espécies vegetais *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, foram coletadas na Serra da Meruoca, no município de Sobral - Ceará. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Elnatan Bezerra de Souza. As exsicatas correspondentes as plantas encontram-se depositadas no Herbário Francisco José Abreu Matos da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, sob o número de registro 13.516 (*R. asperula*) e 13.513 (*R. paniculata*).

### 5.2 Extração e identificação dos óleos essenciais

As partes aéreas de *R. asperula* (509,2 g) e *R. paniculata* (347,7 g) foram submetidas ao processo de hidrodestilação por duas horas, em aparelho doseador tipo Clevenger. A análise qualitativa dos óleos essenciais das duas espécies foi realizada por cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas (CG-EM), utilizando espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890A, série II (CG-EM), provido de coluna capilar DB-5 com 25,0 de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno, utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4°C/min de 50 a 180°C/min de 180°C a 280°C, sendo a temperatura do injetor de 250°C.

Os compostos foram identificados por análise dos espectros de massa de cada composto individual e por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007).

### 5.3 Micro-organismos

Para este estudo foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715 e as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ Rio de Janeiro-Brasil.

## 5.4 Condições de cultivo

As cepas bacterianas foram armazenadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol e conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para realização dos experimentos, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da cultura estoque foi inoculada em 5 mL de meio BHI caldo estéril e incubado por 24 h, a  $37^{\circ}\text{C}$  com 10%  $\text{CO}_2$  para as bactérias anaeróbias facultativas e na ausência de  $\text{CO}_2$  para as cepas aeróbias. Após a ativação inicial, a cultura foi renovada, transferindo-se uma nova alíquota de 50  $\mu\text{L}$  para 5 mL de BHI caldo estéril sobre as condições de crescimento citadas.

Posteriormente, as células bacterianas em fase de crescimento exponencial de acordo com curva de crescimento previamente realizada, foram diluídas às concentrações de  $2 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$  em meio BHI suplementado com 2% de sacarose para os experimentos referentes a determinação da CIM, e de  $2 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$  para os experimentos referentes a biofilmes.

## 5.5 Preparação das substâncias-teste

Os óleos essenciais de *Ruellia asperula* (OERA) e *Ruellia paniculata* (OERP) foram devidamente solubilizado em água estéril deionizada com 4% de Dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  previamente ao uso.

## 5.6 Ensaio de atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi feita segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U” padronizada segundo a norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

Cada poço da placa foi inicialmente preenchido com 0,1mL de água destilada estéril, com exceção da primeira coluna, a qual, foi preenchida com 0,2 mL da substância-teste na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida realizou-se diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações ( $1000 - 15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em um volume final de 0,1 mL. Depois deste processo, 0,1 mL de células ( $2 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) ajustados segundo item 5.4 foi adicionado a cada poço, obtendo-se as concentrações finais dos óleos entre ( $500-7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e um volume final de 0,2 mL. Gluconato de Clorexidina

(ETHICAL) e meio de cultura BHI com 4% de DMSO foram utilizados, respectivamente, como controles positivos e negativos, além do controle de turbidez das substâncias-teste, que continha os óleos diluídos nas mesmas concentrações do teste antimicrobiano.

Em seguida, as placas foram colocadas em estufa a 37°C com 10% de CO<sub>2</sub> para as cepas anaeróbias facultativas, e na ausência de CO<sub>2</sub> para as cepas aeróbias, durante 24 horas. Após a incubação, foi feita a medida de turbidez do meio em cada poço com auxílio do leitor de microplacas (BioTrak II, Amersham Biosciences) à 620 nm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi estabelecida como a menor concentração da substância-teste capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Para determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) 10 µL da suspensão contida nos poços em que não houve um crescimento microbiano visível, foi inoculado em placas de petri com meio BHI ágar. Foi considerada CBM a menor concentração da substância-teste capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas de petri.

### **5.7 Curva do tempo de morte**

A curva do tempo de morte foi realizada como descrito anteriormente pelas diretrizes do NCCLS (agora conhecido como CLSI) com algumas alterações (NCCLS, 1999). A bactéria foi crescida até a fase log (18-24h) e a concentração das células no inóculo foi ajustada para  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os óleos essenciais foram ajustados para a concentração da CBM sobre a respectiva bactéria. As quantidades da bactéria e dos óleos dispensados em cada poço foram semelhantes às utilizadas nos testes de determinação da CIM. Imediatamente ao preenchimento da placa e após 10, 30, 60, 300, 720 e 1440 minutos, coletava-se o volume de 5 poços contendo a suspensão bacteriana em contato com o óleo e procedia-se com a diluição seriada em base 10. Em seguida, inoculava-se 3 gotas contendo 10 µL de cada suspensão bacteriana previamente diluída em placas de petri contendo BHI ágar, as quais foram após secagem das gotas, incubadas de maneira invertida em estufa a 37 °C com 10% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Os resultados foram expressos como UFC mL<sup>-1</sup>. Os grupos controles utilizados nos ensaios da curva do tempo de morte são semelhantes aos utilizados nos ensaios para determinação da CIM.

## **5.8 Ensaio de atividade antibiofilme**

O ensaio de formação de biofilme microbiano foi realizado segundo a metodologia descrita por Stepanovic e colaboradores (2000). As placas de poliestireno de fundo “chato” foram preparadas da mesma forma do ensaio de atividade antimicrobiana. Contudo, para cada ensaio, duas placas eram utilizadas, uma para quantificação da biomassa e outra para contagem de UFC's (Unidades Formadoras de Colônias) aderidas à placa.

### ***5.8.1 Quantificação de biomassa***

Após as 24 horas de incubação a 37 °C em atmosfera específica (com ou sem CO<sub>2</sub> de acordo com as necessidades dos micro-organismos), as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril e em seguida adicionou-se 0,2 mL de álcool metílico P.A para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 0,2 mL de cristal violeta 0,1% foram adicionados por 15 minutos. Esse processo foi realizado para permitir uma quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta. Em seguida, o processo de lavagem com água destilada estéril, foi repetido e a placa colocada a temperatura ambiente, até completa secagem. Para a dissolução do corante preso ao biofilme, foram adicionados 0,2 mL de ácido acético 33% por 10 minutos. A suspensão obtida foi transferida para outra placa de 96 poços estéril e a medida da densidade óptica (D.O.) de cada poço foi realizada com o auxílio do leitor de microplaca (BioTrak II, Amersham Biosciences) à 590nm.

### ***5.8.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)***

Após as 24 horas de incubação à 37 °C em atmosfera específica (com ou sem CO<sub>2</sub> de acordo com as necessidades dos micro-organismos), as placas foram lavadas três vezes com solução de NaCl 0,9% estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, em cada poço da placa foram adicionados 0,2 mL de solução de NaCl 0,9% estéril e levado para o banho ultrassônico (Cristófoli) por 6 minutos, para liberação das células incrustadas no interior da substância polimérica extracelular. O volume de cinco poços, foi removido e reunido em um eppendorf estéril perfazendo um volume final de 1 mL. Em seguida foi realizada a diluição seriada na base dez da suspensão de células em uma nova placa de poliestireno de 96 poços, para posterior plaqueamento. Após este procedimento as placas

foram incubadas a 37 °C em atmosfera específica, durante 24 horas. Seguindo-se com a contagem do número de colônias crescidas em cada placa. Após a contagem, foi feita a correção do número de células, multiplicado o número de UFCs na placa pela diluição, expressando o valor em número de UFC.mL<sup>-1</sup>.

## **5.9 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posterior análise estatística no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni e nível de significância de  $p < 0,05$ .

## *Capítulo 6 – Resultados e Discussão*

---

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação da composição química dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*

Os rendimentos dos óleos (p/v), calculados sobre o peso fresco do material vegetal, foram de 0,05% para *Ruellia asperula* e 0,04% para *Ruellia paniculata*. Dos cinco componentes identificados no óleo essencial de *R. asperula* (OERA), (*E*)-cariofileno (22,7%), óxido de cariofileno (29,4%) e cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol (14,1%) apresentaram-se como constituintes majoritários, enquanto dos doze componentes identificados do óleo essencial de *R. paniculata* (OERP),  $\delta$ -amorfeno (14,9%), espatulenol (13,1%) e (*E*)-cariofileno (11,0%) foram os constituintes preponderantes. Ambos os óleos essenciais, foram constituídos predominantemente de sesquiterpenos.

Sesquiterpenos são constituídos por 15 átomos de carbono, e pertencem à classe dos terpenos, juntamente com os monoterpenos (constituídos por 10 unidades de carbono). Estes compostos são citados na literatura como os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais (BURT, 2004; DORMAN; DEANS, 2000). Inclusive alguns dos constituintes majoritários identificados para os óleos essenciais de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, já são conhecidos por apresentar atividade antibacteriana. Como por exemplo, (*E*)-cariofileno foi ativo contra *Rhodococcus equi* (COSTA *et al.*, 2008), espatulenol (LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004) e o óxido de cariofileno, também ativo contra *Rhodococcus equi* (COSTA *et al.*, 2008) exerce ainda, atividade antifúngica contra espécies de *Trichophyton* (YANG *et al.*, 1999).

A análise dos cromatogramas e dos espectros de massa, possibilitou a confecção da Tabela 3, p.50, onde estão descritos os constituintes químicos identificados dos óleos estudados.

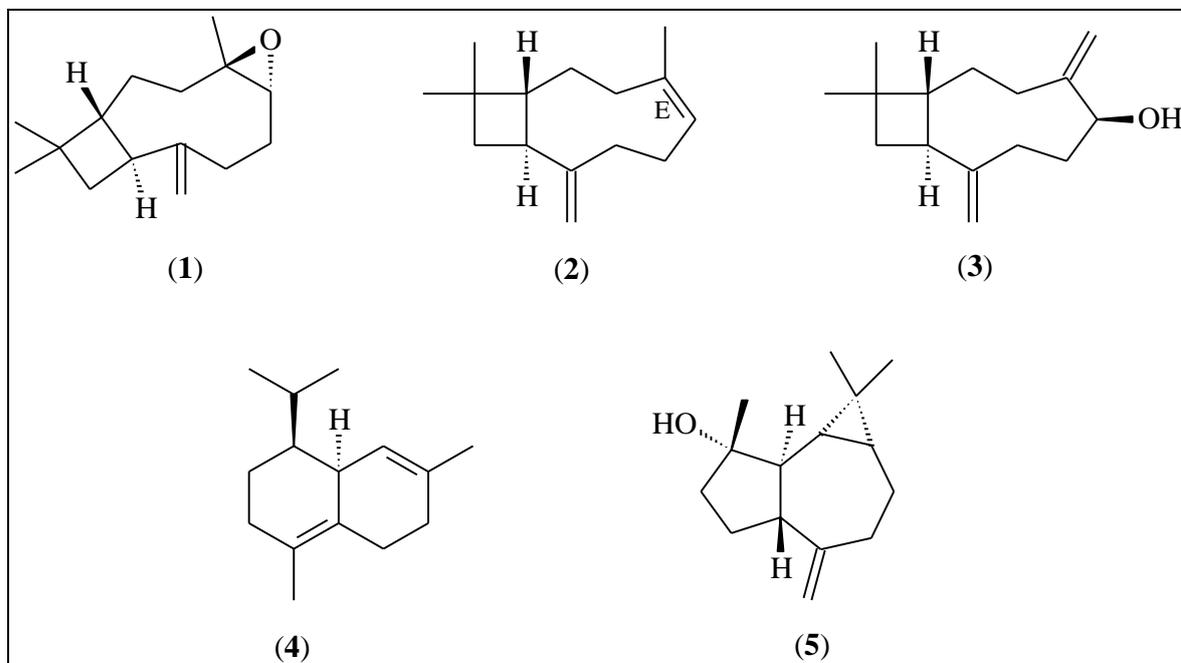
Tabela 3- Constituintes químicos identificados dos óleos essenciais das partes aéreas de *R. asperula* (OERA) e *R. paniculata* (OERP).

<b>Constituintes<sup>a</sup></b>	<b>IK<sup>b</sup></b>	<b>IK<sup>c</sup></b>	<b>OERP<sup>d</sup></b>	<b>OERA<sup>d</sup></b>
Isovalerato de hexenila	1244	1246	-	6,4
acetate de isobornila	1285	1267	2,5	-
$\alpha$ -copaeno	1376	1369	6,2	-
$\beta$ -bourboneno	1388	1379	3,7	-
( <i>E</i> )-cariofileno	1417	1415	11,0	22,7
( <i>E</i> )-bergamoteno	1434	1431	1,9	-
<i>allo</i> -aromadendreno	1460	1458	3,9	-
Curcumeno	1480	1477	5,3	-
germacreno-D	1493	1485	6,5	-
$\delta$ -amorfenno	1512	1514	14,9	-
( <i>E</i> )-nerolidol	1561	1557	4,2	-
Espatuleno	1577	1574	13,1	-
óxido de cariofileno	1583	1583	-	29,4
cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol	1640	1632	-	3,7
cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	1640	1637	-	14,1
Kusinol	1689	1680	3,3	-
Teor de monoterpenos			2,5	6,4
Teor de sesquiterpenos			74,0	69,9
Teor total identificado			76,5	76,3

Fonte: Próprio autor. <sup>a</sup>Constituintes químicos listados de acordo com ordem de eluição em coluna OV-5. <sup>b</sup>IK= Índices de Kovats da literatura (ADAMS, 2007). <sup>c</sup>IK = Índices de Kovats corrigidos para OERA e OERP. <sup>d</sup>Percentual obtido por CG-EM.

Na figura 9 estão representadas as estruturas químicas dos constituintes majoritários, encontrados para os óleos essenciais de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*.

Figura 9- Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais das partes aéreas de *R. asperula* (OERA) e *R. paniculata* (OERP).



Fonte: Próprio autor. (1) óxido de cariofileno; (2) (E)-cariofileno; (3) cariofila-4(12),8(13)-dien-5β-ol; (4) δ-amorfeno e (5) espatulenol.

Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides, incluindo os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Esta é a primeira descrição dos óleos essenciais de ambas as espécies vegetais estudadas. E a segunda para o gênero *Ruellia*. O primeiro relato da composição volátil deste gênero foi descrito por Facundo e colaboradores (2005), que na ocasião, realizaram o estudo do óleo essencial de *Ruellia menthoides*.

Apesar da família Acanthaceae, apresentar um número significativo de gêneros, dos quais fazem parte 2500 espécies, há poucos estudos relacionados à composição química de óleos essenciais para esta família (FACUNDO; PINTO; REZENDE, 2005).

## 6.2 Atividade antimicrobiana

### 6.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Considerando que os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados, especialmente no controle de processos infecciosos, foram realizados ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* (OERA) e *Ruellia paniculata* (OERP), sobre as cepas: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus sobrinus* ATCC 6715, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182.

No presente estudo utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima CIM, que foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos. Os óleos essenciais de *Ruellia asperula* (OERA) e *Ruellia paniculata* (OERP), exerceram atividade antimicrobiana diferentes para as diversas cepas testadas, apresentando valores da CIM variando de 125 a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4, p.53, referente ao OERA e Tabela 5, p.54, no que se refere ao OERP.

No tocante ao OERA, este óleo apresentou CIM de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. mutans*, *S. oralis* e *S. sobrinus*. Para *S. parasanguinis* o valor da CIM foi de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Embora OERA não tenha exibido valores de CIM para *S. salivarius*, este óleo levou a redução de aproximadamente 90% do crescimento planctônico deste micro-organismo na concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 50%, na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O OERA, ainda mostrou-se capaz de interferir no crescimento das bactérias Gram-negativas, onde a concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ocasionou redução de cerca de 20% no crescimento de *Klebsiella oxytoca* e a diminuição de 30% no que refere-se a *Pseudomonas aeruginosa* (Dados não mostrados).

Tabela 4- Suscetibilidade *in vitro* dos micro-organismos testados em contato com o OERA e Clorexidina(CHX).

Micro-organismo	Fonte	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CBM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM CHX ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	500	-	0,122
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	500	-	0,122
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ATCC 903	250	-	0,122
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073	-	-	0,122
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715	500	500	0,122
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-	125
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182	-	-	125

Fonte: Próprio autor

No que diz respeito ao OERP, o mesmo exibiu CIM de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. oralis* e *S. sobrinus*, já para *S. mutans*, a CIM foi observada a  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As demais cepas não demonstraram suscetibilidade com relação à CIM, no entanto sofreram redução considerável no crescimento bacteriano, onde o OERP foi capaz de reduzir 40% do crescimento de *S. salivarius* na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e 20% na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Dados não mostrados).

Sobre *S. parasanguinis*, as concentrações  $500$  e  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  deste óleo, causaram decréscimo de 40 e 30%, respectivamente.

No que concerne as estirpes Gram-negativas, *Klebsiella oxytoca* não mostrou-se suscetível a nenhuma das concentrações testadas do OERP. No entanto, sobre *P. aeruginosa* o referido óleo exibiu efeito considerável, onde as concentrações de  $500$  e  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram responsáveis pela redução de 40 e 30% no crescimento deste micro-organismo (Dados não mostrados).

Tabela 5- Suscetibilidade *in vitro* dos micro-organismos testados em contato com o OERP e Clorexidina(CHX).

Micro-organismo	Fonte	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CBM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM CHX ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	125	-	0,122
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 7073	500	500	0,122
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ATCC 903	-	-	0,122
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 10557	-	-	0,122
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715	500	500	0,122
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-	125
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182	-	-	125

Fonte: Próprio autor

Produtos fitoquímicos são rotineiramente classificados como antimicrobianos sobre a base de testes de suscetibilidade que produzem efeitos inibidores de crescimento na gama de 100 a 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (BORGES *et al.*, 2012).

Para resultados baseados em valores de CIM, o critério proposto por Dalmarco e colaboradores (2010) para classificar potência de produtos vegetais, consiste nos seguintes parâmetros: atividade excelente - CIM abaixo de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; atividade moderada - CIM entre 100 e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; atividade fraca - CIM entre 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e inativos - CIM acima de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Considerando os critérios da literatura, os valores da CIM determinados para os referidos óleos apresentam uma atividade biológica moderada.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) também foi avaliada (Tabela 4 e 5, p.53), através da CBM é possível determinar a quantidade mínima do agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, sendo possível avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON; FINEGOLD, 1990). A CBM foi obtida na concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. sobrinus* quando expostas ao óleo essencial de *Ruellia asperula* (OERA) e o mesmo valor de CBM foi observado para *S. oralis* e *S. sobrinus* expostas ao óleo essencial de *Ruellia paniculata* (OERP). Contudo, os óleos não apresentaram efeito para as demais cepas, onde foi possível observar o crescimento das células bacterianas.

Desta forma, os óleos testados exerceram efeito bactericida sobre duas espécies de *Streptococcus* que compõe a placa dental: *S. oralis* e *S. sobrinus*.

Destaca-se a relevância dos resultados obtidos para OERA e OERP, diante do fato de que as principais estratégias para prevenir a cárie dental são inibir o crescimento dos estreptococos e/ou inibir a aderência destas bactérias a superfície dos dentes (KOO *et al.*, 2002).

A ausente atividade inibitória dos óleos essenciais sobre as bactérias Gram-negativas, segundo Nazzaro *et al.*, (2013), pode estar relacionada com as diferenças estruturais existente entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pelo fato destas, apresentarem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS), responsáveis pelo caráter hidrofílico da superfície, dificultando a penetração das substâncias hidrofóbicas tais como os constituintes de muitos óleos essenciais (DORMAN; DEANS, 2000). Os resultados encontrados no estudo estão em conformidade com os dados mostrados na literatura, uma vez que as bactérias Gram-positivas mostraram uma maior suscetibilidade aos óleos.

Os produtos naturais têm sido usados como uma fonte importante de agentes terapêuticos ao longo da história humana, mostrando-se promissores para o desenvolvimento de novas drogas. Na área odontológica, há também um interesse crescente em produtos naturais como agentes para a prevenção de doenças orais, particularmente doenças relacionadas com o biofilme, como a cárie dentária (PANDIT; CHANG; JEON, 2013).

Deve-se ressaltar a importância deste trabalho, pois até o presente momento, não foi encontrado na literatura qualquer referência com relação à atividade antimicrobiana de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*.

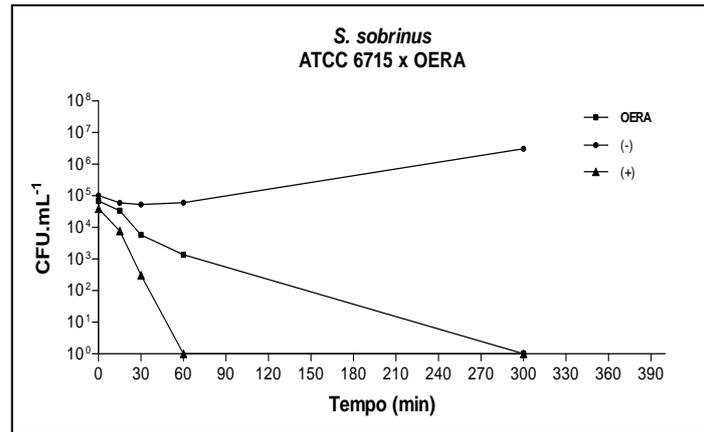
Este estudo é o primeiro a relatar esta atividade para os referidos óleos. Há apenas um achado na literatura sobre atividade antimicrobiana de uma espécie do gênero *Ruellia*, ainda assim, o estudo foi realizado utilizando diferentes métodos de extração e diferentes estirpes bacterianas. Na ocasião Arirudran e colaboradores (2011), testaram extratos de *Ruellia tuberosa* L. contra, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella*, *Staphylococcus spp*, *Serratia*, *Bacillus spp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, e *Candida tropicalis*, utilizando o método de difusão em disco. Os resultados apontam a espécie estudada pelos autores, como um antimicrobiano promissor.

### **6.2.2 Curva de tempo de morte**

Considerando que o OERA apresentou CBM sobre *S. sobrinus*, e o OERP apresentou CBM sobre *S. oralis* e *S. sobrinus*, avaliou-se detalhadamente o momento da ação

dos referidos óleos, a partir da realização da curva de morte das cepas, após exposição em diferentes intervalos de tempo. O resultado apresentado é bastante significativo, visto que a atividade bactericida do OERA sobre a cepa de *S. sobrinus* iniciou-se logo após 60 minutos de incubação. Neste ponto, observou-se redução de  $2 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> do inóculo inicial, atingindo a redução total após 5 horas (300 minutos) de contato (Figura 10, p.56).

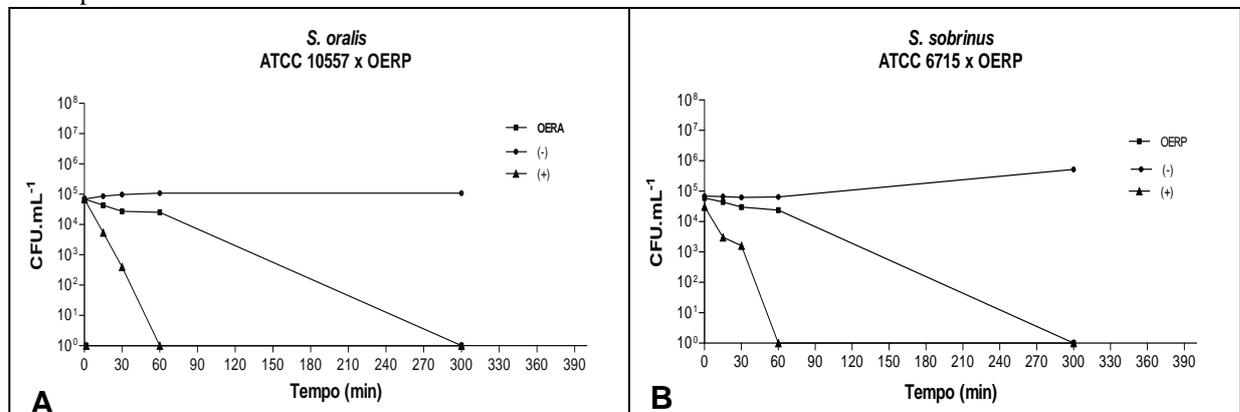
Figura 10 - Curva de morte de *S. sobrinus* após exposição ao OERA por diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Próprio autor. Óleo essencial *R. asperula* (OERA); Controle do crescimento da bactéria (-) e Controle da Clorexidina (+).

No que se refere ao OERP sobre as cepas de *S. oralis* e *S. sobrinus*, o óleo exibiu atividade bactericida semelhante para as duas bactérias, causando uma redução de  $5 \log_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> da viabilidade comparado com o controle negativo, após 5 horas de incubação (Figura 11).

Figura 11 - Curva de morte de *S. oralis* (A) e *S. sobrinus* (B) após exposição ao OERP por diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Próprio autor. Óleo essencial *R. paniculata* (OERP); Controle do crescimento da bactéria (-) e Controle da Clorexidina (+).

De acordo com a curva de morte, OERA e OERP exerceram atividade bactericida frente às cepas testadas, culminando na redução máxima do número de colônias no tempo de contato de 5 horas. Os resultados apresentados são bastante significativos, visto que a literatura relata o efeito bactericida como a redução de 99,9% ou valores superiores ou iguais a  $3 \log_{10}$  da contagem total de UFC a partir do inóculo inicial, sobre um tempo de incubação menor ou igual a 24 horas. A atividade bacteriostática é descrita como um decréscimo inferior a  $2 \log_{10}$  na contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> (JONES; ANDEREGG; ESHPANDE, 2002; KAKA *et al.*, 2006; LEMAIRE *et al.*, 2011).

Devido à natureza complexa dos óleos essenciais, ficaria difícil atribuir à atividade observada a qualquer componente único presente no mesmo. Portanto, para se conhecer o modo de ação dos óleos seria necessário examinar separadamente cada componente do óleo essencial, e a combinação para averiguar se os constituintes químicos têm ação inibitória isolados ou em sinergismo (ANGÉLICO, 2011).

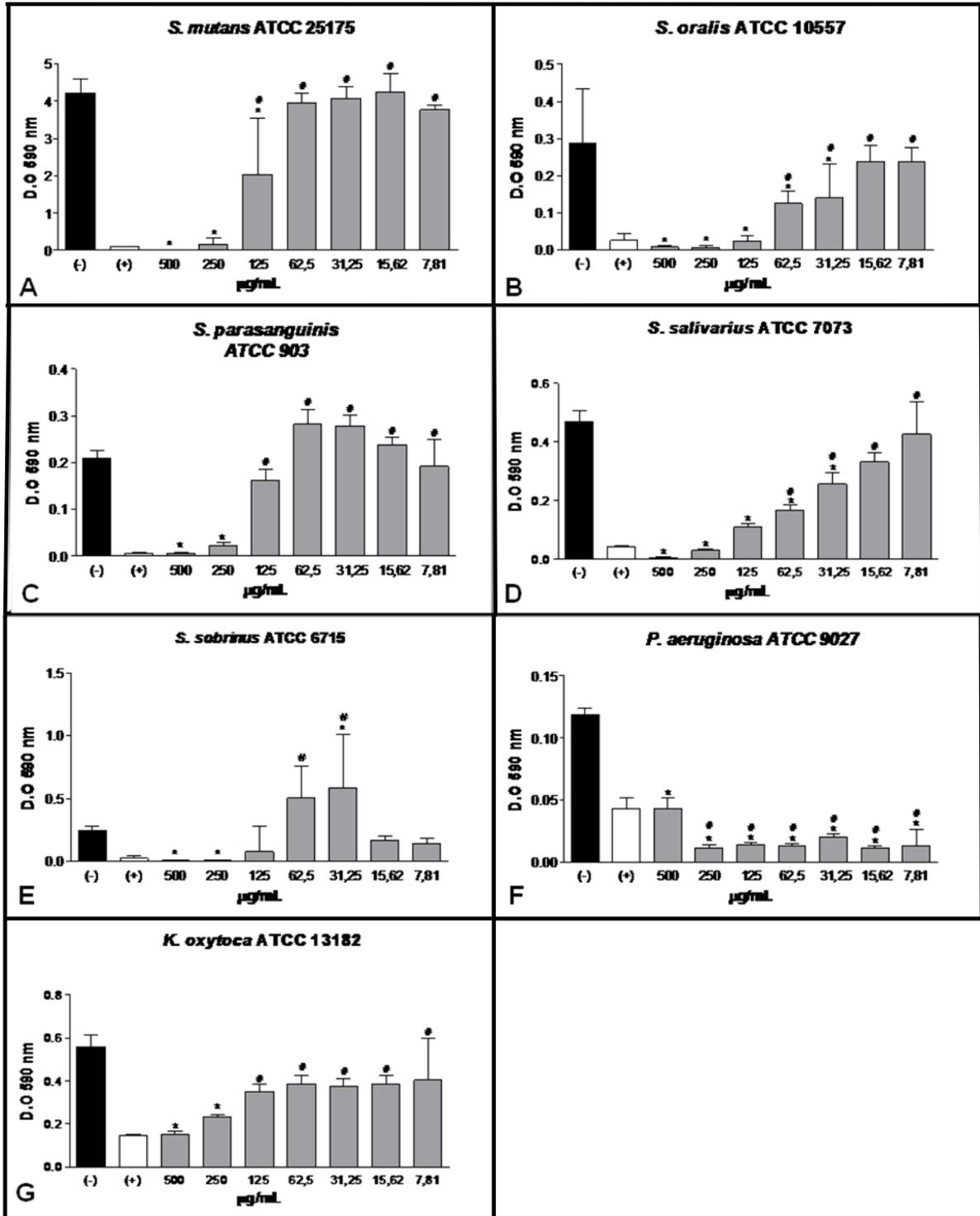
### **6.2.3 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV) e Enumeração das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)**

A formação de biofilme está entre os principais passos na patogênese bacteriana e no desenvolvimento de resistência antimicrobiana (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Neste estudo, investigou-se a capacidade de OERA e OERP de prevenir a formação *in vitro* do biofilme das cepas supracitadas. As amostras testadas apresentaram interferência sobre o crescimento do biofilme durante 24 horas, as análises dos dados mostram diferença estatística  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo.

O OERA interferiu na formação do biofilme de todas as bactérias testadas. *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius* e *S. sobrinus*, sofreram uma redução pronunciada a partir da concentração de 250 µg.mL<sup>-1</sup>, exibindo decréscimo de cerca de 90-100% do biofilme microbiano (Figura 12). *K. oxytoca* sofreu redução de aproximadamente 60-70% nas concentrações de 500 e 250 µg.mL<sup>-1</sup> e de cerca de 30% para as demais concentrações (Figura 12G, p.58). No que se refere à formação do biofilme de *P. aeruginosa*, a redução foi em torno de 60% na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup> e de aproximadamente 90% para as demais concentrações (Figura 12F, p.58).

Figura 12- Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do OERA sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* ATCC 25175, *S. oralis* ATCC 10557, *S. parasanguinis* ATCC 903, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. sobrinus* ATCC 6715, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. oxytoca* ATCC 13182.



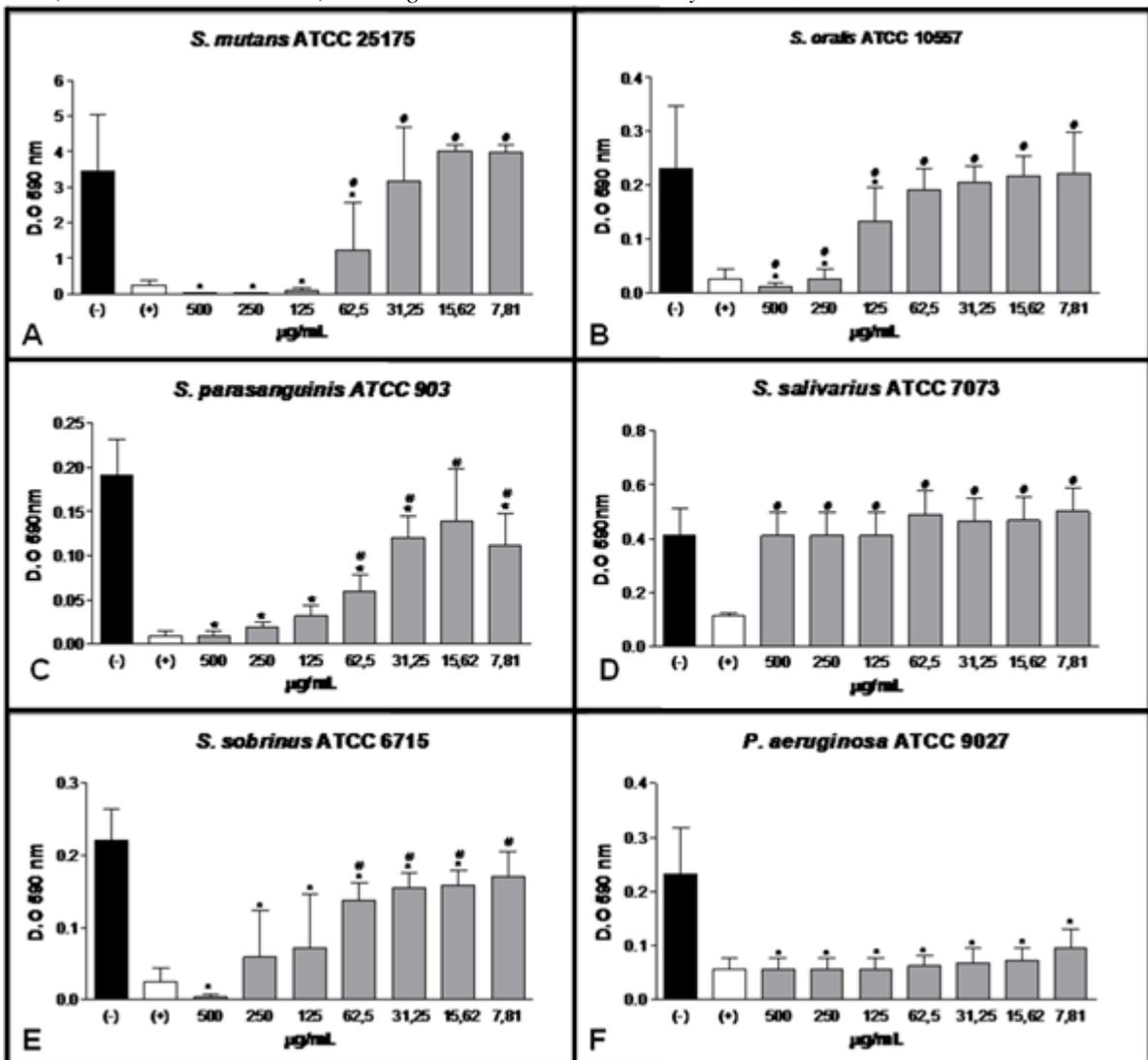
Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,05$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,05$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, n=18.

No que concerne ao OERP, o mesmo apresentou atividade sobre *S. mutans*, *S. oralis* e *S. sobrinus* interferindo significativamente na formação do biofilme destas cepas, quando comparado ao controle negativo (Figura 13A, 13B e 13E, p.59).

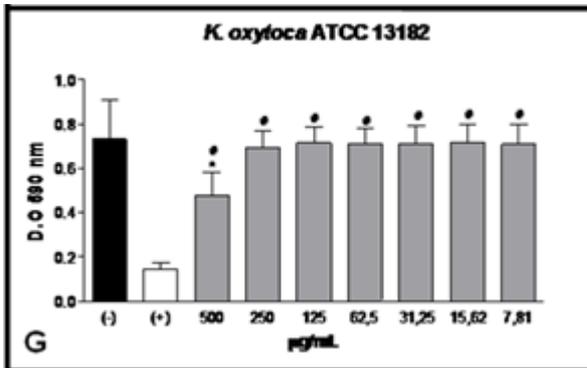
*S. mutans*, chama atenção pela acentuada atividade, exibindo efeito a partir da concentração de 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com a redução de aproximadamente 99% do biofilme (Figura 13, p.59).

OERP também mostrou-se capaz de interferir na formação dos biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. oxytoca* (Figura 13F e 13G, p.59). Com destaque para a ação sobre *P. aeruginosa*, para a qual o óleo ocasionou redução de aproximadamente 80% do biofilme, em todas as concentrações testadas.

Figura 13- Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do OERP sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* ATCC 25175, *S. oralis* ATCC 10557, *S. parasanguinis* ATCC 903, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. sobrinus* ATCC 6715, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. oxytoca* ATCC 13182.



Continua. Figura 13- Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do OERP sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* ATCC 25175, *S. oralis* ATCC 10557, *S. parasanguinis* ATCC 903, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. sobrinus* ATCC 6715, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. oxytoca* ATCC 13182.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,05$  estatisticamente significante em relação ao controle negativo, #  $p < 0,05$  estatisticamente significante em relação ao controle positivo,  $n=18$ .

Para quantificar a biomassa total dos biofilmes, utilizou-se a metodologia da coloração de violeta cristal. Neste método tanto as células vivas, quanto mortas, bem como a matriz extracelular são marcadas pelo corante, por este motivo, este método é pouco adequado para avaliar a suscetibilidade das células do biofilme (LI;YAN; XU, 2003).

A fim de confirmar se os óleos essenciais eram bactericidas, sendo capazes de inviabilizar as células do biofilme, realizou-se a enumeração da unidades formadoras de colônias (UFC).

Para este ensaio, foram selecionadas *S. oralis*, *S. sobrinus*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*. As espécies de *Streptococcus* foram escolhidas considerando a pronunciada suscetibilidade que exibiram nos ensaios de quantificação da biomassa, e a indiscutível participação destes micro-organismos no estabelecimento da cárie dentária. *P. aeruginosa*, foi incluída por ser uma bactéria Gram-negativa de relevante importância clínica, frequentemente associada a infecções hospitalares além de ter sofrido uma acentuada redução com relação a formação de biomassa.

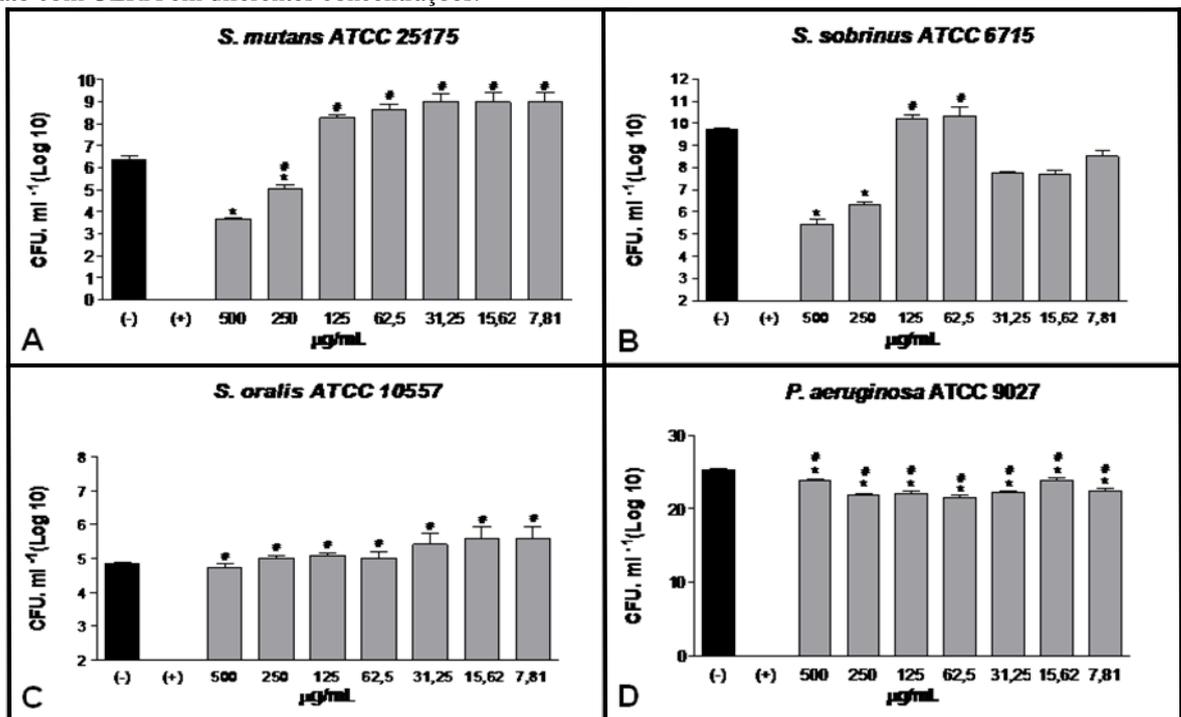
Após a enumeração das células viáveis, observou-se que nas concentrações de 250-500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o OERA promoveu a redução significativa da viabilidade celular de *S. mutans* e *S. sobrinus*, quando comparado com o controle negativo. No entanto, não exibiu efeito sobre o número de UFCs de *S. oralis* e *P. aeruginosa*.

Apesar de ter mostrado uma redução considerável para formação do biofilme relacionada a biomassa, OERA não foi capaz de eliminar as células do biofilme, levando apenas a uma interferência no número de células bacterianas viáveis (Figura 14, p.62).

Na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *S. sobrinus*, sofreu redução de 4  $\log_{10}$  no número de UFCs, em comparação com os valores do controle negativo (Figura 14B).

*S. mutans* (Figura 14A) teve redução de aproximadamente 2  $\log_{10}$  de suas células viáveis na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Já *S. oralis* e *P. aeruginosa*, não evidenciaram efeito do OERA com relação a viabilidade celular (Figura 14C e D).

Figura 14- Contagem das UFCs de *S. mutans* (A), *S. sobrinus* (B), *S.oralis* (C) e *P. aeruginosa* (D) quando em contato com OERA em diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■), Clorexidina (□), \*  $p < 0,05$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,05$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo,  $n=9$ .

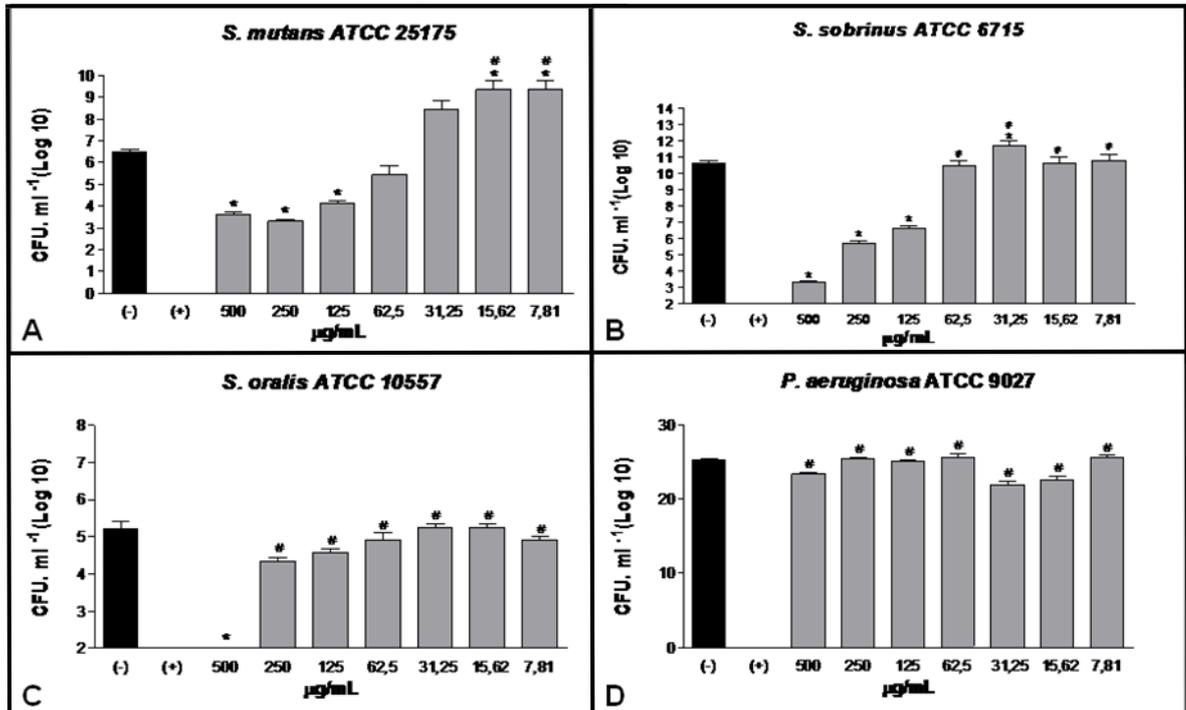
No que tange aos resultados com OERP, o mesmo foi capaz de interferir sobre *S. mutans*, *S. oralis* e *S. sobrinus*. No entanto não mostrou efeito para *P. aeruginosa*.

A ação do OERP sobre *S. mutans*, ocasionou redução considerável no número de células deste micro-organismo, culminando na redução de 3  $\log_{10}$  na contagem total de UFCs nas concentrações de 125, 250 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

OERP quando em contato com *S. oralis*, exerceu atividade bactericida, pois não houve colônias viáveis para contagem na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , assemelhando-se ao efeito da clorexidina (controle positivo). No entanto as demais concentrações não promoveram redução significativa no número de UFCs, quando comparado com o controle negativo (Figura 15C, p.63).

O óleo não foi capaz de eliminar as células de *S. sobrinus*, no entanto reduziu drasticamente o número de células viáveis da referida cepa, causando redução de 7 log<sub>10</sub> na contagem total de UFCs na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Figura 15- Contagem das UFCs de *S. mutans* (A), *S. sobrinus* (B), *S.oralis* (C) e *P. aeruginosa* (D) quando em contato com OERP em diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (□), BHI com 4% DMSO (■), Clorexidina (□), \* p < 0,05 estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, # p < 0,05 estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, n=9.

As bactérias em biofilmes se comportam de forma diferente comparadas a bactérias na forma planctônica, especialmente em termos de resposta ao tratamento com antibióticos (DONLAN, 2001). É bem estabelecido que biofilmes são cerca de 10-1000 vezes mais resistentes que suas formas planctônicas (SIMÕES, 2011). A estrutura complexa do biofilme envolvido por sua matriz polimérica extracelular pode impedir antibióticos de atingir as bactérias. Além disso, micro-organismos em biofilmes podem adotar um crescimento lento ou estado metabólico baixo devido ao microambiente alterado (CHEN; YU; SUN, 2013).

Agentes antimicrobianos podem ter diferentes modos de ação, ou seja, eles podem afetar adversamente a adesão inicial de micro-organismos, alterando a energia livre de superfície do substrato ou a hidrofobicidade da parede bacteriana eles também podem afetar a viabilidade celular, interferindo na cadeia transportadora de elétrons, ou podem causar alterações na matriz extracelular, o que pode afetar a estrutura do biofilme (PEREIRA; VIEIRA, 2001).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) é responsável pela morfologia, estrutura, coerência e pelas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A interrupção ou degradação da matriz polimérica extracelular de biofilmes pode enfraquecer e dispersar estas comunidades. Uma série de estudos relatam efeitos relacionados à degradação de componentes da matriz, como polissacarídeo, eDNA e proteínas (CHEN; YU; SUN, 2013).

Os OERA e OERP mostram-se capaz de interferir na formação dos biofilmes, reduzindo consideravelmente a biomassa. Este efeito pode estar relacionado com a ação dos óleos essenciais (OERA e OERP) sobre o crescimento bacteriano. Dado que o desenvolvimento do biofilme bacteriano tem início com a adesão das bactérias na forma planctônica à superfície, a redução destas, pode interferir na formação do biofilme.

A literatura reporta diversos estudos relacionados à ação antimicrobiana exercida por óleos essenciais sobre biofilmes. Por exemplo, no estudo de Rasooli e colaboradores (2008), *Mentha piperita* apresentou acentuada atividade inibitória frente ao biofilme formado por *Streptococcus mutans*, sendo essa atividade superior a da clorexidina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ao avaliar a atividade de óleos essenciais (OEs) contra *S. mutans*, Galvão e colaboradores (2012) relataram efeitos dos OEs sobre o biofilme de *S. mutans*. Outro estudo reporta que o óleo essencial de *Satureja hortensis* L. exibiu efeitos anti-biofilme contra *Prevotella nigrescens* em doses sub-inibitórias (GURSOY *et al.*, 2009).

Observamos neste estudo uma significativa redução da biomassa sem afetar a viabilidade das células do biofilme. Resultados semelhantes foram descritos por Monteiro *et al.* (2012), quando observaram que nanopartículas de prata causaram redução considerável da biomassa de espécies de *Candida* sem eliminar as células do biofilme.

Diante dos resultados obtidos e baseados em registros da literatura (MILLEZI *et al.*, 2012; NOSTRO *et al.*, 2007), sugerimos que os OEs exercem efeito sobre a matriz de EPS, que por sua vez tem a formação prejudicada.

A contagem das UFCs de *S. oralis* demonstrou que o OERP exerceu efeito bactericida sobre este micro-organismo, pois foi capaz de promover a eliminação das células bacterianas (na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Estes dados estão em consonância aos encontrados nos ensaios de determinação da CIM e CBM, nos quais a atividade antimicrobiana é expressa nas maiores concentrações do OERP (500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), exercendo desta forma, atividade em modelo dose-resposta.

Não se sabe ao certo o mecanismo de ação pelo qual o OERP exerce efeito sobre as células de *S. oralis*, porém os dados da literatura mostram que o principal sítio de ação dos

óleos essenciais é geralmente a membrana plasmática (COWAN, 1999; COX *et al.*, 2000; DORMAN; DEANS, 2000). Este fato está diretamente relacionado com a presença dos constituintes terpenóides dos óleos essenciais. Tem sido demonstrado que os terpenos são ativos contra diversos tipos de micro-organismos (MIRANDA *et al.*, 2013).

Estes constituintes interferem na integridade e funcionamento da membrana celular através da mudança do potencial de membrana, com consequente perda do material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória (GREAY; HAMMER, 2011). A hidrofobicidade destes compostos lhes permite segmentar a bicamada lipídica bacteriana, alterando sua estrutura e aumentando a sua permeabilidade a prótons, íons e outros constituintes celulares (GUINOISEAU *et al.*, 2010). Além de alterações de membrana, os OEs também podem atravessar a membrana celular, penetrando assim na célula e interagindo com locais intracelulares (CRISTANI *et al.*, 2007).

Tendo em vista as várias alterações produzidas e o grande número de componentes químicos de óleos essenciais, é possível que os efeitos produzidos pelos óleos em estudo não sejam atribuíveis a um mecanismo específico. Por este motivo, um estudo aprofundado é necessário para a plena compreensão da maneira pela qual os óleos podem interagir com a membrana bacteriana e as conseqüências que trazem a nível celular.

## *Capítulo 8 – Conclusões*

---

## 8 CONCLUSÕES

A análise dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* e *Ruellia paniculata*, resultou na identificação de dezesseis constituintes, representando 76,3% a 76,5% da composição dos óleos. Em ambos os óleos os constituintes predominantes foram os sesquiterpenos, entretanto no óleo essencial de *R. asperula*, constatou-se um elevado teor de sesquiterpenos oxigenados (53,6%). Este estudo constitui o segundo trabalho de óleo essencial registrado para o gênero *Ruellia*. Com relação a atividade antimicrobiana, OERA e OERP demonstraram atividade *in vitro* contra duas bactérias relevantes no processo cariogênico: *S. oralis* e *S. sobrinus*, e contra *P. aeruginosa* um dos patógenos mais frequentemente relacionados a infecções hospitalares. Sendo que o OERP exerceu o melhor efeito entre os óleos testados, ocasionando a inibição do crescimento planctônico, bem como a eliminação de células do biofilme de *S. oralis*. A luz de que é cada vez maior a preocupação com os casos de resistência a antibióticos, estes resultados mostram que a utilização de produtos naturais pode representar uma potencial fonte de compostos bioativos e uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas. Contudo, estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de averiguar a toxicidade, visando uma possível utilização destes óleos como fitoterápicos antimicrobianos.

## *Referências Bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T. *et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 1-8, apr. 2011.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry. 4. ed. **Illinois: Allured Publishing Corporation**, 2007.
- ADESEGUN, S. A. *et al.* Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. (Acanthaceae). **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 6, n. 2, p. 227-231, jun. 2009.
- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunol. Med. Mic.**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.
- AHMAD, V. U. *et al.* 2-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl glycerol hexaacetate from *Ruellia brittoniana*. **J. Nat. Prod.**, v. 53, p. 960- 963, 1990.
- AHMED, S. B.H. *et al.* Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). **Nat. Prod. Res.**, v. 25, p. 1195-1201, 2011.
- AIMUTIS, R. W. Lactose cariogenicity with an emphasis on childhood dental caries. **Int. Dairy J.**, v. 22, p. 152-158. 2012.
- AKCALI, A. *et al.* Periodontal diseases and stress: a brief review. **J. Oral Rehabil.**, v. 40, n. 1, p. 60-68, jan. 2013.
- ALLISON, D. G. The Biofilm Matrix. **Biofouling**, v. 19, n. 2, p. 139-150, 2003.
- AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.
- ANGÉLICO, E.C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL.** 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Saúde Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, 2011.
- ANVISA. Ministério da Saúde. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, Brasília, DF, 2004.
- AODHÁN, S. B. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v. 41, n. 11, p. 649-653, nov. 2013.
- ARIRUDRAN, B.; SARASWATHY, A.; KRISHNAMURTHY, V. Antimicrobial Activity of *Ruellia tuberosa* L.(Whole Plant). **Phcog. J.**, v. 3, n. 23, p. 91-95, July 2011.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils-a review. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 2, p. 446-75, feb. 2008.

BALDANI, M. H.; NARVAI, P. C.; ANTUNES, J. L. F. Cárie dentária e condições sócio-econômicas no Estado do Paraná, Brasil, 1996. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 755-763, mai./jun. 2002.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. Methods for testing antimicrobial effectiveness. **Bailey and Scott's diagnostic microbiology**, 8ª ed. St. Louis: C. V. Mosby, p.171-194, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.6 79-688, 2009.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications.** CRC Press NW, 2010.

BATONI, G. *et al.* Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 256-279, jun. 2011.

BORDI, C.; BENTZMANN, S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. **Ann. Intensive Care.**, v. 19, p. 1-8, 2011.

BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling.**, v. 28, n.7, p. 755-767, jul. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - Resultados Principais.** Brasília, DF, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 223-53, aug. 2004.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, fev. 2000.

CAMARGO, E. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** (Erva Mate) Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

CAMILI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113-1116, feb. 2006.

CARDOSO, H. T.; SANTOS, M. L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Bras. Med.**, São Paulo, v. 62, p. 67-70, 1948.

CARVALHO, A.C.B. *et al.* Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. **Flores da caatinga/Caatinga flowers**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011.

CAVALCANTE, G. M. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 9, n. 2, 2013.

CERQUEIRA, D. F. **Etiologia e epidemiologia da cárie dentária**. Especialização em Saúde da Família-Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHATTERJEE, S. K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G. Isolation and identification of bioactive antibacterial components in leaf extracts of *Vangueria spinosa* (Rubiaceae). **Asian. Pac. J. Trop. Med.**, v. 4, n. 1, p. 35-40, jan. 2011.

CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Asteracantha longifolia* (L.) Nees, Acanthaceae: chemistry, traditional, medicinal uses and its pharmacological activities - a review. **Rev. bras. Farmacogn.**, v.20, n.5, p. 812-817, oct./nov. 2010.

CHEN, M.; YU, Q.; SUN, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 9, p. 18488-18501, sept. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty informational supplement, approved standard MS100-S20**. Wayne, PA: CLSI, 2010.

COGAN, N. G. Effects of persister formation on bacterial response to dosing. **J. Theor. Biol.**, v. 238, n. 3, p. 694-703, feb. 2006.

COIMBRA, M. B. *et al.* Relação entre risco à cárie dentária e variáveis socioeconômicas e demográficas em usuários da Estratégia Saúde da Família no município de Amparo, SP: um estudo longitudinal. **Arq. Odontol.**, v. 48, n. 3, p. 142-150, jul./set. 2012.

CORTELLAZZI, K. L. *et al.* Influência de variáveis socioeconômicas, clínicas e demográfica na experiência de cárie dentária em pré-escolares de Piracicaba, SP. **Ver. Bras. Epidemiol.**, v. 12, n. 3, p. 490-500, 2009.

COS, P. *et al.* Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. **Curr. Pharm. Design.**, v. 16, n. 20, p. 2279-2295, 2010.

COSTA, E. V. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteropsis species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1895-1899, jun. 2008.

- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, n. 4, p. 564-582, oct. 1999.
- COX, S. D. *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, n. 1, p. 170-175, jan. 2000.
- COX, G.; WRIGTH, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, aug. 2013.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. de. Óleos essenciais e química fina (divulgação). **Quim. Nova**, 1993.
- CRISTANI, M. *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, July 2007.
- DALMARCO, J. B. *et al.* Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus corniculatus* var. São Gabriel. **Int. J. Green Pharm.**, v. 4, n. 2, p. 108-114, 2010.
- DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 261-289, jun. 2004.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 847-867, dec. 2000.
- DAWIDOWICZ, A. L. *et al.* Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 878-84, aug. 2008.
- DE CARVALHO, R. B. F. *et al.* Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1375-1379, 2013.
- DE-LA-CRUZ, H.; VILCAPOMA, G.; ZEVALLOS, P. A. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 2, p. 284-294, may 2007.
- DERELI, N. *et al.* Three-year evaluation of nosocomial infection rates of the ICU. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 63, n. 1, p. 73-78, jan./feb. 2013.
- DESCHAMPS, C. *et al.* Avaliação sazonal do rendimento do óleo essencial em espécies de menta. **Ciênc. Agrotec.**, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.
- DHARMAGADDA, V. S. S. *et al.* Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 11, p. 1235-1240, July 2005.
- DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p. 277-281, mar./apr. 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881-890, sept. 2002.

DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends. Microbiol.**, v. 17, n. 2, p. 66-72, feb. 2009.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, apr.2002.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. App. Microbiol.**, v. 88, n. 2, p. 308-316, fev. 2000.

DUARTE, M.C.T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Braz. J. Pharm.**, v.14, supl.1, p. 6-8, 2004.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 4, p. 308-323, apr. 2007.

ERRIU, M. *et al.* Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. **Ultrason. Sonochem.**, v. 21, n. 1, p. 15-22, jan. 2014.

FACUNDO, V. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Aroma compounds and volatile chemical composition of *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern. **Flavour Frag. J.**, p. 93-95, 2005.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 25, n. 1, p. 5-12, feb 1997.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos, 2005.

FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Risk assessment in dental caries. In: BADER, J. D. **Risk assessment in dentistry.** Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology, p. 215-217, 1990.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.** , v. 8, p. 623-633, sept. 2010.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton Nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2008.

FONTENELLE, R. O. S. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.59, n. 5, p. 934-940, may 2007.

FU, T. Chinese medicinal composition for treating psoriasis. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2008.

- GALVÃO, L. C. C. *et al.* Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, p. 1-12, 2012.
- GIACAMAN, R. A.; ARANEDA, E.; PADILLA, C. Association between biofilm-forming isolates of mutans streptococci and caries experience in adults. **Arch. oral biol.**, v. 55, p. 550-554, 2010.
- GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochem. Rev.**, v. 123, p. 1-6, may. 2011.
- GUINOISEAU, E. *et al.* Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.**, v. 29, n. 7, p. 873-879, July 2010.
- GURSOY, U. K. *et al.* Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. **Anaerobe**, v. 15, n. 4, p. 164-167, Aug. 2009.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 95-108, 2004.
- HAMMER, K.A. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activity of five Taxandria fragrans oils in vitro. **Microbiol. and immunol.**, v.52, n. 11, p. 522-530, Nov. 2008.
- HOFFMANN, K. M.; DEUTSCHMANN, A.; WEITZER, C.; JOAINIG, M.; ZECHNER, E.; HOGENAUER, C.; HAUER, A. C. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. **Pediatrics.**, v. 125, n. 4, Apr. 2010.
- HOIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International J. Antimicrob. Agents**, v. 35, p. 322-332, 2010.
- HOLETZ, F.B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027-1031, Jul. 2002.
- HOUT, S. *et al.* Screening of selected indigenous plants o Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, p. 12-18, 2006.
- INDRIUNAS, A. **Revisão taxonômica de *Herpetacanthus* Nees (Acanthaceae).** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) -Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.
- JAGANI, S.; CHELIKANI, R.; KIM, D.S. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling.**, v. 25, n. 4, p. 321-324, 2009.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 236, n.2, p. 163-173, July 2004.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZD2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicina or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 87-90, may 2002.

KAKA, A. S. *et al.* Bactericidal activity of orally available agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 3, p. 680-683, July 2006.

KAMRUZZAMAN, M.; BARI, S. M.; FARUQUE, S. M. In vitro and in vivo bactericidal activity of *Vitex negundo* leaf extract against diverse multidrug resistant enteric bacterial pathogens. **Asian. Pac. J. Trop. Med.**, v. 6, n. 5, p. 352-359, May 2013.

KATSURA, H. *et al.* In Vitro Antimicrobial Activities of Bakuchiol against oral microorganisms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 11, p. 3009-3013, 2001.

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 4, p. 249-258, Apr. 2006.

KOILPILLAI, Y. J.; WILSON, S. In vitro Propagation of *Graptophyllum pictum* L. (Acanthaceae)- A Medicinal plant. **J. Pharm. Res.**, v. 3, n. 9, p. 2201-2202, Sep. 2010.

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 471-480, Apr. 2010.

KOO, H. *et al.* Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, n.6, p. 337-343, Dec. 2002.

LEE, Y.L. *et al.* A Systematic Review on the Anxiolytic Effects of Aromatherapy in People with Anxiety Symptoms. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 17, n. 2, p. 101-108, Feb. 2011.

LEMAIRE, S. *et al.* Activity of moxifloxacin against intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with clindamycin, linezolid and cotrimoxazole and attempt at defining an intracellular susceptibility breakpoint. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, n. 3, p. 596-607, Mar. 2011.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 353-362, Feb. 2003.

LI, Y.; GUO, X. Chinese medicinal composition containing *Ruellia* and *Taraxacum* and others for treating acute tonsillitis). **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2008.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **R. Dental Press. Ortodon. Ortop. Facial**, n. 6, p. 119-130, Nov./dez 2007.

LIMA, M. R. **Estratégias de propagação para espécies subarbustivas de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental.** Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LIN, J. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5030-5039, may 2012.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **J. Hosp. Infect.**, v. 64, n. 4, p. 313-25, dec. 2006.

LOPÉZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R.. Biofilms **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 7, p. 1-11, jun. 2010.

MAGALHÃES, C. F. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. 2010. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2010.

MAH, T.F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, jan. 2001.

MANJI, F. *et al.* A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 19, n. 6, p. 324-328, dec. 1991.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 54, n. 3, p. 441-454, july 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biol. Med.**, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MELO, P.; AZEVEDO, A.; HENRIQUES, M. Cárie dentária – a doença antes da cavidade. **Acta Pediatr. Port.**, v. 39, n. 6, p. 253-259, 2008.

MIRANDA, G. S. *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Rev. bras. plantas med.**, v.15, n.1, p. 104-111, 2013.

MILLER, J.S. The discovery of medicines from plants: a current biological perspective. **Econ. Bot.**, v. 65, n. 4, p. 396-407, dec. 2011.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Ann. Rev Microbiol.**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MILLEZI, F. M. *et al.* Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J. Food Safety**, v. 32, n. 3, p. 351-359, aug. 2012.

MONTEIRO, D. R. *et al.* Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Lett. App. Microbiol.**, v. 54, p. 383-391, jan. 2012.

MORAIS, S. M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quim. nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. **Produtos naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza: EdUECE, 2007.

MOREIRA, Z. Ministério da Saúde. **Portal da saúde- SUS**, 2011. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r\\$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html)>. Acesso em: 21 jan 2014.

NARVAI, P. C. *et al.* Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. **Ver. Panam. Salud Publica**, v. 19, n. 6, p. 385-93, 2006.

NATH, S.; BURAGOHAİN, A. K. Micropropagation of *Adhatoda vasica* Nees-A woody medicinal plant by shoot tip culture. **Indian J. Biotechnol.**, v. 4, p. 396-399, july 2005.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, nov. 2013.

NCCLS; STANDARDS, N. C. F. C. L. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. M62A. ed. Wayne,PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NEWBRUN, E. **Cariology**. 2. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1983.

NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 4, p. 519-523, apr. 2007.

OKA, S. *et al.* *Ruellia brittoniana* Leonard, *Pennisetum sordidum* Koidz, and yeast extractions, and peptides as fibroblast growth factor agonists, topical drugs, and hair growth stimulants. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2008.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n. 3, p. 466-76, 2007.

OLIVEIRA, M.M.M. *et al.* Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OLIVEIRA, R.A.G. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Braz. J. Pharmacog.**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

ONURDAG F. K. *et al.* *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on soft contact lenses. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 249, n. 4, p. 559-564, dez. 2010.

ORTOLANO, G. A. *et al.* Hospital water point-of-use filtration: A complementary strategy to reduce the risk of nosocomial infection. **Am. J. Infec. Control**, v. 33, n. 5, p. 1-19. 2005.

- PANDIT, S.; CHANG, K-W.; JEON, J-G. Effects of *Withania somnifera* on the growth and virulence properties of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub-MIC levels. **Anaerobe**, v. 19, p. 1-8, feb. 2013.
- PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 27-33, jan. 2005.
- PERCIVAL, S. L. *et al.* Introduction to Biofilms. In: PERCIVAL, S. L.; KOTTENBELT, D. C.; COCHRANE, C. A. **Biofilms and Vet. Med.**, Springer Series on Biofilms, 6. ed. London: Springer, p. 41-68, 2011.
- PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Effects of the Interactions Between Glutaraldehyde and the Polymeric Matrix on the Efficacy of the Biocide Against *Pseudomonas fluorescens* Biofilms. **Biofouling.**, v. 17, n. 2, p. 93-101, feb. 2001.
- PERES, K. G. A. *et al.* Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. 402-408, 2000.
- PESSÔA, C. S. DE. **Ruellia L. (Acanthaceae) no Estado de Minas Gerais, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.
- PINTO, F. C. L. *et al.* Constituintes químicos de *Solanum buddleifolium* Sendtn. **Quim. Nova**, v. 36, n. 8, p. 1111-1115, 2013.
- PROFICE, S.R. *et al.* Acanthaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15363>>. Acesso em: 28 novembro 2013.
- RASOOLI, I.; SHAYEGH, S.; ASTANEH, S. D. A. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. **Int. J. Dent. Hygiene**, v. 7, n. 3, p. 96-203, aug. 2009.
- RASOOLI, I. *et al.* Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. **Phytother. Res.**, v. 22, n. 9, p. 1162-1167, 2008.
- SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Ceftolozane/tazobactam activity tested against aerobic Gram-negative organisms isolated from intra-abdominal and urinary tract infections in European and United States hospitals (2012). **J. Infect.**, p. 1-12, apr. 2014.
- SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. **J. Hosp. Infect.**, v.50, n.2, p.140-144, 2002.
- SALES, M.F.; MAYO, S.J.; RODAL, M.J.N. **Florestas serranas de Pernambuco: um checklist da flora ameaçada dos Brejos de Altitude.** Recife, Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998.
- SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng. (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).**

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4, n. 6, 2003.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, v. 369, p. 51-59, 2007.

SHARMA, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan. 2014.

SHIRTLIFF, M.; LEID, J. G. **The Role of Biofilms in Device-Related Infections**. Springer Series on Biofilms, 3. ed. London: Springer, 2009.

SILVA, M. J.; MELO, J. I. M.; SALES, M. F. Flora da região de Xingó, Alagoas e Sergipe: Acanthaceae A. Juss. **Rev. Caatinga**, v. 23, n. 2, p. 59-67, abr/jun. 2010.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JR., A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: de planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2007.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v. 98, n. 3, p. 317-329, apr. 2010.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. The effects of metabolite molecules produced by drinking water-isolated bacteria on their single and multispecies biofilms. **Biofouling.**, v. 27, n. 7, p. 685-699, aug. 2011.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Curr. Med. Chem.**, v.18, n. 14, p. 2129-2145, may 2011.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 9, p. 389-97, sept. 2006.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Bio.**, v. 23, n. 2, p. 136-141, apr. 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R.. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 435-440, jun./jul. 2010.

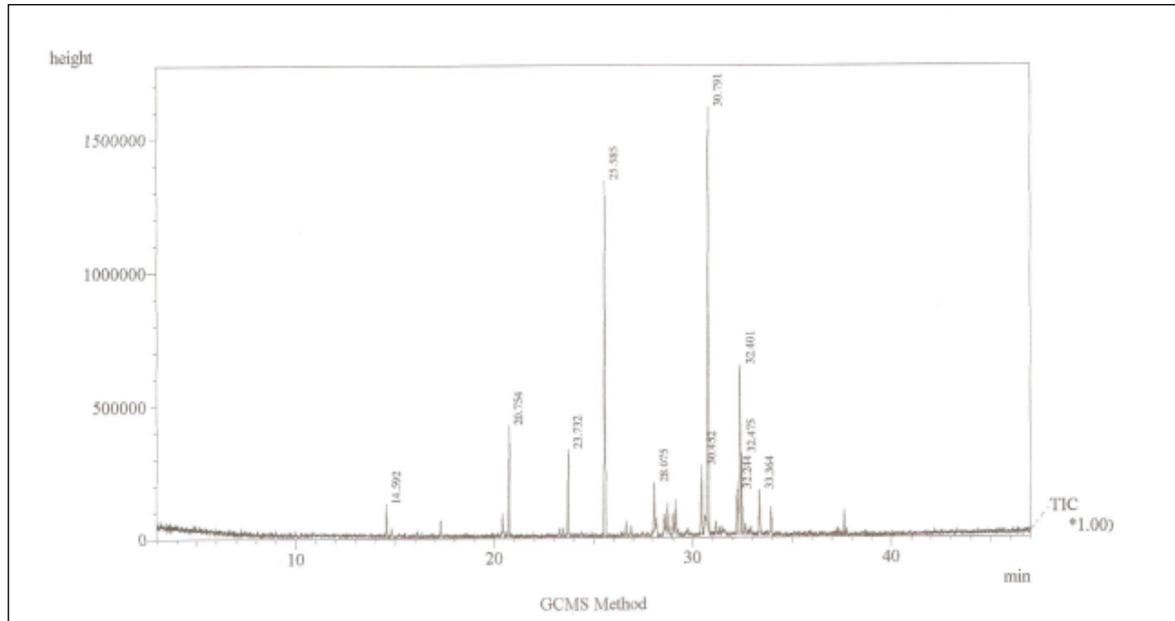
- STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, apr. 2000.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, july 2001.
- SUTHERLAND, I. S. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, jan. 2001.
- SYDNOR, E. R.; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 1, p. 141-173, jan. 2011.
- THAS, J. J. Siddha Medicine-background and principles and the application for skin diseases, **Clin. Dermatol.**, v. 26, p. 62-78, 2008.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TRIPP, E. A.; MANOS, P. S. Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). **Evolution**, v. 62, n. 7, p. 1712-1737, july 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, mai./jun. 2005.
- WANG, W. *et al.* Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. **Peptides**, v. 33, p. 212-219, 2012.
- WILLCOX, M. D. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. **Eye Contact Lens.**, v. 39, n. 1, p. 60-65, jan. 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva, 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_situation/WMS\\_ch18\\_wTraditionalMed.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf)> Acesso em: 18 novembro 2013.
- WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug Deliv. Res.**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, july 2005.
- YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 4, p. 921-924, apr. 2002.
- YANG, D. *et al.* Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v.148, n. 2, p. 79-82, nov. 1999.
- ZACHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Planta medicinal sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: ARGOS, 2001.

ZHANG, Y.; JIN, F. Chinese medicinal composition containing Artemisia and Patrinia and others for treating skin soft furunculosis. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2008.

*ANEXO*

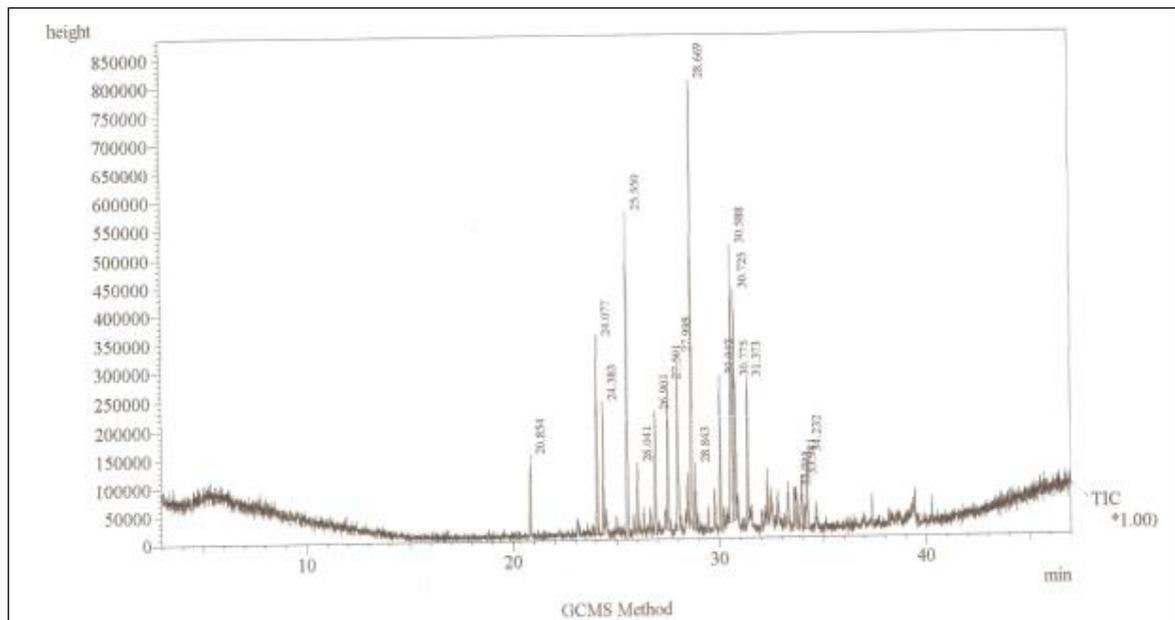
---

**ANEXO A- CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE  
*RUELLIA ASPERULA***



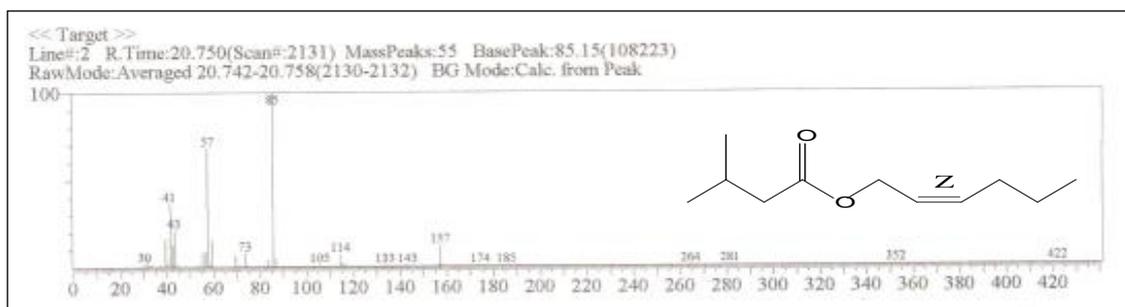
Fonte: Próprio autor.

**ANEXO B- CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE  
*RUELLIA PANICULATA***



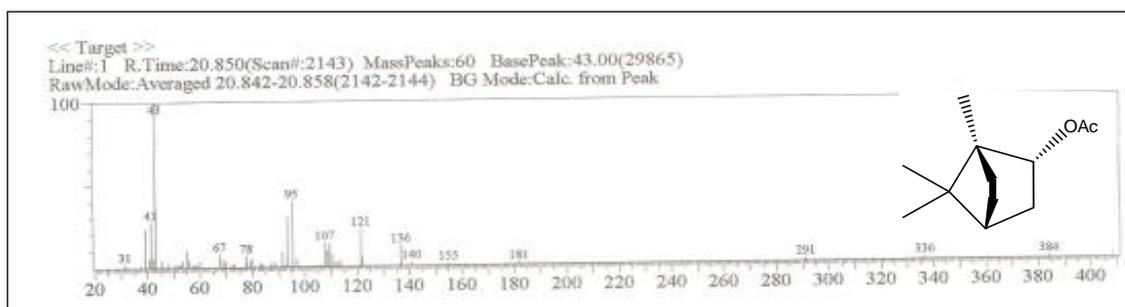
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO C- ESPECTRO DE MASSA DO ISOVALERATO DE HEXENILA



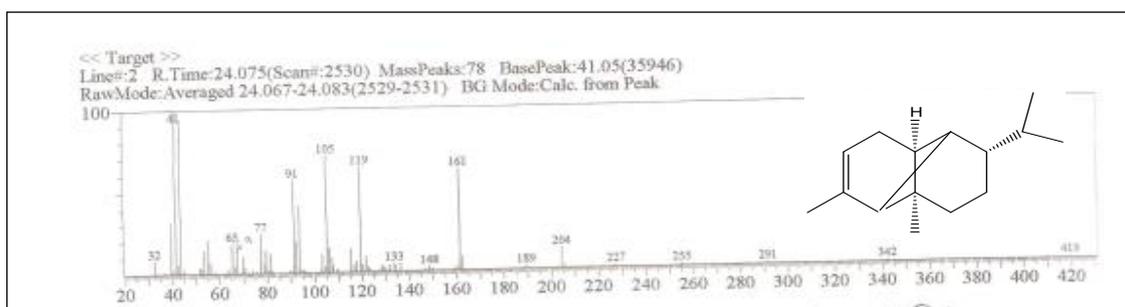
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO D- ESPECTRO DE MASSA DO ACETATO DE ISOBORNILA



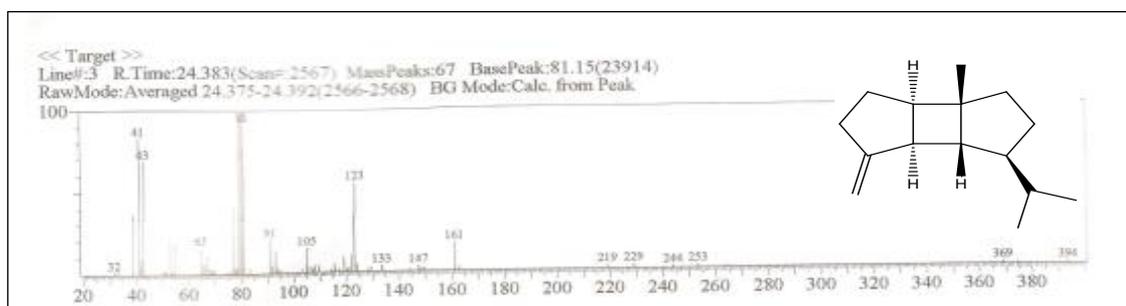
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO E- ESPECTRO DE MASSA DO $\alpha$ -COPAENO



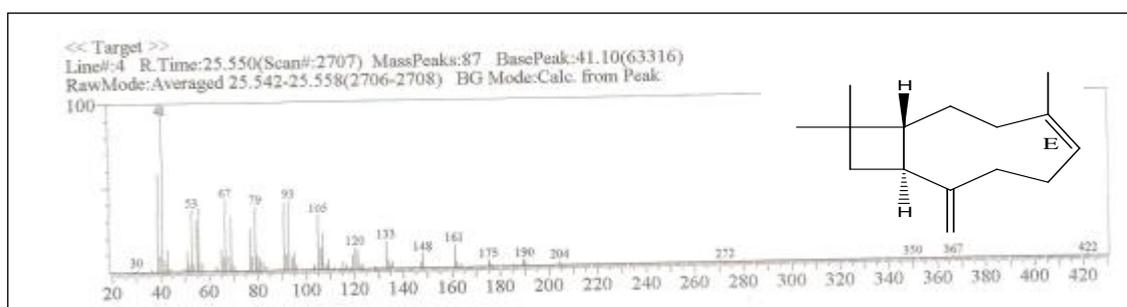
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO F- ESPECTRO DE MASSA DO $\beta$ -BOURBONEO



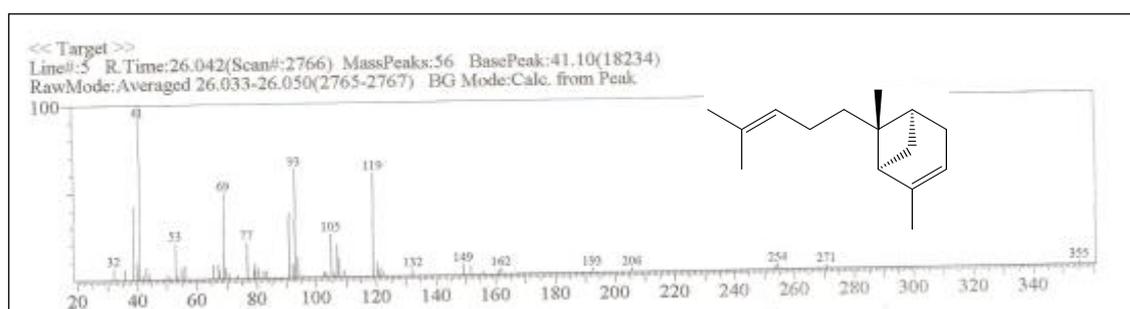
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO G- ESPECTRO DE MASSA DO E-CARIOFILENO



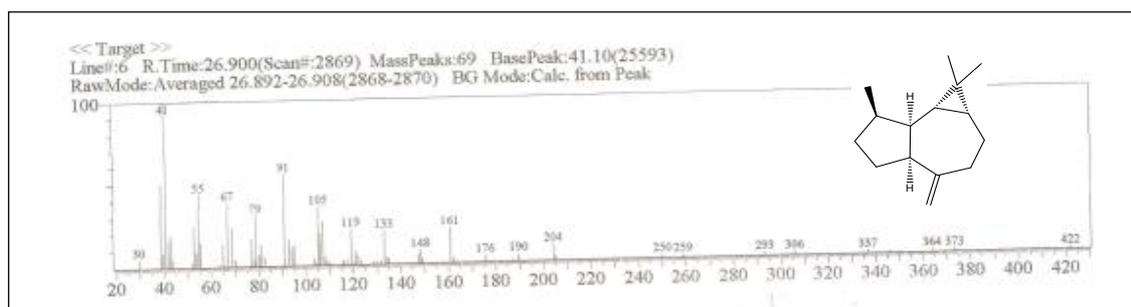
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO H- ESPECTRO DE MASSA DO E-BERGAMOTENO



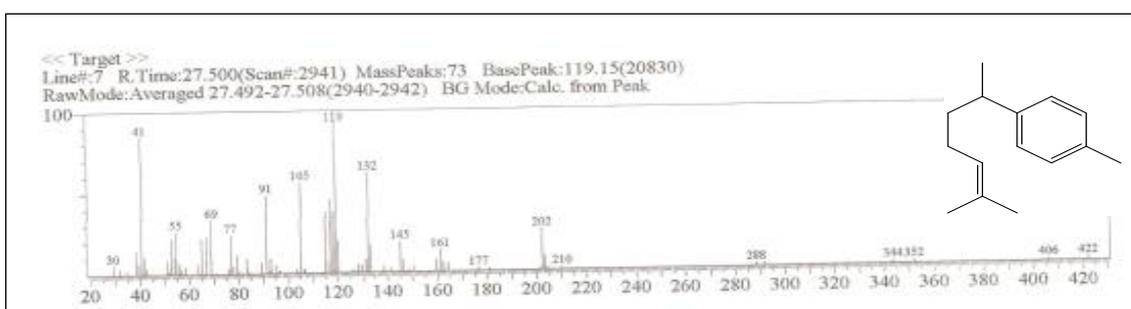
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO I- ESPECTRO DE MASSA DO ALLO-AROMADENDRENO



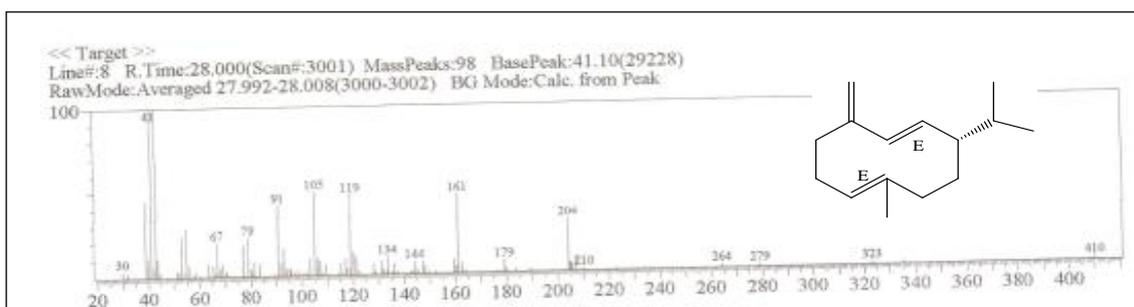
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO J- ESPECTRO DE MASSA DO CURCUMENO



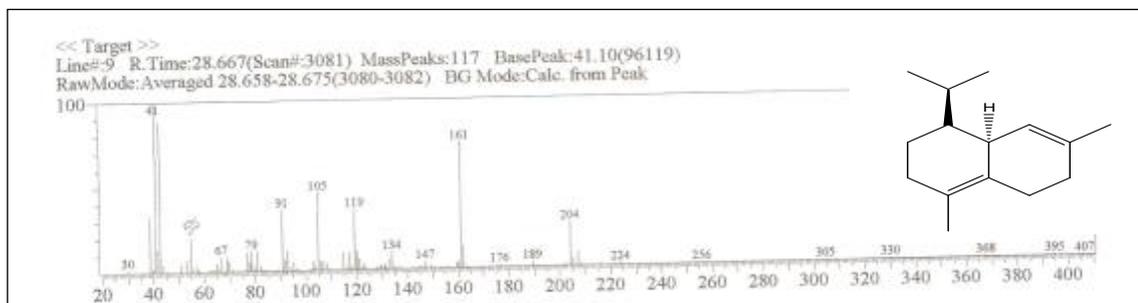
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO K- ESPECTRO DE MASSA DO GERMACRENO-D



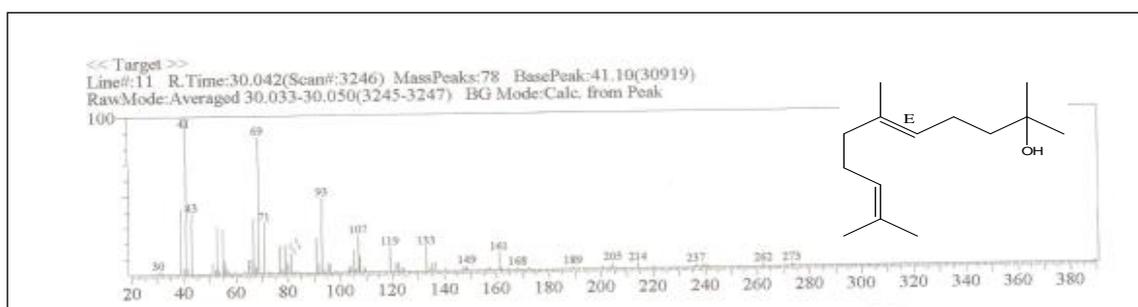
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO L- ESPECTRO DE MASSA DO $\delta$ -AMORFENO



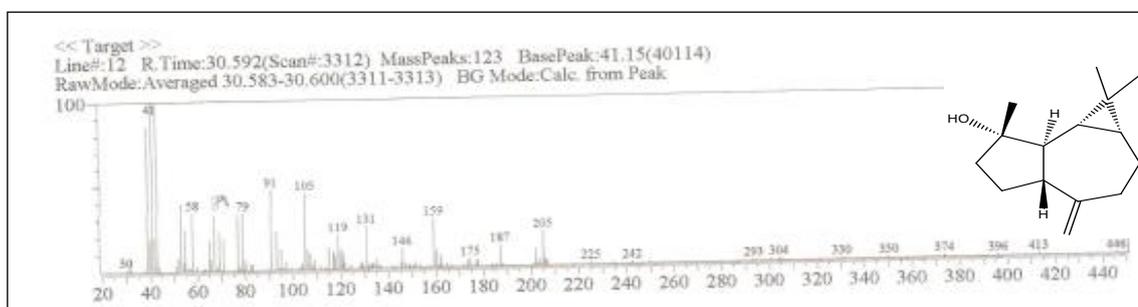
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO M- ESPECTRO DE MASSA DO E-NEROLIDOL



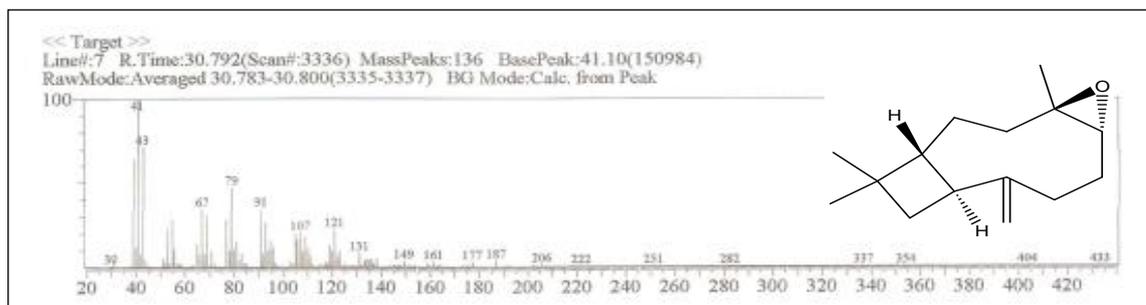
Fonte: Próprio autor.

### ANEXO N- ESPECTRO DE MASSA DO ESPATULENOL



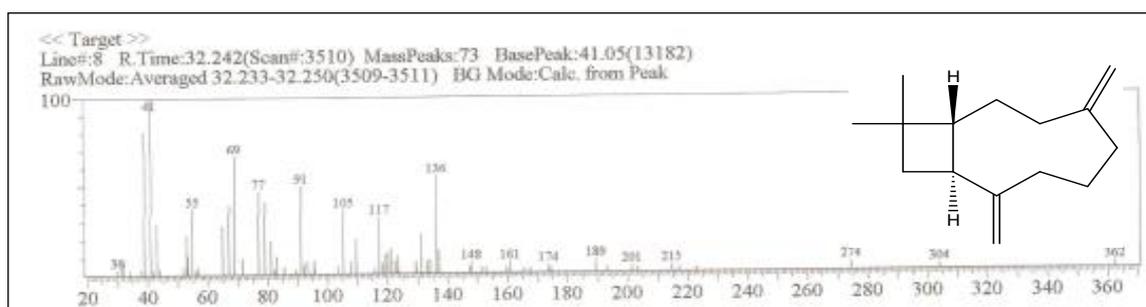
Fonte: Próprio autor.

## ANEXO O - ESPECTRO DE MASSA DO ÓXIDO DE CARIOFILENO



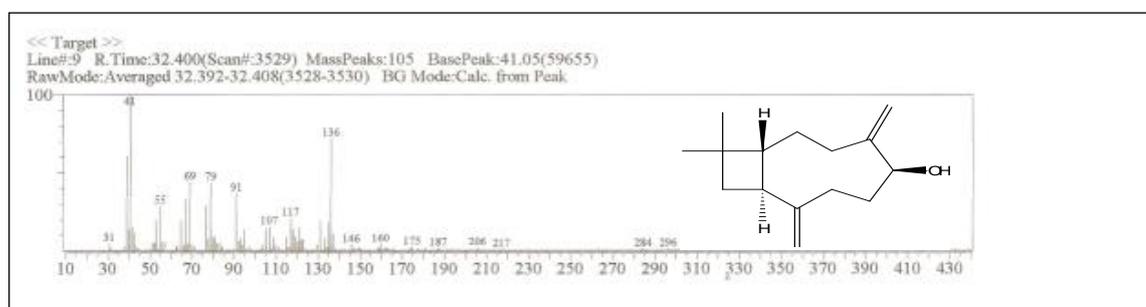
Fonte: Próprio autor.

## ANEXO P- ESPECTRO DE MASSA DO CARIOFILA-4(12),8(13)-DIEN-5 $\alpha$ -OL

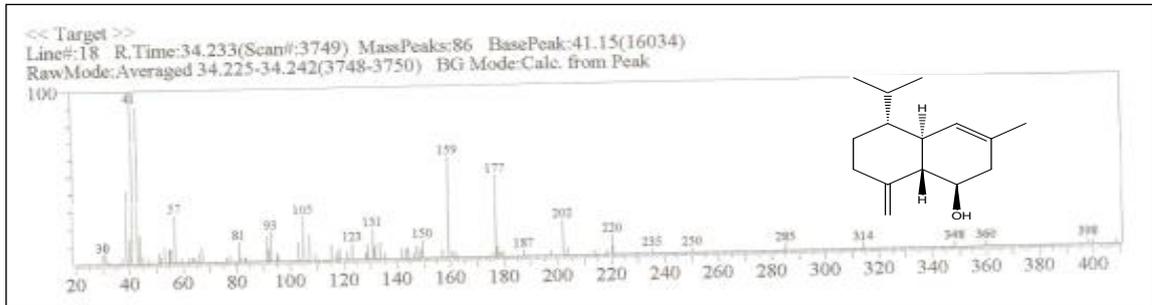


Fonte: Próprio autor.

## ANEXO Q- ESPECTRO DE MASSA DO CARIOFILA-4(12),8(13)-DIEN-5 $\beta$ -OL



Fonte: Próprio autor.

**ANEXO R- ESPECTRO DE MASSA DO KUSINOL**

Fonte: Próprio autor.