



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MANACÉS CUNHA SOUSA

**ESTUDOS QUÍMICOS E AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE, BACTERICIDA E
LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Ocimum basilicum* L (ALFAVACA)**



João Pessoa
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MANACÉS CUNHA SOUSA*

**ESTUDOS QUÍMICOS E AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE, BACTERICIDA E
LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Ocimum basilicum* L (ALFAVACA)**

Tese apresentada como requisito para obtenção
do título de Doutor em Química Orgânica pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Adenilde Ribeiro Nascimento
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

*Bolsista: FAPEMA

João Pessoa
2010

S725 e Sousa, Manacés Cunha.

Estudos químicos e avaliação antioxidante, bactericida e larvícida do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L (ALFAVACA) / Manacés Cunha Sousa . - - João Pessoa : UFPB, 2009.

137 f. : il.

Orientadores: Adenilde Ribeiro Nascimento e Antonio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB /CCEN.

1. Química orgânica. 2. *Ocimum basilicum*. 3. Óleo essencial. 4. Atividade antibacteriana. 5. Atividade larvícida. 6. Metilchavicol.

UFPB/BC

CDU: 547(043)

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química Orgânica.

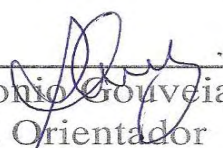
Aprovada em 11/02/2010

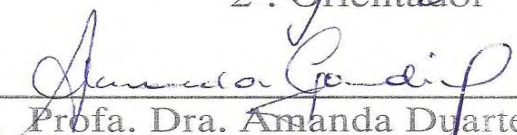
Banca Examinadora:

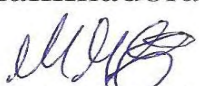
Estudos Químicos e Avaliação Antioxidante, Bactericida e Larvicida do Óleo Essencial do Ocimum basilicum L(ALFAVACA).

Aprovada pela banca examinadora:

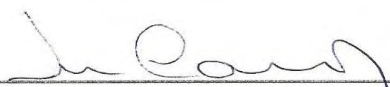

Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
Orientadora/Presidente


Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º. Orientador


Profa. Dra. Amanda Duarte Gondim
Examinadora


Profa. Dra. Marta Maria da Conceição
Examinadora


Profa. Dra. Antonia Lucia de Souza
Examinadora


Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador

Dedico esse trabalho

Pai!

Em minha saudade à tua memória

*À minha mãe, Teresinha Sousa Cunha, um
exemplo de vida a ser seguido por todos os
seus filhos*

*À minha querida esposa, Kennya Valéria, pela
compreensão, carinho, cumplicidade e
companheirismo o que torna nossa união mais
feliz a cada dia*

*Aos meus dois queridos filhos, André Gustavo
e Andreassa Camila, que me dão inspiração e
força para enfrentar as dificuldades da vida*

*A todos os meus irmãos, em particular a
Keloísa Cunha e José Cunha, que sempre
acreditaram no meu trabalho*

*Toda a história do progresso humano pode
reduzir-se à luta da ciência contra a
superstição.*

*Gregório Manañon
1887-1960
Ensaísta espanhol*

*Toda a história do progresso humano pode reduzir-se à
luta da ciência contra a superstição.*

Gregório Manañon (1887-1960) Ensaísta espanhol

AGRADECIMENTOS

À Deus em sua infinita sabedoria, Ser supremo criador do Universo.

À Prof.^a Dr.^a Adenilde Ribeiro Nascimento, por sua coerência, sinceridade e valiosa orientação na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza, mentor da parceria UFMA – UFPB o que tornou possível a realização deste trabalho, e por disponibilizar seu laboratório para as análises térmicas.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho pela amizade e ajuda em momentos difíceis do Doutorado.

Ao Prof. Dr. João Elias Mouchrek Filho pela amizade e viabilização da bolsa de pesquisa FAPEMA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Jamal da Silva Chaar, da UFAM pela valiosa colaboração nas análises cromatográficas.

Ao Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo, chefe do Laboratório de Entomologia e Vetores da UFMA, pela preciosa ajuda e por disponibilizar seu laboratório para as análises larvicidas sobre o mosquito da dengue.

Ao Prof. Dr. Sócrates Cavalcante da UFS, Campus São Cristovão-SE, por disponibilizar a metodologia para os testes larvicidas.

Aos Professores Armando, Nestor a Técnica Paula e José Walter pela amizade e colaboração sempre valiosa.

À inestimável amiga Josilene Lima Serra, André Gustavo e Marlucy do Laboratório de microbiologia de alimentos da UFMA pela ajuda nas análises microbiológicas.

À Vicente Silva, Gabriel, Yrla Nívia e Jorge do Laboratório de Entomologia e vetores da UFMA, pela valiosa colaboração e amizade.

À Manoel Dantas e Roberlúcia do Laboratório de combustíveis da UFPB, (LACOM) pela realização das análises térmicas e colaboração na interpretação dos resultados.

Ao amigo Glene Henrique do Laboratório de combustíveis da UFMA pelos inúmeros favores prestados.

Ao amigo Marcos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da UFMA, por estar sempre disposto a ajudar.

As amigas da Central analítica da UFMA, em especial a Raimunda e Janyeide. Pela amizade e colaboração na realização das análises da atividade antioxidante.

À todos os amigos do doutorado da UFPB, em particular aos colegas, Antônio Araújo, Nestor, Vera Lúcia e Vasconcelos, pela amizade e compartilhamento de informações.

À todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente na realização desse trabalho meus sinceros agradecimentos.

TÍTULO: Estudos químicos e avaliação antioxidante, bactericida e larvicida do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L (alfavaca).

AUTOR: Manacés Cunha Sousa

ORIENTADORES: Prof.^a Dr.^a Adenilde Ribeiro Nascimento

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

PALAVRAS-CHAVE: *Ocimum basilicum*, óleo essencial, metilchavicol, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, atividade larvicida

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar os principais metabólitos das partes aéreas do *Ocimum basilicum* através de uma triagem fitoquímica. Extrair quantitativamente seu óleo essencial e submetê-lo a análises térmicas e cromatográficas, assim como verificar seu desempenho como agente antioxidante, antibacteriano e larvicida. Neste trabalho, foi observado que as partes aéreas do *Ocimum basilicum* apresentam taninos, depsídeos e depsidonas, esteroides livres, flavonoides, saponinas, aglicona flavonóides, aglicona triterpenóides, esteróides e ácidos orgânicos. O rendimento do óleo essencial extraído variou entre 1,5 a 2,0% para as partes aéreas secas, enquanto o rendimento das partes aéreas frescas ficou entre 0,28 a 1,0%. O estudo do óleo essencial da espécie vegetal por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas revelou que a essência do mesmo é formada por seis componentes, sendo o metilchavicol, linalol, eucaliptol e farneseno os principais metabólitos. O estudo térmico do óleo essencial realizado por TG em atmosfera de ar e nitrogênio revelou um perfil térmico semelhante, indicando duas perdas de massa atribuídas a volatilização da fração terpênica e decomposição da fração aromática respectivamente. As análises antioxidantes, antibacterianas e larvicidas revelaram que o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum* apresenta desempenho superior ao óleo essencial das partes aéreas frescas, quando testado nas mesmas condições de análises.

TÍTULO: Estudos químicos e avaliação antioxidante, bactericida e larvicida do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L (alfavaca).

AUTOR: Manacés Cunha Sousa

ORIENTADORES: Prof.^a Dr.^a Adenilde Ribeiro Nascimento

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

KEY WORDS: *Ocimum basilicum*, essential oil, metilchavicol, antioxidant activity, antibacterial activity, larvicidal activity

ABSTRACT

This study aimed to investigate major metabolites from the aerial parts of *Ocimum basilicum* by a phytochemical screening. Quantitatively extracting the essential oil and subjecting it to thermal analysis and chromatography, as well as verifying its performance as an antioxidant, antibacterial and larvicidal agents. In this study it was observed that the aerial parts of *Ocimum basilicum* present tannins, depsides and depsidons, free steroids, flavonoids, saponins, flavonoid aglicons, triterpenoid aglicons, steroids and organic acids. The yield of essential oil extracted varied between 1.5 and 2.0% for the dried aerial parts, while the one of fresh aerial parts was between 0.28 to 1.0%. The study of essential oil plant species by gas chromatography coupled with mass spectrometry, revealed that the essence of it consists of six components, metilchavicol, linalool, eucaliptoll and farnesene, the main metabolites. The thermal study of the essential oil made by termogravimetry in air atmosphere and nitrogen, showed a similar thermal profile, indicating two mass loss attributed to volatilization of terpenes fraction and decomposition of aromatic fraction respectively. Antioxidant, antibacterial and larvicidal analysis revealed that the essential oil from dried aerial parts of *Ocimum basilicum* has outperformed the essential oil of fresh aerial parts when tested under the same conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i>	24
Figura 2 – Rota biossintética dos ácidos graxos.....	26
Figura 3 – Biossíntese do DMAP e IPP via ácido mevalônico	27
Figura 4 – Biossíntese do DMAP e IPP via (DXP).....	28
Figura 5 – Rota Biossintética dos terpenos	29
Figura 6 – Biossíntese dos fenilpropanos	30
Figura 7 – Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos	34
Figura 8 – A) Mudança de coloração da solução do radical DPPH como consequência do decaimento de sua absorção provocado pela abstração de um átomo de hidrogênio de um substrato antioxidante. B) Mecanismo do equilíbrio da reação	35
Figura 9 – Ovos do <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 10 – Larvas do <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 11 – Pupa do <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 12 – Adulto do <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 13 – Efeitos provocados pelos antibióticos na célula bacteriana	46
Figura 14 – Destilador tipo Clevenger utilizado para a obtenção do óleo essencial das partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i>	55
Figura 15 – Exsicata da espécie vegetal <i>Ocimum basilicum</i>	56
Figura 16 – Fluxograma de preparação do extrato etanólico e prospecção dos constituintes fitoquímicos das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i>	58
Figura 17 – Experimento da atividade antioxidante, pelo método do DPPH, do óleo essencial obtido das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i>	62
Figuras 18 – Experimento da atividade antioxidante, pelo método do radical DPPH, do óleo essencial obtido das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i>	62
Figura 19 – Esquema do método de difusão em discos segundo BAUER-KIRBY <i>et al.</i> (1966)	65
Figura 20 – Modelo de Ovitrapa utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	66
Figura 21 – Ovos do <i>Aedes aegypti</i> coletados semanalmente através de armadilhas ovitrampas	66
Figura 22 – Testes larvicidas do <i>Aedes aegypti</i> realizados em triplicata a temperatura ambiente segundo o método de Reed e Muench	67

Figura 23 – Cinética de extração do óleo essencial obtido das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i> no tempo de 2 horas através de um extrator tipo Clevenger	70
Figura 24 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> , em atmosfera de nitrogênio, com vazão de 110 mL. min ⁻¹ no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e razão de aquecimento de 10°C. min. ⁻¹	73
Figura 25 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> , em atmosfera de ar, com vazão de 110 mL. min ⁻¹ no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e razão de aquecimento de 10°C. min. ⁻¹	74
Figura 26 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>O. basilicum</i> , em atmosfera de ar, com vazão de 110 mL. min ⁻¹ no intervalo de temperatura de 25 a 500°C e razão de aquecimento de 10°C. min	75
Figura 27 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> em razão de aquecimento de 10°C. min. ⁻¹ , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. min. ⁻¹	76
Figura 28 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> em razão de aquecimento de 10°C.min. ⁻¹ , em atmosfera de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. min ⁻¹	77
Figura 29 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>O. basilicum</i> com razão de aquecimento de 10°C.min. ⁻¹ , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. Min ⁻¹	78
Figura 30 – Cromatograma do óleo essencial do <i>O. basilicum</i> realizado em um equipamento Shimadzu, modelo QP-5000. A) Óleo essencial das partes aéreas secas. B) Óleo essencial das partes aéreas frescas.....	79
Figura 31 – Espectro de massas do pico 1 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS	82
Figura 32 – Espectro de massas do pico 1 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS	83
Figura 33 – Espectro de massas do pico 2 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca NIST21	84
Figura 34 – Espectro de massas do pico 2 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) proposta de identificação segundo o programa AMDIS	84

Figura 35 – Espectro de massas do pico 4 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca wiley139. C) Biblioteca NIST107	85
Figura 36 – Espectro de massas do pico 4 e sua respectiva propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação segundo o progrma AMDIS.....	86
Figura 37 – Espectro de massas do pico 5 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca NIST107.....	87
Figura 38 – Espectro de massas do pico 5 e sua respectiva propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS	87
Figura 39 – Comparação da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do <i>Ocimum basilicum</i> no tempo de 150 minutos, através do método do DPPH	89
Figura 40 – Desempenho da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i> através do método do DPPH	90
Figura 41 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i> . A) Halo de inibição do óleo essencial das partes aéreas secas frente a <i>E. coli</i> . B) Halo de inibição do óleo essencial das partes aéreas secas frente a <i>A. hydrofila</i>	91
Figura 42 – Desempenho do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i> como agente antibacteriano através do método da difusão em discos	93
Figura 43 – Taxa de mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>Ocimum basilicum</i> , após 24h, segundo o método Reed-Muench	96
Figura 44 – CL ₅₀ do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>Ocimum basilicum</i> calculado pelo método Reed-Muench. O ponto de interseção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.....	96
Figura 45 – Taxa de mortalidade das larvas do <i>A. aegypti</i> expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> após 24 h, segundo o método Reed-Muench	98
Figura 46 – CL ₅₀ do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i> , calculado pelo método Reed-Muench. O ponto de interseção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	71
Tabela 2 – Composição percentual do óleo essencial das partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i> obtida por CG-EM.....	80
Tabela 3 – Atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>Ocimum basilicum</i> pelo método do radical DPPH.....	88
Tabela 4 – Atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i> pelo método do DPPH	88
Tabela 5 – Atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas do <i>O. basilicum</i> pelo método da difusão em discos.....	92
Tabela 6 – Mortalidade das larvas do <i>A. aegypti</i> após 24h de exposição a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>O. basilicum</i>	95
Tabela 7 – Mortalidade das larvas do <i>A. aegypti</i> após 24h de exposição a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>O. basilicum</i>	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TG	Termogravimetria
DSC	Calorimetria Exploratoria Diferencial
DTG	Derivada da Termogravimetria
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
eV	elétrons-volt
UV-vis	Ultravioleta visível
λ	Lambda (comprimento de onda)
$M^{\bullet+}$	Íon molecular
m/z	Razão massa carga
PPM	Partes por milhão
BHT	2,2'-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolino-6-sulfonato)
LDL	Low Density Lipoproteins (colesterol LDL)
OMS	Organização Mundial de Saúde
DMAP	3,3-dimetilalil pirofosfato
IPP	3-isopentenil pirofosfato
DXP	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
HGM-CoA	B-hidroxi-B-metilglutaril coenzima-A
TPP	Tiamina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
BHA	3-tert-butil-4-hidroxi-anisol
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	14
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO II	
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Histórico	23
2.2 Caracterização botânica da espécie	23
2.2.1 Descrição da família	23
2.2.2 Descrição do Gênero	24
2.2.3 Descrição da espécie <i>Ocimum basilicum</i> (alfavaca).....	24
2.2.4 Óleos essenciais do <i>Ocimum basilicum</i>	25
2.3 Metabólitos ativos	25
2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais	25
2.3.1.1 Derivados dos ácidos graxos	26
2.3.1.2 Os terpenoides	27
2.3.1.3 Os fenilpropanoides.....	29
2.4 Considerações sobre agentes antioxidantes.....	30
2.4.1 Os Radicais livres	30
2.4.2 Oxidação lipídica.....	31
2.4.3 Classificação dos antioxidantes	32
2.4.3.1 Antioxidantes primários	32
2.4.3.2 Antioxidantes secundários.....	33
2.4.3.3 Antioxidantes naturais	33
2.4.3.4 Antioxidantes sintéticos.....	34
2.4.4 Métodos mais comuns de avaliação da atividade antioxidante para produtos naturais... 34	
2.4.4.1 Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.....	35
2.4.5 Os óleos essenciais como agentes antioxidantes	36
2.5 Aspectos gerais sobre o <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus	37
2.5.1 O Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	38

2.5.1.1 Ovo	38
2.5.1.2 A Larva	39
2.5.1.3 A Pupa	40
2.5.1.4 O Adulto	41
2.5.2 A Dengue	42
2.5.2.1 Medidas de controle.....	42
2.5.3 A problemática da resistência como mecanismo de defesa dos insetos	43
2.5.4 Os óleos essenciais como larvicidas	44
2.6 Considerações gerais sobre fármacos	45
2.6.1 Mecanismos de ação dos antibióticos.....	45
2.6.2 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana	46
2.6.3 O fenômeno da resistência dos microrganismos patogênicos	47
2.6.4 Atividade antibacteriana do óleo essencial das espécies do Gênero <i>Ocimum</i>	49
2.6.5 Mecanismos de ação dos óleos essenciais frente as bactérias patogênicas	49
CAPÍTULO III	
3. OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo geral	52
3.2 Objetivos específicos	52
CAPÍTULO IV	
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	54
4.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	54
4.1.1 pH–metro	54
4.1.2 Refratômetro	54
4.1.3 Evaporador rotatório.....	54
4.1.4 Extrator de Clevenger	54
4.1.5 Espectrofotômetro de ultravioleta	55
4.1.6 Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas	55
4.1.7 Analisador Térmico	55
4.2 METODOLOGIA.....	56
4.2.1 Coleta e identificação da espécie vegetal	56
4.2.2 Triagem fitoquímica	57
4.2.2.1 Prospeção dos constituintes fitoquímicos das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i>	57
4.2.3 Extração do óleo essencial.....	59

4.2.4 Análises físicas do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	59
4.2.4.1 Determinação da densidade relativa	59
4.2.4.2 Determinação do índice de refração	59
4.2.4.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool	60
4.2.5 Estudo térmico e análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do óleo essencial das partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i>	60
4.2.5.1 Estudo térmico.....	60
4.2.5.1.1 Termogravimetria (TG)	60
4.2.5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	61
4.2.5.2 Análises cromatográficas.....	61
4.2.6 Atividade antioxidante do óleo essencial do <i>Ocimum.basilicum</i>	61
4.2.6.1 Cálculo da concentração inibitória a 50% (CI ₅₀)	63
4.2.7 Atividade antibacteriana do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	63
4.2.7.1 Microrganismos testados	63
4.2.7.2 Meios de cultura utilizados.....	64
4.2.7.3 Cultivo dos microrganismos	64
4.2.7.4 Atividade antibacteriana	64
4.2.7.4.1 Método de difusão em discos (MDD)	64
4.2.8 Atividade larvicida do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	65
4.2.8.1 Coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	65
4.2.8.2 Atividade larvicida	67
4.2.8.3 Análise estatística dos dados	68

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1 Rendimento do óleo essencial das partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i>	70
5.2 Análises físicas do óleo essencial das partes aéreas do <i>Ocimum basilicum</i>	70
5.3 Triagem fitoquímica	71
5.4 Estudo térmico.....	72
5.5 Análises cromatográficas.....	78
5.6 Atividade antioxidante do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	88
5.7 Atividade antibacteriana do óleo essencial do <i>Ocimum basilicum</i>	91
5.8 Atividade larvicida	95
5.8.1 Atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas frescas do <i>Ocimum basilicum</i>	95
5.8.2 Atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas secas do <i>Ocimum basilicum</i>	97

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES.....	102
---------------------------	------------

CAPÍTULO VII

7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	105
--	------------

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
---	------------

CAPÍTULO IX

ANEXOS	126
---------------------	------------

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Estima-se que cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são dependentes da medicina caseira, pois se utilizam destas espécies medicinais para a tentativa de cura dos seus mais variados males (BRAZ-FILHO, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) confirma estes dados e complementa afirmando que, desse total, pelo menos 30% ocorreram por indicação médica. Esta prática tem inclusive recebido incentivo da própria OMS. Desta forma, são muitos os fatores que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluem plantas medicinais, principalmente, em termos econômicos e sociais (MARTINS *et al.* 2000).

No Brasil, assim como em outros países sul-americanos, a Fitoterapia tornou-se uma alternativa terapêutica importante, tornando-se, assim, uma alternativa aos medicamentos fabricados pela indústria farmacêutica, daí a importância das plantas medicinais nestes países, onde são utilizadas no tratamento das mais diversas enfermidades (Di STASI, 1996).

Segundo RODRIGUES e CARLINI (2002), o Brasil ainda possui uma flora exuberante; portanto, deveria priorizar o estudo farmacológico de novas drogas. Porém, com a velocidade com que ocorre a extinção destas espécies vegetais um número muito grande de plantas com propriedades medicinais corre enorme risco de desaparecer, mesmo antes de seu valor fitoterápico ser conhecido.

O Brasil possui de 40 a 200 mil espécies vegetais, constituindo assim em um terço das espécies existentes no planeta, onde cerca de 10 mil delas são consideradas medicinais. A China possui aproximadamente 27 mil espécies vegetais, com 5 mil medicinais (20%); e a Índia, com 18 mil, com 2,5 mil medicinais (14%). Como se observa, temos, portanto, uma das floras mais ricas do mundo em matérias-primas para fitofármacos, no entanto, somos grandes importadores destes produtos (BRAZ-FILHO, 2007).

Apesar dos incentivos à pesquisa nesta área ainda serem muito tímidos, as plantas medicinais brasileiras têm-se destacado e vêm-se tornando cada vez mais importantes materiais biológicos quando relacionadas à cura e à prevenção de diversas doenças. A este respeito ABURJAI *et al.* (2001) relatam que, durante as últimas décadas, tem havido crescente interesse pelas plantas como fonte medicinal e os motivos para isso são muitos. Por exemplo, podemos citar a resistência preocupante de fungos e bactérias aos antibióticos, a

perda da eficiência dos inseticidas aos vetores das doenças tropicais, o aumento crescente da carga de agrotóxicos nas lavouras e a crescente busca por antioxidantes naturais que visam a substituição dos aditivos químicos em alimentos de origem sintética, pois recaem sobre esses suspeitas crescentes de atuarem como substâncias carcinogênicas no organismo humano (FERREIRA; ZARBIN, 1998; ALTMAN, 1998; PEREIRA e MAIA, 2007).

Em função da problemática abordada, este trabalho objetivou estudar as propriedades antibacterianas do óleo essencial do *O. basilicum* (alfavaca) frente às bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrofila*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e *Vibrio parahaemolyticus*, assim como testar suas propriedades larvicidas frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue no mundo e também verificar suas possíveis propriedades antioxidantes pelo método do radical DPPH(2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O *Ocimum basilicum* é uma espécie herbácea, anual com altura variando entre 20-60 cm; apresenta inflorescência branca ou púrpura, tem origem indiana ou iraniana. O nome *Ocimum* deriva da palavra grega *ókimom*, que significa “perfumado”, referindo-se ao forte odor de suas folhas (BARREIRO, 2006; CHALCHAT e ÖZCAN, 2008).

A espécie é internacionalmente conhecida como basílico. É uma planta aromática usada tradicionalmente como erva medicinal no tratamento de dores de cabeça, tosses, diarreia, constipação, verrugas, febres e disfunções renais. Seu uso como condimento é muito antigo devido ao aroma que suas folhagens fornecem aos alimentos; sendo assim, muito utilizada na cozinha mediterrânea no preparo de produtos a base de tomates, legumes, saladas, pizzas, carnes, sopas e alimentos marinhos. É também uma fonte de compostos aromáticos e óleos essenciais contendo compostos biologicamente ativos com atividades inseticidas, nematicidas e antimicrobianas (ÖZCAN *et al.* 2005; TELCI *et al.* 2006; POLITEO *et al.* 2007).

2.2 Caracterização botânica da espécie

2.2.1 Descrição da família

A família Lamiaceae pertence à subclasse Asteridae e a ordem Lamiales. Em geral, as plantas desta família são herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas e inteiras. As flores são geralmente pequenas, reunidas em inflorescências, quase sempre axilares. As espécies da família Lamiaceae, segundo BARREIRO (2006), são caracterizadas pela presença de numerosos tricomas glandulares e não glandulares, cobrindo a maior parte dos órgãos aéreos.

2.2.2 Descrição do Gênero

O Gênero *Ocimum* é composto por espécies vegetais que apresentam ciclo de vida perene ou anual dependendo das condições ambientais e formas de cultivo (LABRA *et al.* 2004; BLANK *et al.* 2007).

Muitas destas espécies contêm óleo essencial baseado principalmente em derivados monoterpênicos como cânfora, limoneno, timol, citral, geraniol e linalol. Por outro lado, outras espécies do mesmo gênero produzem óleos essenciais baseados principalmente em altas proporções de derivados fenólicos como eugenol, metil eugenol, metil cinamato e metil chavicol frequentemente combinado com várias proporções de linalol (LEWINSOHN *et al.* 2000; PASCUAL-VILLALOBOS e BALLESTA-ACOSTA, 2003; LABRA *et al.* 2004).

2.2.3 Descrição da espécie *Ocimum basilicum* (alfavaca)

A espécie em estudo tem origem asiática (Figura 1). Foi introduzida no Brasil por duas rotas distintas. A primeira, por colonizadores europeus, enquanto a segunda foi introduzida por escravos trazidos da África (ÖZCAN *et al.* 2005; POKRYWIECKI, 2006).

Tem sido relatado que o teor de óleo essencial contido nesta espécie vegetal encontra-se na faixa entre 1,5 e 3% (m/m), dependendo da região geográfica e do período de coleta (MAZUTTI *et al.* 2006). O óleo essencial extraído das partes aéreas pode ser usado como aditivo aromático em alimentos, formulações farmacêuticas e cosméticas.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 1 – Partes aéreas do *Ocimum basilicum*

2.2.4 Óleos essenciais do *Ocimum basilicum*

O óleo essencial da espécie contém principalmente derivados fenólicos como eugenol, metileugenol, estragol, chavicol e metilcinamato, frequentemente combinado com variadas proporções de linalol (LABRA *et al.* 2004).

Comercialmente, o óleo essencial do *O. basilicum* é classificado em função das regiões geográficas de origem, de acordo com esta classificação existem quatro quimiotipos característicos.

1. Europeu, procedentes da Itália, França, Bulgária, Egito e África do Sul, tendo o linalol e metilchavicol como principais constituintes.
2. Tropical, procedentes da Índia, Paquistão e Guatemala sendo rico em metilcinamato.
3. Reunião, procedente da Tailândia, Madagascar e Vietnã, sendo caracterizado por altas concentrações de metilchavicol.
4. O quarto quimiotipo, segundo a literatura, tem altas concentrações de eugenol, é originário do norte da África e Rússia (LABRA *et al.* 2004).

Nesses quimiotipos, frequentemente ocorrem variações na composição química dos principais constituintes. Por exemplo, as variedades italianas apresentam os seguintes componentes majoritários: linalol, linalol/metilchavicol e linalol/eugenol. Enquanto as variedades Australianas apresentam, geralmente, metilchavicol, linalol, metilcinamato, uma mistura de linalol / metilcinamato e linalol / metilchavicol (PASCUAL-VILLALOBOS e BALLESTA-ACOSTA, 2003; LABRA *et al.* 2004). Entre as variedades que ocorrem no Brasil prevalecem o linalol e metilchavicol como componentes majoritários.

2.3 Metabólitos ativos

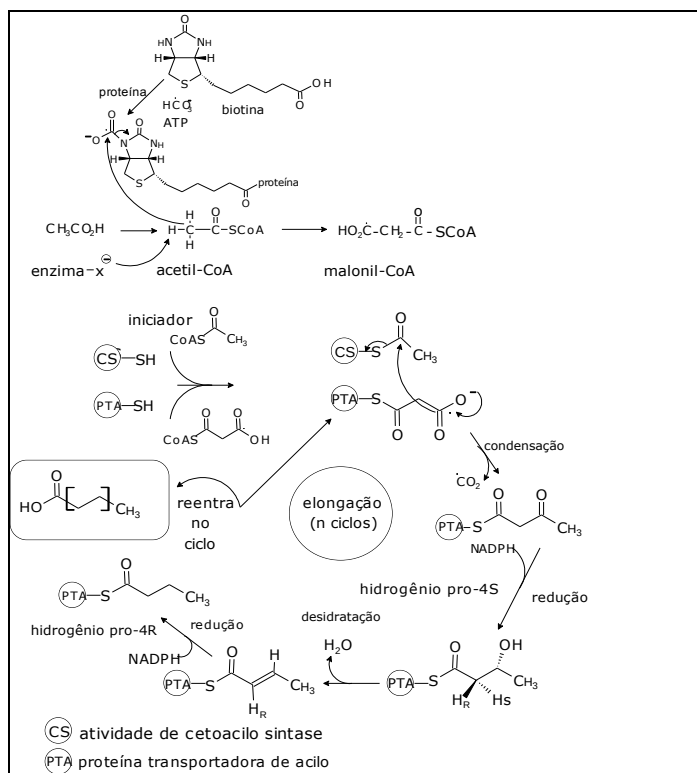
2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais

BARRETO e VEIGA JÚNIOR, (2005) propõem que os constituintes das misturas voláteis liberadas por plantas estão distribuídos em três grupos principais: os derivados dos

ácidos graxos, os benzenóides com destaque para os fenilpropanóides e os isoprenóides, sendo os demais grupos observados com pouca frequência.

2.3.1.1 Derivados dos ácidos graxos

Nos aromas florais os derivados dos ácidos graxos mais facilmente encontrados são as séries homólogas de hidrocarbonetos saturados e insaturados, aldeídos, alcoóis e cetonas. BARRETO e VEIGA JÚNIOR, (2005). LOBO e LOURENÇO (2007) relatam que a biossíntese dos ácidos graxos e derivados se encontra associada a um conjunto de enzimas designadas por sintases dos ácidos graxos. Cada uma destas enzimas interage com uma proteína transportadora da cadeia acilo (PTA), que atua como um cofator. O bloco constituinte fundamental é o ácido acético, sob a forma de acetil-SCoA. Com efeito, é este o iniciador direto de todo o processo, mas a elongação subsequente da cadeia se realiza através de um derivado, o malonil-SCoA, numa reação análoga à condensação de Claisen. O malonil-SCoA forma-se através de uma reação de carboxilação do acetil-SCoA, envolvendo a biotina carboxilada, que é transportada por uma proteína, como mostrado na Figura 2.



Fonte: Lobo e Lourenço, (2007)

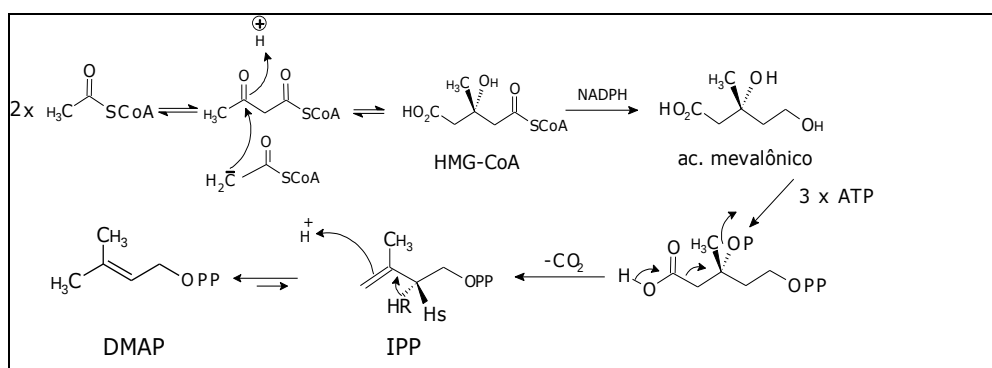
Figura 2 – Rota Biossintética dos ácidos graxos

2.3.1.2 Os terpenóides

Segundo GROS *et al.* (1985); BARRETO e VEIGA JÚNIOR, (2005), a estrutura dos primeiros terpenos foi estabelecida em meados do século XIX. Eram estruturas simples de compostos com 10 átomos de carbonos. Logo se descobriu serem formadas por unidades de 5 carbonos, pois quando submetidos à pirólise, estes metabólitos geravam o isopreno como produto majoritário da degradação. A partir daí, iniciou-se a especulação biogenética envolvendo o isopreno, como bloco principal de formação dos terpenos, o que levou à formação em 1887, por Wallach, da regra do isopreno. Em 1953, Ruzicka propôs a regra biogenética do isopreno, em que reconheceu os isoprenóides como derivados de um número integral de equivalentes biológicos do isopreno ligados de maneira regular cabeça-cauda. No entanto, o isopreno não está envolvido na biossíntese dos terpenos os quais são formados a partir de duas unidades em C₅, o 3,3-dimetilalil pirofosfato (DMAP) e o 3-isopentenil pirofosfato (IPP) (BARRETO e VEIGA JÚNIOR, 2005).

Existem duas vias biossintéticas possíveis para a formação dos precursores DMAP e do IPP: a via mevalonato, que envolve o ácido (3R)-mevalônico como intermediário, e a via do fosfato de deoxilulose (DXP), descoberta recentemente, e que se crê estar mais generalizada na natureza do que a via do mevalonato (ABREU e HEGGIE, 2007).

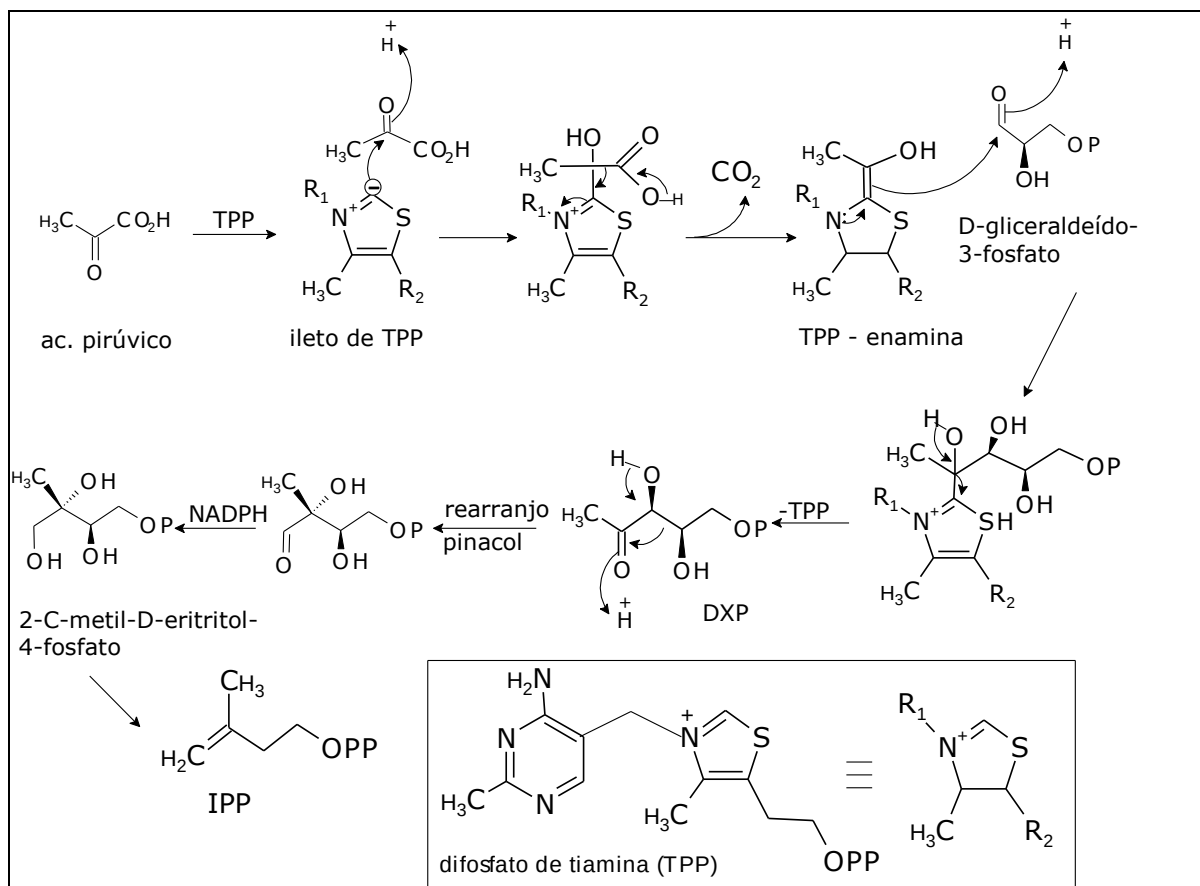
O ácido mevalônico, da via mevalonato, provém da condensação inicial de três moléculas do acetil-SCoA, que origina o éster β-hidroxil-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), o qual, por via de hidrólise e redução enzimática dá origem ao ácido mevalônico (Figura 3). A transformação deste intermediário no IPP envolve a fosforilação sucessiva dos grupos hidroxilo, seguida da descarboxilação e eliminação de um grupo pirofosfato. Uma isomerase remove o próton pro-R (H_R) em C-2 desta unidade isoprênica, originando o DMAP (ABREU e HEGGIE, 2007).



Fonte: Abreu e Heggie, (2007)

Figura 3 – Biossíntese do DMAP e IPP via ácido mevalônico.

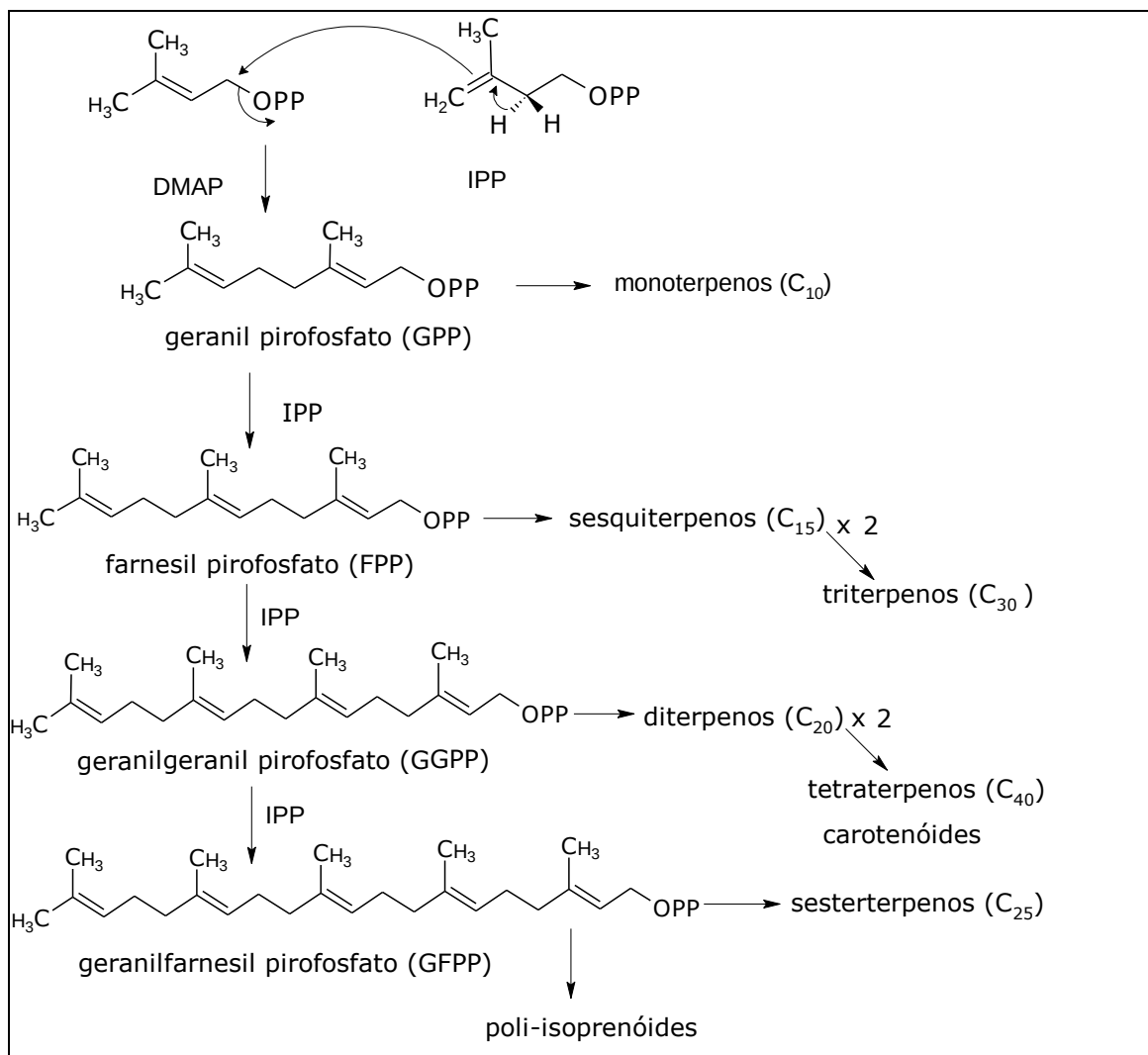
ABREU e HEGGIE, (2007) descrevem que a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), intermediário envolvido na outra via biosintética dos terpenóides, é formada a partir de dois produtos da glicose, o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído, num processo mediado pela coenzima tiamina difosfato (TPP). Por via de um rearranjo tipo pinacólico seguido de redução, a DXP transforma-se no 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, o qual dar origem ao IPP através de uma sequência ainda não totalmente elucidada (Figura 4).



Fonte: Abreu e Heggie, (2007)

Figura 4 – Biossíntese do DMAP e IPP via (DXP)

A condensação cauda-cabeça entre as unidades DMAP e IPP, catalisada pela enzima preniltransferase, forma a cadeia de geranyl pirofosfato (GPP), precursora dos monoterpenos. A condensação desta cadeia em C_{10} com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de farnesil pirofosfato (C_{15}), geranylgeranyl pirofosfato (C_{20}) e geranylfarnesil pirofosfato (C_{25}), precursoras dos sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos, respectivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de farnesil pirofosfato, e a de duas cadeias de geranylgeranyl pirofosfato, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e dos tetraterpenos (carotenóides), respectivamente (Figura 5).



Fonte: Abreu e Heggie, (2007)

Figura 5 – Rota Biossintética dos terpenos

2.3.1.3 Os fenilpropanóides

SIMÕES e SPITZER (2007), LOBO e LOURENÇO (2007) relatam que esses metabólitos se formam a partir do ácido chiquímico 1 metabólito precursor das unidades básicas dos ácidos cinâmicos 2 e p-cúmarico 3. Estes últimos, por meio de reduções enzimáticas, produzem propenilbenzenos 4 e/ou alil benzenos 6 e, por meio da degradação da cadeia lateral, seguido de oxidações, geram aldeídos aromáticos 5; ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas 7 (Figura 6).

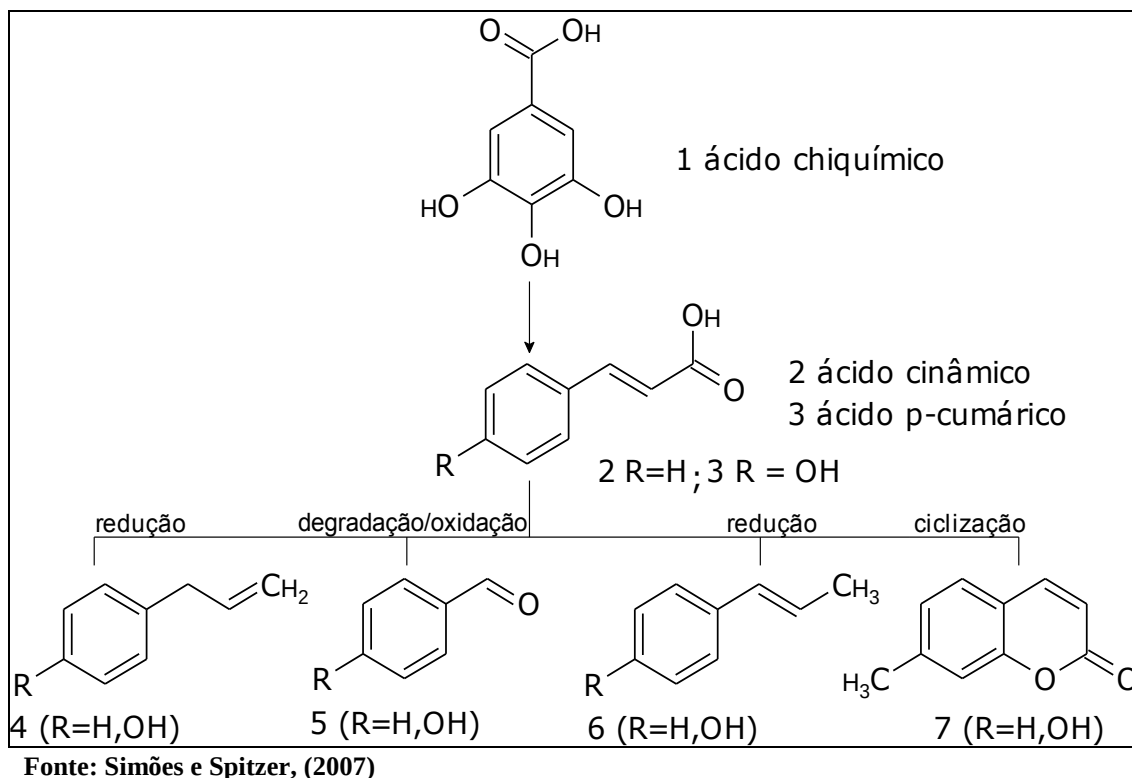


Figura 6 – Biossíntese dos fenilpropanos

2.4 Considerações sobre agentes antioxidantes

2.4.1 Os Radicais livres

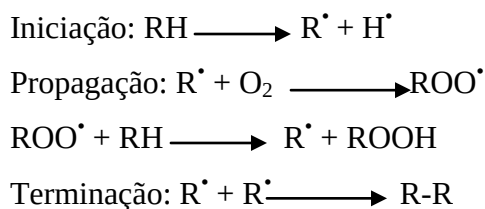
A oxidação é um processo vital para a vida, pois faz parte da produção de energia na mitocôndria, organela na qual é produzida toda a energia necessária a atividade celular. Porém, esse fenômeno gera uma série de subprodutos altamente reativos denominados radicais livres. Como são espécies derivadas do metabolismo do O_2 , são comumente denominadas de ERMO (espécies reativas do metabolismo do oxigênio) que quando não neutralizadas podem ser altamente deletérias aos organismos vivos. As ERMOs mais reativas são os radicais superóxido ($O_2^{\bullet}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A ação dessas entidades químicas na espécie humana está documentada na literatura como intimamente relacionadas ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e pulmonares, mal de Alzheimer e ao

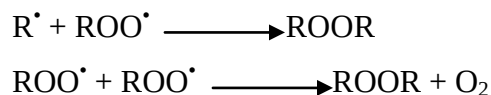
processo de envelhecimento celular (CAI *et al.* 2004; MARTINS *et al.* 2004; ROESLER *et al.* 2007).

2.4.2 Oxidação lipídica

Os lipídios desempenham papel importante na qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (sabor, odor, cor, textura). Além destas, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis. Entretanto, são suscetíveis ao ataque por radicais livres e a sua oxidação é prejudicial devido a sua continuidade, como uma reação em cadeia. A oxidação lipídica, sendo um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial seja dos compostos graxos, seja de todos os produtos que a partir deles são formulados, conduz a mudanças que ocorrem durante o processamento, distribuição e preparação final dos alimentos. A oxidação de lipídios inicia também outras mudanças nos alimentos que afetam sua qualidade nutricional, cor, flavor e textura (FUKUMOTO e MAZZA, 2000; IBAÑEZ *et al.* 2000; GÓMEZ, 2003; ATOUI *et al.* 2005; MORAIS, 2007a).

O processo de auto-oxidação nos alimentos ocorre segundo um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres e se divide em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado forma um radical livre, através da abstração de um átomo de hidrogênio de sua molécula, que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) formando um radical peróxido. A fase de propagação envolve a continuação e a aceleração desta reação em cadeia. A terminação é o estágio onde os radicais livres começam a reagir entre si formando espécies não-radicaais estáveis. A oxidação pode ocorrer também na presença de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), onde o ácido graxo insaturado irá formar um hidroperóxido pela introdução direta de O_2 em um dos carbonos da ligação dupla do ácido graxo. Um esquema destas reações é mostrado na sequência abaixo (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007).





2.4.3 Classificação dos antioxidantes

Os antioxidantes são classificados, segundo o mecanismo de ação, em primários e secundários e quanto à origem em naturais e sintéticos (Hras *et al.* 2000; Gómez, 2003).

2.4.3.1 Antioxidantes primários

São substâncias que incluem os compostos fenólicos poli hidroxilados como ésteres do ácido gálico, flavonoides e os fenóis com impedimento estrutural, com destaque para o 2-tert-butila-4-hidroxi- anisol(BHA); 3,5-di-tert-butila-4-hidroxi-tolueno(BHT); tert-butila-hidroquinona (TBHQ) e tocoferóis. Estes compostos atuam, bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis pela doação de hidrogênios ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando complexo antioxidante-lipídio (CARPES *et al.* 2008).

A eficiência de um antioxidante não se restringe somente em doar elétrons ou hidrogênio, sendo necessário também que o radical fenóxido formado possua baixa reatividade, o que lhe é conferida pela ressonância do elétron desemparelhado nos orbitais ligantes do anel aromático e pela ausência de sítios capazes de se ligarem ao oxigênio. Portanto, a eficiência de um antioxidante é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos. Essas características influenciam no deslocamento do elétron desemparelhado, contribuindo para a estabilização do radical fenoxil (KAUR *et al.* 2001; MELO e GUERRA, 2002; DORMAN *et al.* 2003; GÓMEZ, 2003; CARPES *et al.* 2008).

2.4.3.2 Antioxidantes secundários

Estes atuam retardando a etapa de inicialização da auto-oxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio livre, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Atuam também de forma sinergistas regenerando o antioxidante primário ou inativando íons metálicos, neutralizando seu efeito pró-oxidante (KAUR *et al.* 2001; DORMAN *et al.* 2003; GÓMEZ, 2003; MORAIS, *et al.* 2006; MORAIS, 2007a).

2.4.3.3 Antioxidantes naturais

As plantas, como organismos vivos, produzem muitos antioxidantes para controlar o estresse oxidativo causado pela radiação solar, oxigênio atmosférico, entre outros; desta forma, podem representar fontes de novos compostos com atividade antioxidantes (DEMO *et al.* 1998; KAUR *et al.* 2001; TORRE *et al.* 2001; BANDONIENE *et al.* 2002; GÓMEZ, 2003; MORAIS, *et al.* 2006).

Compostos naturais como a vitamina C, vitamina E, selênio e carotenoides comumente presentes nos alimentos da nossa dieta podem contribuir de forma significativa no combate aos radicais livres. Recentemente tem sido demonstrado que flavonoides encontrados em frutos e vegetais podem também agir como antioxidantes (MELO e GUERRA, 2002).

A maioria dos antioxidantes produzidos pelos vegetais superiores são polifenóis, como o α -tocoferol, flavonoides, fenilpropanos e ácidos fenólicos. Estas substâncias, além de atuarem como antioxidantes, podem apresentar outras propriedades biológicas importantes como antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antialérgica, estrogênica e imunoestimulante (MORAIS, 2007a).

Segundo JAVANMARDI *et al.* (2003), o potencial antioxidante dos constituintes vegetais e seus efeitos para a manutenção da saúde tem despertado não só o interesse dos cientistas, mas também das indústrias de alimentos, que visam aplicar estas propriedades benéficas das frutas e vegetais na produção de alimentos funcionais, o que melhoraria de forma significativa os alimentos processados com inúmeras vantagens a saúde humana.

2.4.3.4 Antioxidantes sintéticos

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os fenóis com vários substituintes no anel aromático (Figura 7). Os antioxidantes fenólicos são excelentes doadores de elétrons ou de hidrogênio, além disso, seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à falta de posições moleculares apropriadas para serem atacadas pelo oxigênio molecular, o que é provocado pela alta estabilidade do radical aromático formado (GÓMEZ, 2003).

Estes compostos fenólicos incluem o BHA, BHT e TBHQ entre outros. Estas substâncias têm sido frequentemente usadas como antioxidantes em alimentos lipídicos. Porém, uma desvantagem desses compostos reside no fato de serem produzidos por processos químicos sintéticos; sendo assim, seu uso é frequentemente limitado por regulamentos e não são aceitos em algumas aplicações, pois recaem sobre estes suspeitas de mutagenicidade, carcinogênese e outras etiologias tóxicas, o que tem aumentado a procura por antioxidantes naturais (MATTEA *et al.* 2004; POLITEO *et al.* 2007; CARPES *et al.* 2008).

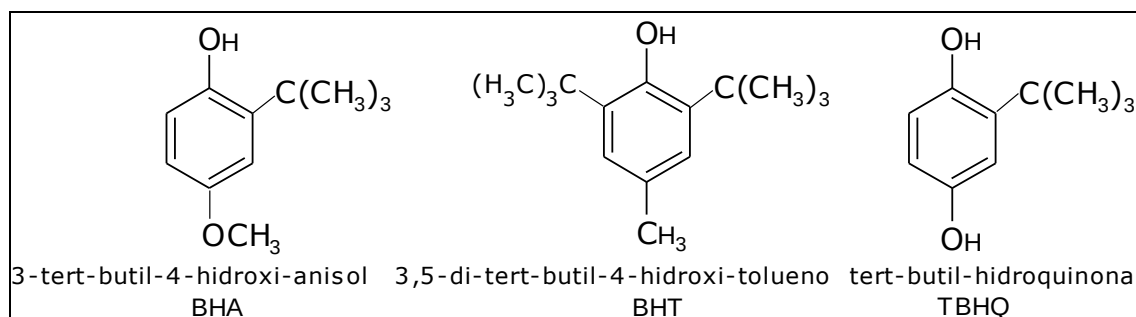


Figura 7 – Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos

2.4.4 Métodos mais comuns de avaliação da atividade antioxidante para produtos naturais

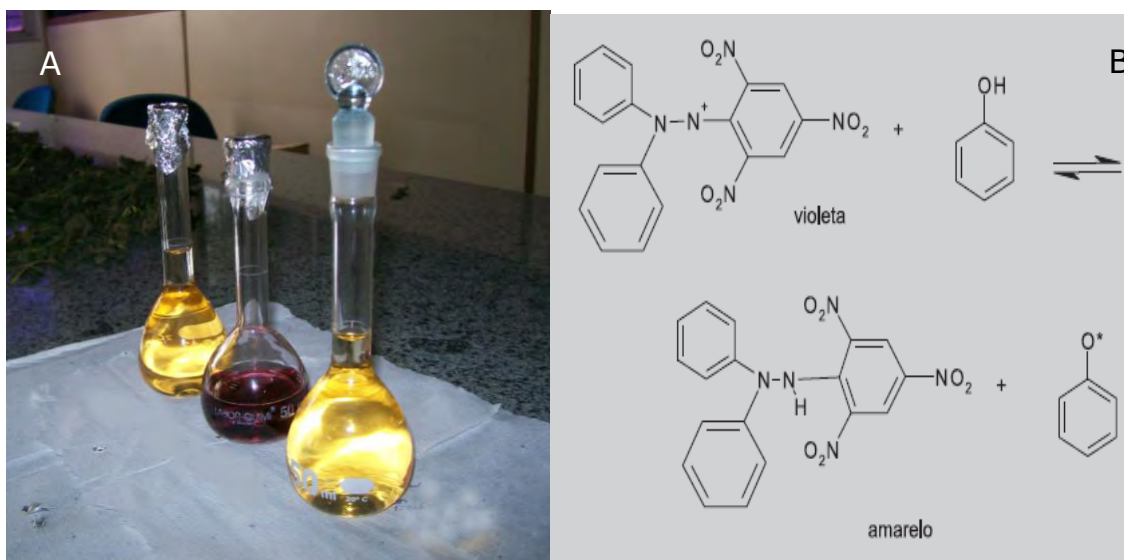
Segundo MORAIS (2007a), os testes antioxidantes *in vitro* podem ser agrupados em duas categorias: **i.** Usa-se um radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS⁺[2,2'-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolino-6-sulfonato)] e mede-se a capacidade do produto natural de sequestrar o radical; **ii.** Induz-se a peroxidação de um substrato lipídico

como gema de ovo ou ácido linoléico e medem-se os peróxidos lipídicos formados ou produtos de degradação destes com um antioxidante padrão (ácido ascórbico, α -tocoferol ou BHT). Alguns dos métodos mais citados na literatura estão descritos a seguir.

- a) Sequestrador de radical DPPH;
- b) Sequestrador de radical ABTS;⁺
- c) Sistema β -caroteno-linoleato;
- d) Teste de peroxidação lipídica com FeCl_3 ;
- e) Atividade sequestradora do radical superóxido.

2.4.4.1 Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

O radical DPPH, quando em solução alcoólica, apresenta coloração violácea intensa com absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio de um substrato com função antioxidante sua coloração vira de roxo intenso para amarelo, como consequência do decaimento de sua absorção (Figura 8).



Fonte: O próprio autor, (2009)

Fonte: Scotti *et al.* (2007)

Figura 8. A) Mudança de coloração da solução do radical DPPH como consequência do decaimento de sua absorção provocada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um substrato antioxidante. B) Mecanismo de equilíbrio da reação.

A técnica constitui na incubação por 30 minutos à temperatura ambiente do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mmolL⁻¹,

com posterior leitura da absorbância em 517nm (MENSOR, 2001). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995). A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE₅₀ e maior será sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.* 2007), citado por LIMA *et al.* (2008).

2.4.5 Os óleos essenciais como agentes antioxidantes

O controle da oxidação nos produtos naturais e na alimentação processada é um dos grandes problemas da conservação dos alimentos. A oxidação lipídica não só produz sabores e aromas desagradáveis, como também diminui a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos devido à formação de produtos secundários (MORAIS, *et al.* 2006; MORAIS, 2007a).

Para contornar esses problemas são utilizados antioxidantes sintéticos. No entanto, a toxicidade desses produtos tem sido alvo de estudos ao longo dos anos. A legislação cada vez mais apertada em relação aos níveis permitidos destas substâncias tem estimulado à pesquisa de novos antioxidantes, mais seguros, com grande atividade antioxidante extraídos de fontes naturais (MORAIS, *et al.* 2006).

MORAIS (2007a), estudando a ação antioxidante dos óleos essenciais de *Croton* do Nordeste brasileiro, verificou que as espécies *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, *Croton nepetaefolius* Baill e *Croton argyrophylloides* Muell Arg apresentaram ação antioxidante relativamente equivalente ou superior ao BHT e α -tocoferol.

POLITEO *et al.* (2007) compararam a atividade antioxidante do óleo essencial e agliconas livres do *O. basilicum*, tendo como parâmetro o eugenol puro e o BHT. Estes concluíram que o óleo essencial dessa espécie apresenta atividade antioxidante semelhante ao eugenol e BHT. LEE *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes para o óleo essencial da mesma espécie vegetal quando comparado com o α -tocoferol e BHT, antioxidantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria de alimentos.

MARIUTTI e BRAGAGNOLO (2007) relataram que, na família Lamiaceae, os compostos responsáveis pela ação antioxidante são atribuídas aos compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e ácido caféico, principalmente nas espécies alecrim, sálvia, orégano e tomilho.

JAVANMARDI *et al.* (2003), estudando acessos de *O. basilicum* do Irã, relataram que 71% da atividade antioxidante nesta espécie são devidos à ação de compostos fenólicos, porém os 29% restantes devidos à atividade de outros metabólitos secundários tais como óleos voláteis, carotenóides e vitaminas, entre outros.

Os óleos essenciais são, do ponto de vista químico, misturas complexas, o que torna um tanto difícil explicar suas propriedades antioxidantes; no entanto, RUBERTO e BARATA (2000) estudaram aproximadamente 100 componentes puros de óleos essenciais quanto às suas propriedades antioxidantes e verificaram que os fenóis são os compostos mais ativos entre todas as substâncias estudadas, e entre os fenóis os mais ativos em ordem decrescente foram eugenol, carvacrol, timol, trans-anetol, metil-eugenol e, mais recentemente, o isoeugenol foi incorporado a esta lista por LEE *et al.* (2005), como sendo o mais ativo desta série.

Os mesmos autores relataram que, entre os monoterpenos, se destacam o g-terpineno, α -terpineno e terpinoleno, e, em menor extensão, o sabineno. Entre os monoterpenos oxigenados os alcoóis são os componentes mais ativos com uma leve predominância dos alílicos. Nos sesquiterpenos, segundo os mesmos autores, os alcoóis alílicos como farnesol e guaíol apresentam atividade média, sendo que a acetilação da hidroxila anula completamente a ação.

Finalizando, podemos afirmar em linhas gerais que esses metabólitos vêm-se destacando nos últimos anos como uma proposta promissora que aponta estas substâncias como substituintes potenciais dos antioxidantes de origem sintética, diminuindo, desta forma, os prováveis riscos à saúde humana e contribuindo de forma significativa com a qualidade e melhoria na segurança alimentar.

2.5 Aspectos gerais sobre o *Aedes aegypti* Linnaeus

O *Aedes aegypti* pertence ao ramo Arthropoda (pés articulados), classe Hexapoda (três pares de patas), ordem Diptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), família Culicidae e ao gênero *Aedes*.

A espécie é o principal vetor responsável pela transmissão da febre amarela urbana e da dengue, em todo o mundo. É um mosquito doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água parada. O mosquito deposita seus ovos nas paredes do recipiente próximo a lamina d'água, onde podem permanecer intactos por até 450 dias, bastando, apenas o contato com a água para ocorrer a eclosão. Esta pode acontecer em diferentes intervalos de tempo, dando ao *A. aegypti* maiores chances de sobreviver às adversidades do meio ambiente (BARRETO, 2005; BARRETO, 2006).

DONALÍSIO e GLASSER (2002) relatam que a temperatura é uma variável ambiental determinante na sobrevivência do vetor, o que limita a incidência da dengue nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Segundo os mesmos autores, o *A. aegypti* raramente persiste fora dos paralelos 45°N e 35°S. No entanto, devido ao aquecimento global existem projeções de elevação de 2°C na temperatura até o final do século XXI. Isto provavelmente aumentará a extensão da latitude e altitude da distribuição da dengue no planeta.

2.5.1 O ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O conhecimento do ciclo de vida do mosquito contribui para melhoria das formas de combate ao vetor. O *A. aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz em água parada, acumulada em recipientes preferencialmente fabricados pelo homem, a exemplo de: latas, pneus, vasos etc., dentro ou perto das habitações. Seu ciclo de vida compreende 4 estágios: OVO – LARVA – PUPA – ADULTO (TAUIL, 2001; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.5.1.1 Ovo

Os ovos do *A. aegypti* medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento, apresentam contorno alongado e fusiforme. São depositados pela fêmea, individualmente, nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros, próximos à superfície da água.

No momento da postura os ovos são brancos, mas, rapidamente, adquirem a cor negra brilhante (Figura 9).



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 9 – Ovos do *Aedes aegypti*

Os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano. Já foi observada a eclosão de ovos com até 450 dias, quando colocados em contato com a água. A capacidade de resistência dos ovos de *A. aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; CLARO *et al.* 2004).

2.5.1.2 A Larva

A fase larvária é o período de alimentação e crescimento. Durante esse período as larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se, onde passam por quatro estádios evolutivos. A duração dessa fase depende da temperatura, disponibilidade de alimentos e densidade das larvas no criadouro.

A larva do *A. aegypti* é composta de cabeça, tórax, abdômen e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água, (Figura 10).



Fonte: <http://saude.londrina.pr.gov.br>

Figura 10 – Larvas do *Aedes aegypti*

2.5.1.3 A Pupa

A pupa não se alimenta, tornando-a, desta forma, imune à alguns larvicidas que matam por ingestão, fato que dificulta o controle da espécie nesse estágio. É nessa fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. O estado pupal dura geralmente de dois a três dias. A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen. A cabeça e o tórax são unidos, constituindo a porção chamada cefalotórax, o que dá à pupa, vista de lado, a aparência de uma vírgula (Figura 11).



Fonte: <http://saude.londrina.pr.gov.br>

Figura 11 – Pupa do *Aedes aegypti*

2.5.1.4 O Adulto

O adulto do *A. aegypti* representa a fase reprodutora do inseto. Como ocorre com grande parte dos insetos alados, o adulto representa importante fase de dispersão. O *A. aegypti* é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto (Figura 12). O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos.



Fonte: <http://saude.londrina.pr.gov.br>

Figura 12 – Adulto do *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti*, após emergir da fase larval, está sexualmente apto para acasalar dentro de 24 horas, o que vale para ambos os sexos. A oviposição se dá mais frequentemente no fim da tarde. A fêmea grávida é atraída por recipientes escuros ou sombreados, com superfície áspera, nas quais deposita os ovos. A espécie prefere água limpa e cristalina ao invés de água suja ou poluída por matéria orgânica, porém há relatos na literatura que mostram evidências de que o mosquito pode também reproduzir-se em água poluída. A fêmea distribui cada postura em vários recipientes como forma de garantir ao máximo a sobrevivência da espécie. (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.5.2 A Dengue

A dengue é uma doença febril aguda, de etiologia viral e de evolução benigna na forma clássica, e grave quando se apresenta na forma hemorrágica. É hoje a mais grave doença viral humana transmitida por mosquitos especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *A. aegypti* (GUZMÁN e KOURI, 2001; TAUIL, 2001; BARRETO, 2006).

Os primeiros relatos de uma síndrome febril aguda semelhante à dengue foram detectados na ilha de Jacarta, na Ásia, no Cairo e Alexandria, no Egito em 1779 (SILVA, 2006).

No continente americano a dengue tem sido relatada há mais de 200 anos, sendo registrada no Caribe e Costa Atlântica dos Estados Unidos (1827), Havana, Nova Orleans (1848 a 1850), Cuba, Panamá, Porto Rico, Ilhas Virgens, Venezuela (1879 a 1880). Contudo, a primeira epidemia de dengue comprovada laboratorialmente nas Américas aconteceu em 1963/1964 na Venezuela e Região do Caribe, associada ao Sorotipo DEN-3 (SILVA *et al.* 2008).

No Brasil há referências de epidemias em 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista - Roraima, causado pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4. A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados (SANTOS, 2003) citado por Silva (2006).

A dengue clássica e a dengue hemorrágica são problemas preocupantes de Saúde Pública em regiões tropicais e subtropicais. A enfermidade apresenta ampla incidência nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que aproximadamente 1,3 bilhões de pessoas estejam em risco de serem infectadas com o vírus da dengue (FURTADO *et al.* 2005).

2.5.2.1 Medidas de controle

Até o momento não existe uma vacina para a prevenção da dengue. Enquanto não se pode contar com esta medida de controle, o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica

é o vetor. A luta contra o mosquito consiste principalmente na eliminação dos seus criadouros potenciais. As medidas de controle consistem na limpeza de terrenos baldios, aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas para as formas adultas do mosquito, durante os períodos de transmissão. As ações de prevenção da dengue necessitam de envolvimento de outros setores da sociedade, particularmente na questão da melhoria de condições de urbanização e habitação, coleta regular de lixo, abastecimento permanente de água encanada e educação escolar (TAUIL, 2001).

2.5.3 A problemática da resistência como mecanismo de defesa dos insetos.

Sabe-se que, numa população de insetos, quando submetida a uma carga continua de inseticidas, o desenvolvimento de resistência é um processo inevitável, pois esse fenômeno resulta do efeito seletivo da exposição dos indivíduos a dosagens que matam os mais suscetíveis, sobrevivendo os resistentes, que transferem essa capacidade a seus descendentes, tornando esta substância de controle inócua as futuras gerações (DONALÍSIO e GLASSER, 2002).

Em função dessa realidade com relação ao controle dos insetos, hoje se entende melhor que o combate a uma determinada praga ou vetor não pode ser feito de uma forma unilateral, mas através de um conjunto integrado de ações que visam driblar os mecanismos de defesa dos mesmos (VIEIRA *et al.* 2007).

Conforme os mesmos autores, atualmente é utilizado um conjunto de mecanismos de controle que abrange o emprego de feromônios (em geral, associados a inseticidas), inimigos naturais (controle biológico), produtos naturais insetífugos, deterrentes e que induzam mutações para alcançar esterilidade nas próximas gerações, hormônios interferentes nas ecdises dos insetos e outras estratégias que busquem não a erradicação do inseto-alvo, mas a um equilíbrio aos já desequilibrados ecossistemas.

Ainda de acordo com os mesmos autores a busca por novas substâncias inseticidas constitui-se num campo de investigação aberto, amplo e contínuo. A grande variedade de espécies vegetais no Brasil é um atrativo enorme na área de controle de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela dessas espécies já foi investigada com tal finalidade.

2.5.4 Os óleos essenciais como larvicidas

Na perspectiva de encontrar novas alternativas e, conseqüentemente, aumentar o leque de opções para o controle de insetos vetores, os óleos essenciais apresentam-se como uma proposta potencialmente viável. Na literatura, existem inúmeros relatos que apontam estes metabólitos como produtos promissores nessa área com inúmeras vantagens em relação aos larvicidas sintéticos (MORAIS *et al.* 2007b,c; SILVA *et al.* 2008; CHENG *et al.* 2008).

Muitas espécies vegetais nativas do Nordeste brasileiro têm-se mostrado viáveis para o controle larvicida do agente transmissor da dengue quando comparado com o temefós (O,O,O',O'-tetramethyl O,O'-thiodi-p-phenylene diphosphorothioate) a 100 ppm, que é a concentração utilizada pela Funasa (Fundação nacional de saúde), órgão responsável pelo controle da dengue no Brasil.

SANTOS *et al.* (2006) relataram para as espécies *Cordia leucomalloides* e *Cordia curassavica* uma concentração letal a 50% (CL₅₀) de 63,1±0,5 e 97,7±1,0 ppm respectivamente. Valores semelhantes de CL₅₀ são citados na literatura para os óleos de *Lippia sidoides* (63 ppm), *Cymbopogon citratus* (69 ppm), *Ocimum americanum* (67 ppm) e *Ocimum gratissimum* (60 ppm).

SIMAS *et al.* (2004), estudando o óleo essencial do *Myroxylon balsamum*, fez uma discussão interessante sobre atividade biológica x estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial. Segundo os autores, a presença de lipofilicidade dos terpenos é determinante para atividade larvicida sobre o vetor da dengue, quando se comparam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Para os fenilpropanos, foi observado segundo esses autores, que a presença de substituintes nucleófilos como, metoxilas, hidroxilas, benzodioxilas contribuem para diminuir a ação larvicida destes metabólitos.

Os mesmos pesquisadores relatam que plantas brasileiras, que apresentam óleos essenciais, contendo sesquiterpenos abundantes como nerolidol e farnesol, monoterpenos como α e β -pineno, carvona, geraniol e fenilpropanóides como safrol, eugenol e aldeído cinâmico são alternativas promissoras para o controle larvicida do *Aedes aegypti*.

2.6 Considerações gerais sobre fármacos

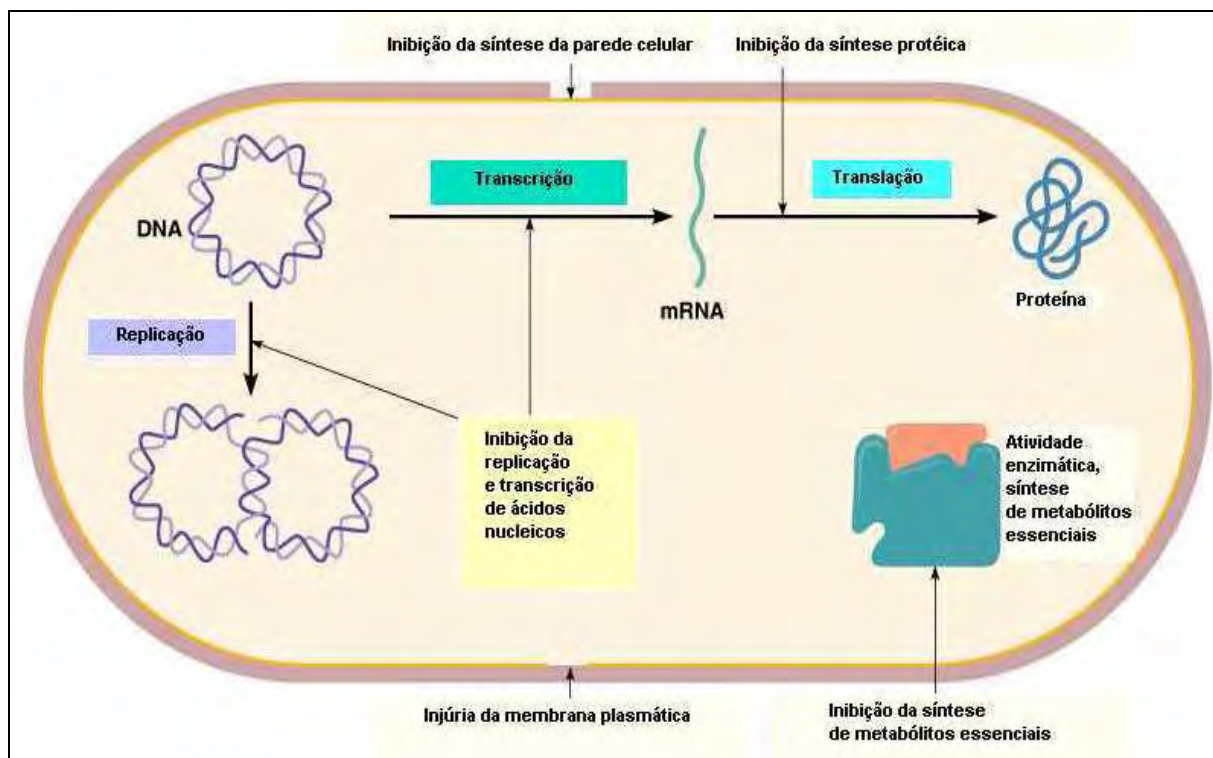
As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses usavam bolores para tratar infecções. Os sumérios recomendavam emplastos com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixas com a mesma finalidade, enquanto os ameríndios empregavam plantas alucinógenas para os mesmos fins em ritos pagãos (TAVARES, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2008).

Durante a Idade Média, muitas substâncias de origem animal, mineral e vegetal foram utilizadas nas práticas medicinais sem o conhecimento verdadeiro de suas propriedades químico-farmacêuticas, pois, até então, as práticas médicas tinham caráter amínico, sendo desta forma, praticadas através de rituais místicos, onde a medicina a magia e o curandeirismos estavam intimamente relacionadas. (RONAN, 1987; Di STASI, 1996).

A comprovação científica, no século XIX, da origem infecciosa de várias enfermidades estimulou as pesquisas no sentido de encontrar substâncias específicas no combate aos germes, como consequência surgiu então, no início do século XX, uma geração de antimicrobianos de ação sistêmica, entre as quais se destacaram as sulfas e, posteriormente, os antibióticos quando o marco inicial foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928 (TAVARES, 1996).

2.6.1 Mecanismos de ação dos antibióticos

Os mecanismos de ação dos antibióticos são classicamente atribuídos as ações que incluem inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; lesão da membrana citoplasmática; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas; interferência da síntese e replicação de DNA, ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (PELCZAR *et al.* 1996; TAVARES, 1996; TORTORA *et al.* 2001). A Figura 13 ilustra alguns mecanismos de ação antimicrobiana dos antibióticos na célula bacteriana.



Fonte: Franco, 2005

Figura 13 – Efeitos provocados pelos antibióticos na célula bacteriana.

2.6.2 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.

Segundo RIOS *et al.* (1988), citados, por BURT (2004), os ensaios para verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* podem ser resumidos em três métodos.

1) Métodos de difusão em Ágar

A substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente inoculado com o microrganismo teste. A leitura, que é qualitativa, é realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado.

2) Métodos de diluição

Uma quantidade de amostra é dissolvida homogeneamente em um meio sólido ou líquido. São feitas diluições da amostra original, inoculando-se o microrganismo teste. A leitura é realizada após o período de incubação considerando a primeira diluição em que não se observa turvação. Através deste método, que é quantitativo, pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano.

3) Métodos de bioautografia

A amostra complexa é eluída em cromatografia em camada delgada e, posteriormente, imersa em um meio de cultura sólido fundido previamente inoculado com o microrganismo teste. Após o período de incubação verifica-se a formação do halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana presente na amostra.

2.6.3 O fenômeno da resistência dos microrganismos patogênicos.

De acordo com SILVERMAN, (1992); WALSH, (2000); HANCOCK, (2005) citados por SILVEIRA *et al.* (2006), os métodos de resistência dos microrganismos aos antibióticos podem ser resumidos em três grupos distintos.

1) Inativação enzimática

Como penicilinas, cefalosporinas, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos de bactérias gram-positivas e gram-negativas (resistência a dalfopristina e penicilinas).

2) Rceptores alterados

Expressas por alterações ribossômicas, alterações de DNA girase, enzimas bacterianas alteradas (resistência à eritromicina e vancomicina).

3) Transporte alterado do antibiótico

Esse fenômeno é provocado por alterações nas proteínas da membrana externa, força protônica reduzida e transporte ativo a partir da célula bacteriana (resistência a tetraciclinas e fluoroquinolonas).

A resistência de patógenos humanos e animais às drogas é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo indiscriminado de antibióticos, em muitos países, tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006; SILVEIRA *et al.* 2006; NEDOROSTOVA *et al.* 2009).

As superbáctérias, como são conhecidos esses patógenos, são capazes de resistir a todos os antibióticos conhecidos atualmente e, essa resistência custa somente aos Estados Unidos 5 bilhões de dólares anualmente (TAVARES, 2000; SILVEIRA, *et al.* 2006; SEGATTO, 2008). Só nos Estados Unidos surtos provocados por uma única superbácteria a *Staphylococcus aureus* conhecida como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina), afetaram centenas de milhares de pessoas e mataram 19 mil no país em 2006 (SEGATTO, 2008).

Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas, a partir de fontes naturais ou sintéticas, é necessária e urgente, pois a Saúde Pública em todo o mundo está ameaçada.

Com esse objetivo vários extratos de plantas vêm sendo testados com a finalidade de descobrir novas drogas com atividades antimicrobianas. Os vegetais ricos em taninos, flavonoides, polifenóis e óleos essenciais estão entre as substâncias de origem vegetal mais promissoras para esta atividade.

2.6.4 Atividade antibacteriana do óleo essencial das espécies do Gênero *Ocimum*.

OPALCHENOVA e OBRESHKOVA (2003) descrevem que o óleo essencial do *O. basilicum* apresenta atividade antibacteriana frente às cepas resistentes dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*. Porém SARTORATTO *et al.* (2004) não encontraram atividade antibacteriana para mesma espécie vegetal frente a *P. aeruginosa*.

ORAFIDIYA *et al.* (2001) relatam que o óleo essencial do *O. gratissimum* apresenta melhor atividade antibacteriana quando formulado em base hidrofílica do que em base lipofílica. Neste sentido, LUND (1994), citado por ORAFIDIYA *et al.* (2006), relatam que os Tweens são responsáveis por comprometer ou inativar agentes antimicrobianos que apresentam grupos fenólicos ou carboxílicos.

Desta forma, ORAFIDIYA *et al.* (2006) propõem que a baixa atividade de emulsões do óleo de espécies do gênero *Ocimum* em Tween 20 parece ser devido a essas interações, assim como o efeito do filme emulsificante ao redor das gotas do óleo disperso. Observações similares foram relatadas para o Tween 80 (ORAFIDIYA *et al.* 2001). Portanto, de acordo com esses trabalhos, os autores demonstraram que a atividade antibacteriana do óleo essencial dessas espécies pode ser influenciada pela rede de cargas elétricas do surfactante com o qual ele foi formulado.

2.6.5 Mecanismos de ação dos óleos essenciais frente às bactérias patogênicas

Considerando-se os diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é mais provável que a atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas a vários fatores que contribuem para o desequilíbrio celular.

Uma importante característica dos óleos essenciais e seus componentes é a hidrofobicidade. Esta propriedade lhes permitem fazer interações com os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocôndria, perturbando assim a seletividade dessas estruturas e tornando mais permeáveis aos eletrólitos celulares (KNOBLOCH *et al.* 1986; SIKKEMA *et al.* 1994), provocando assim a fuga de íons e outros componentes celulares, que, dependendo do equilíbrio intracelular, pode ser tolerado ou levar a morte da célula.

Segundo a literatura relacionada a seguir, os óleos essenciais atuam na célula bacteriana provocando fenômenos como degradação da parede celular (THOROSKI *et al.* 1989); destruição da membrana citoplasmática (ULTEE *et al.* 2002a); destruição das proteínas presentes na membrana celular (ULTEE *et al.* 1999), fuga de componentes celulares (LAMBERT *et al.* 2001); coagulação do citoplasma (GUSTAFSON *et al.* 1998) e diminuição da força motriz protônica (ULTEE e SMID 2001; ULTEE *et al.* 1999). Conforme os autores citados, esses fatores isolados ou em conjunto são responsáveis pela atividade antibacteriana observada nos óleos essenciais.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar quimicamente o óleo essencial e as partes aéreas, avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial, assim como testar suas propriedades larvicidas frente às larvas do mosquito *A. aegypti*, e verificar suas possíveis propriedades antioxidantes pelo método do radical DPPH.

3.2 Objetivos específicos.

- ❖ Extrair quantitativamente o óleo essencial do *Ocimum basilicum*;
- ❖ Caracterizar fisicamente o óleo essencial;
- ❖ Identificar analiticamente os metabólitos secundários do óleo essencial usando a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- ❖ Estudar as propriedades térmicas do óleo essencial por Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- ❖ Identificar as principais classes de substâncias fitoquímicas através da triagem fitoquímica das partes aéreas da espécie vegetal;
- ❖ Verificar a atividade antibacteriana do óleo essencial frente às bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e *Vibrio parahaemolyticus*;
- ❖ Comparar a atividade antibacteriana dos antibióticos testados em relação ao óleo essencial frente às mesmas bactérias;
- ❖ Estudar a atividade antioxidante do óleo essencial através do método do radical DPPH;
- ❖ Determinar a atividade larvicida do óleo essencial frente às larvas do *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO IV

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

4.1.1 pH–metro

As medidas de pH das soluções foram realizadas em pH–metro Digimed, modelo DMPH/1 com precisão 10^{-1} unidades com um eletrodo combinado de vidro.

4.1.2 Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro ABBE, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração. Anexo 01

4.1.3 Evaporador Rotatório

Utilizou-se um rotoevaporador Quimis, modelo 344-2 para a evaporação dos solventes. Anexo 02

4.1.4 Extrator de Clevenger

Utilizou-se um extrator tipo Clevenger confeccionado em vidro, acoplado a um balão de vidro, com capacidade de 6 litros, para a extração do óleo essencial das partes aéreas do *O. basilicum* (Figura 14).

4.1.5 Espectrofotômetro de ultravioleta

A avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do *O. basilicum* foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-vis Varian, modelo Cary 50 Conc. Anexo 03.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 14 – Extrator tipo Clevenger usado para a obtenção do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum*.

4.1.6 Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas com o auxílio de um equipamento Shimadzu, modelo QP-5000, equipado com uma coluna capilar (30m x 0,25mm x 0,25um) HP-5MS 5% difenil 95% dimetil polisiloxano interfaciado com um detector quadrupolo linear (detector de massas) com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e varredura (0,5 seg) na faixa de 40-500 Daltons.

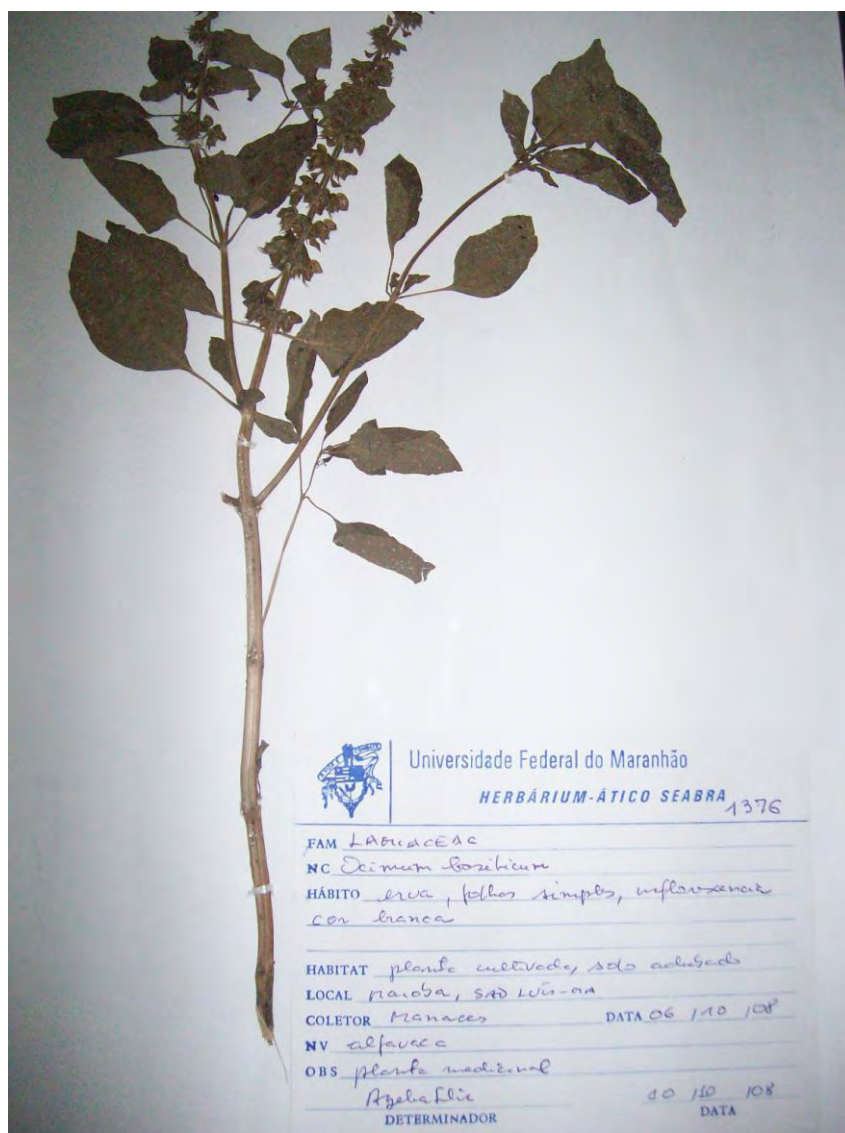
4.1.7 Analisador térmico

Utilizou-se um analisador térmico da TA Instruments, modelo SDT 2960. Anexo 04.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta e identificação da espécie vegetal

Amostras semiarbustivas foram coletadas em outubro de 2008 por volta das 15 horas na localidade Maioba, na região metropolitana de São Luís – MA. A identificação taxonômica foi feita no Herbário Ático Seabra do departamento de Botânica da Universidade Federal do Maranhão, onde a exsicata está depositada sob o número 1376, Figura 15.



Fonte: O próprio autor, 2009

Figura 15 – Exsicata da espécie vegetal *Ocimum basilicum*

4.2.2 Triagem fitoquímica

As partes aéreas secas a temperatura ambiente (32°C) do *Ocimum basilicum* foram moídas; ao pó obtido, 100 gramas, adicionou-se 3 partes de álcool etílico comercial. Assim, a mistura ficou sobre maceração por 96 horas, tendo-se sempre o cuidado de agitar diariamente para promover um maior contato entre o solvente e o material vegetal. O solvente foi renovado por outras três vezes, totalizando-se quatro extrações. O filtrado obtido foi concentrado em evaporador rotatório a 75°C, (Anexo 02) sob pressão reduzida e conservada em frasco âmbar.

4.2.2.1 Prospecção dos constituintes fitoquímicos das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*

A prospecção fitoquímica no extrato hidroalcoólico das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*, foi realizada segundo Matos (1988). O fluxograma da Figura 16 mostra o procedimento realizado.

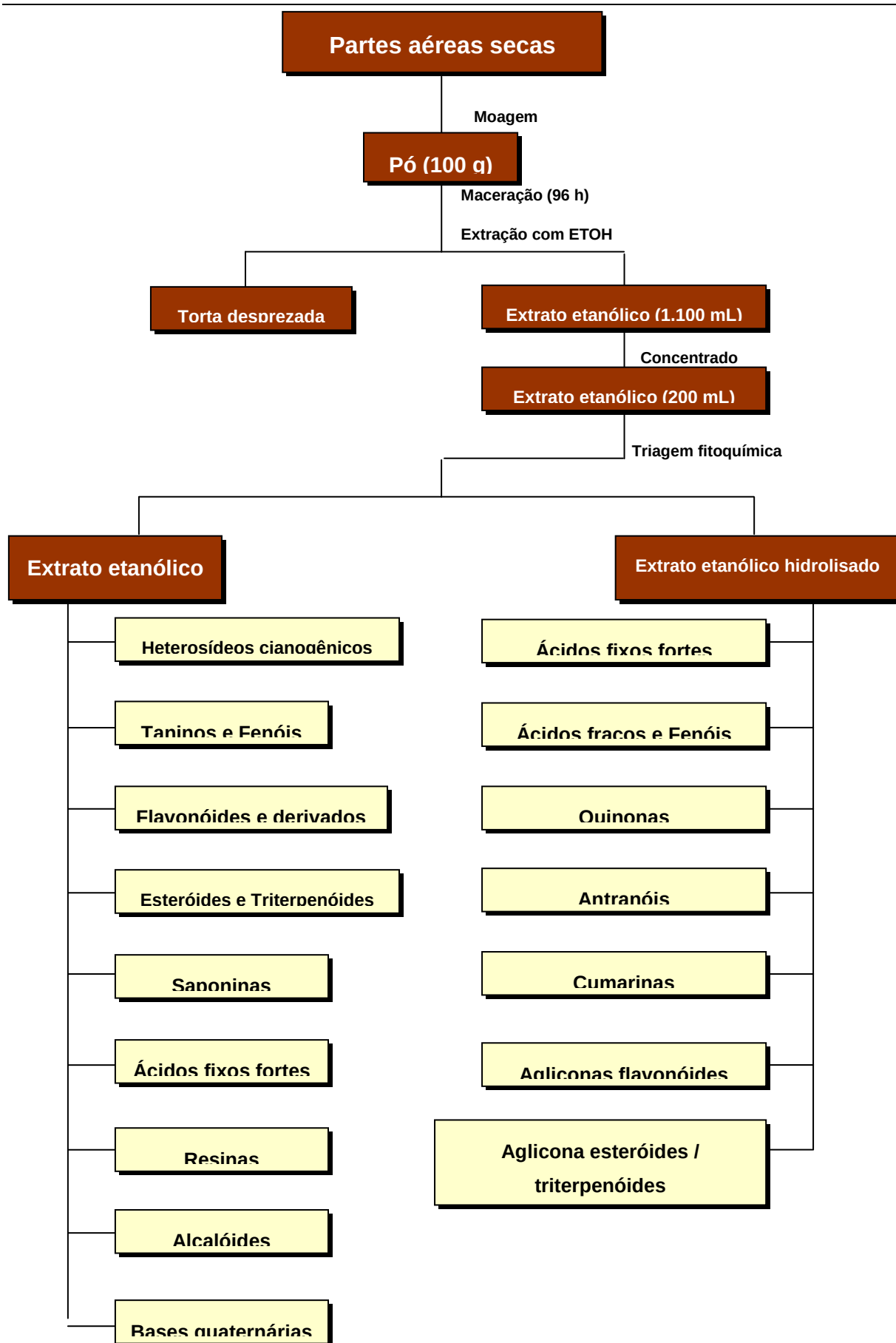


Figura 26 – Fluxograma de preparação do extrato etanólico e prospecção dos constituintes fitoquímicos das partes aéreas secas do *O. basilicum*

4.2.3 Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido das partes aéreas da espécie vegetal seca e fresca. Inicialmente, as partes aéreas do *O. basilicum* foram desidratadas a sombra sobre bancada a temperatura ambiente (32°C) por uma semana, estas foram então trituradas em moinho de facas de onde se obteve um pó de cheiro forte e característico. Este foi guardado em frasco de polietileno até o momento da extração. Para a obtenção do óleo das partes aéreas frescas estas foram pesadas, e então, trituradas em liquidificador até se obter uma mistura homogênea e pastosa.

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação a 100°C através de um sistema de Clevenger na proporção 1:10 (m/v) amostra, água destilada respectivamente. O óleo obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e acondicionado em frasco âmbar e guardado em ambiente refrigerado. O rendimento foi determinado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Volume do óleo (mL)}}{\text{Massa vegetal (g)}} \times 100$$

4.2.4 Análises físicas do óleo essencial de *Ocimum basilicum*

4.2.4.1 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do óleo essencial foi determinada através do método do picnômetro, por comparação das massas de igual volume da amostra de óleo essencial e de água recém-destilada a 25°C. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.4.2 Determinação do índice de refração

O índice de refração do óleo essencial foi obtido em refratômetro de Abbé (anexo 01), em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm (raia D) à temperatura

de 25°C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração foi de 1,3325 a 25°C. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.4.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool.

A solubilidade do óleo essencial em solução hidroalcoólica a 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v) e 90% (v/v) foi determinada em bureta de 25 mL. Cada solução foi gotejada sobre 100 µL do óleo essencial até a solubilização total da amostra. O volume da solução gasta na bureta (em décimos de mL) foi registrado, e a relação de solubilidade foi estabelecida.

4.2.5 Estudo térmico e análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum*

4.2.5.1 Estudo térmico

O estudo térmico é conceituado como um conjunto de técnicas que permitem medir as mudanças de uma propriedade física e/ou química de uma substância ou material, em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002; FERNANDES, 2005). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de Termogravimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial nas condições descritas a seguir.

4.2.5.1.1 Termogravimetria (TG)

Estas foram realizadas em um analisador térmico, TA Instruments SDT 2960, através do método dinâmico de análise, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em atmosferas

de ar sintético e nitrogênio com fluxo de $110 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ no intervalo de 25–600°C, utilizando cadinho de alumina e massa de 10 mg (Anexo 04).

4.2.5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Estas foram obtidas em condições não isotérmicas em um Analisador Térmico DSC 2920 da TA Instruments, razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em atmosferas de ar e nitrogênio com fluxo de $110 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ no intervalo de temperatura de 25-600 °C, com cerca de 10 mg da amostra, (Anexo 04).

4.2.5.2 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas nas seguintes condições: Volume injetado 0,3 μL em diclorometano; Temperatura do injetor 280°C, modo split (1:10); Gás carreador, hélio (99,9995%) com vazão de 1,0 mL/min; Programação de temperatura do forno: 40°C (5,0 min.) – 240°C (4°C/min.); 240°C – 300°C (8°C/min, 7,5 min) e linha de transferência 280°C. A identificação dos constituintes detectados na amostra foi feita com base nas bibliotecas NIST (National Institute of Standards and Technology), WILEY139 e no programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System) e também pela interpretação visual dos espectros de massas obtidos segundo ADAMS (1995).

4.2.6 Atividade antioxidante do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

Para monitorar a capacidade de sequestrar radicais livres (atividade antioxidante) do óleo essencial, obtidos das partes aéreas frescas e secas da espécie vegetal, foram preparadas as seguintes soluções. Em dois conjuntos de oito balões volumétricos de 50 mL contendo 2,5 mL de uma solução de DPPH $0,3 \text{ mmolL}^{-1}$ cada um, foram adicionados volumes crescentes do óleo essencial, sendo que o balão 1 continha apenas a solução etanólica do

DPPH, Figuras 17 e 18. As medidas de absorbâncias foram iniciadas logo após todos os balões serem completados com álcool etílico para um volume de 50 mL. O decréscimo de absorbância foi avaliado a $\lambda=517\text{nm}$ e $T=25^\circ\text{C}$. Etanol de pureza analítica foi utilizado como branco no espectrofotômetro. Os valores das absorbâncias encontradas estão presentes nos Anexos 5 e 6 do capítulo 9.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figuras 17 – Experimento da atividade antioxidante, pelo método do radical DPPH, do óleo essencial obtido das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figuras 18 – Experimento da atividade antioxidante, pelo método do radical DPPH, do óleo essencial obtido das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*.

Nos experimentos foram efetuadas leituras em intervalos de 30 em 30 minutos por um período de 150 minutos. O percentual de inibição do radical DPPH nas concentrações testadas foi calculado convertendo os valores de absorbâncias obtidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) através da seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{[(ABS \text{ amostra} - ABS \text{ branco})] \times 100}{ABS \text{ DPPH}}$$

4.2.6.1 Cálculo da concentração inibitória a 50% (CI₅₀)

O valor da CI₅₀ visa dar parâmetros numéricos de quanto o substrato é capaz de produzir substâncias antioxidantes e verificar a eficácia do mesmo frente a radicais livres no modelo testado. Os valores de %AA e das concentrações foram relacionadas utilizando o programa Excel do Windows, obtendo-se para cada experimento, a equação da reta (anexos 7 a 19). A resolução desta equação (substituindo o valor de Y pelo Ln 50) resultou no valor da CI₅₀, que é a concentração necessária para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para o óleo essencial da espécie vegetal.

4.2.7 Atividade antibacteriana do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

A metodologia descrita a seguir foi delineada com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do *O. basilicum*.

4.2.7.1 Microrganismos testados

Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC25922) e

de origem alimentar: *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrofila*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e *Vibrio parahaemolyticus*.

4.2.7.2 Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura Brain Heart Infusion – BHI (Merck), Mueller-Hinton ágar – MHa (Merck) e Ágar PCA – (Merck) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada nas quantidades de 37g, 38g e 22,5g, respectivamente conforme recomendado pelo fabricante.

4.2.7.3 Cultivo dos microrganismos

Todas as bactérias testadas foram cultivadas por um período de 24 horas antes da realização dos testes. Este procedimento foi realizado passando cada microrganismo do meio de manutenção (Ágar TSA), com o auxílio de uma alça de platina, para tubos de ensaio com caldo BHI e incubados a 37°C.

4.2.7.4 Atividade antibacteriana

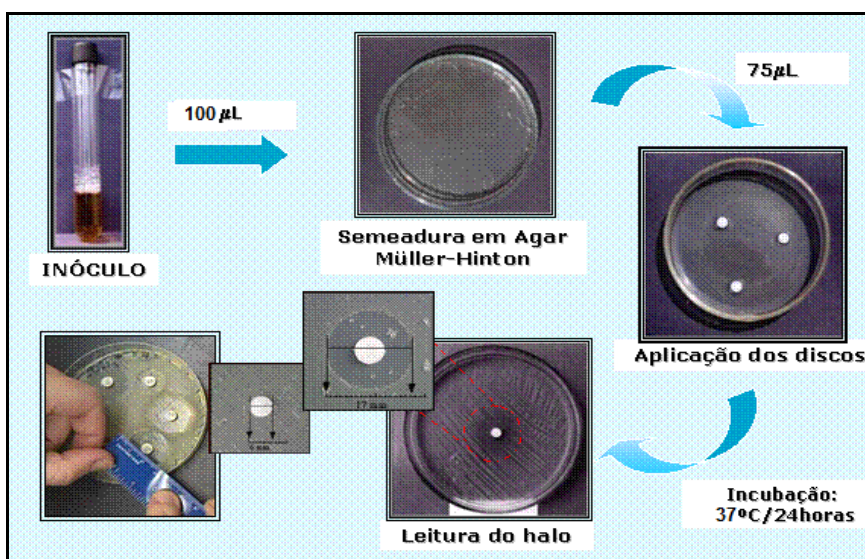
A atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do *O. basilicum* foi feita no laboratório de microbiologia de alimentos (Pavilhão Tecnológico) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) através da metodologia de difusão em discos.

4.2.7.4.1 Método de difusão em discos (MDD)

Este foi realizado segundo BAUER-KIRBY *et al.* (1966). Foram colocados 21 discos estéreis de papel com 6 mm de diâmetro numa placa de Petri estéril. Sobre cada disco

foram adicionados 75 µL do óleo essencial para que estes ficassem bem saturados no óleo. Em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton foram adicionados 100 µL do inóculo de 24 horas em cada placa; em seguida, foi feita a homogeneização através de swabs estéreis até formar um filme uniforme sobre o ágar, onde foram colocados os discos, sendo 3 discos em cada placa pois estes foram realizados em triplicata. Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para medir o diâmetro das zonas de inibição e quantificar a sensibilidade dos microrganismos frente ao óleo testado, foi utilizado o critério relatado por CIMANGA *et al.* (2002), que adota a seguinte classificação para as zonas de inibição: $zdi \geq 15$ forte inibição; $10 \leq zdi < 15$ inibição moderada, $zdi < 10$ inativo. Para o controle positivo foram utilizados os antibióticos Tetraciclina 30 µg/disco, Ampicilina 10 µg/disco, Penicilina 10 µg/disco, Vancomicina 30 µg/disco, através dos mesmos procedimentos (Figura 19).



Fonte: Nascimento, (2004)

Figura 19 – Esquema do método de difusão em discos segundo BAUER-KIRBY *et al.* (1966).

4.2.8 Atividade larvicida do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

4.2.8.1 Coleta dos ovos do *Aedes aegypti*

Os ovos foram coletados no bairro do Anjo da Guarda, em São Luís Maranhão, através de armadilhas denominadas ovitrampas. Estas consistem de baldes pretos, de

polietileno, com capacidade de 500 mL cada um, onde foi colocada água e inserida uma ou duas palhetas de eucatex para a ovoposição do mosquito (Figura 20). As armadilhas foram inspecionadas semanalmente para a substituição das palhetas e recolhimento dos ovos para serem identificados no Laboratório de Entomologia e Vetores do departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, Figura 21.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 20 – Modelo de Ovitrapa utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 21 – Ovos do *Aedes aegypti* coletados semanalmente através de armadilhas ovitrapas.