



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

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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 larvicida 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 larvicida. 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

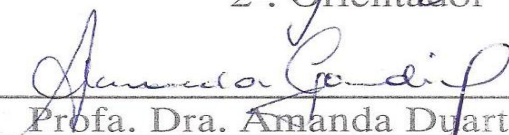
Banca Examinadora:


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

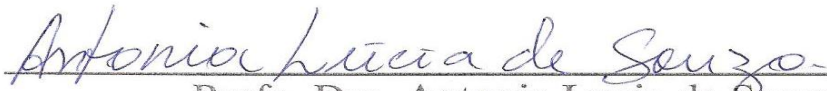
Aprovada pela banca examinadora:

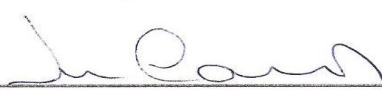
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento  
Orientadora/Presidente

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Amanda Duarte Gondim  
Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marta Maria da Conceição  
Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. 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 Andressa 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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 <sup>-1</sup> no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e razão de aquecimento de 10°C. min. <sup>-1</sup> .....	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 <sup>-1</sup> no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e razão de aquecimento de 10°C. min. <sup>-1</sup> .....	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 <sup>-1</sup> 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. <sup>-1</sup> , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. min. <sup>-1</sup> .....	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. <sup>-1</sup> , em atmosfera de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. min <sup>-1</sup> .....	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. <sup>-1</sup> , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C e vazão de 110 mL. Min <sup>-1</sup> .....	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 <sub>50</sub> 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 <sub>50</sub> 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
$\lambda$	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
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
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
<b>2.3 Metabólitos ativos .....</b>	<b>25</b>
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
<b>2.4 Considerações sobre agentes antioxidantes.....</b>	<b>30</b>
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
<b>2.5 Aspectos gerais sobre o <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus .....</b>	<b>37</b>
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
<b>2.6 Considerações gerais sobre fármacos .....</b>	<b>45</b>
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
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
3.1 Objetivo geral .....	52
3.2 Objetivos específicos .....	52
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS .....</b>	<b>54</b>
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
<b>4.2 METODOLOGIA.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Coleta e identificação da espécie vegetal .....	56
4.2.2 Triagem fitoquímica .....	57
4.2.2.1 Prospecção 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 <sub>50</sub> ).....	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**

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>70</b>
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

<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>
<b>CAPÍTULO IX</b>	
<b>ANEXOS .....</b>	<b>126</b>

# 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

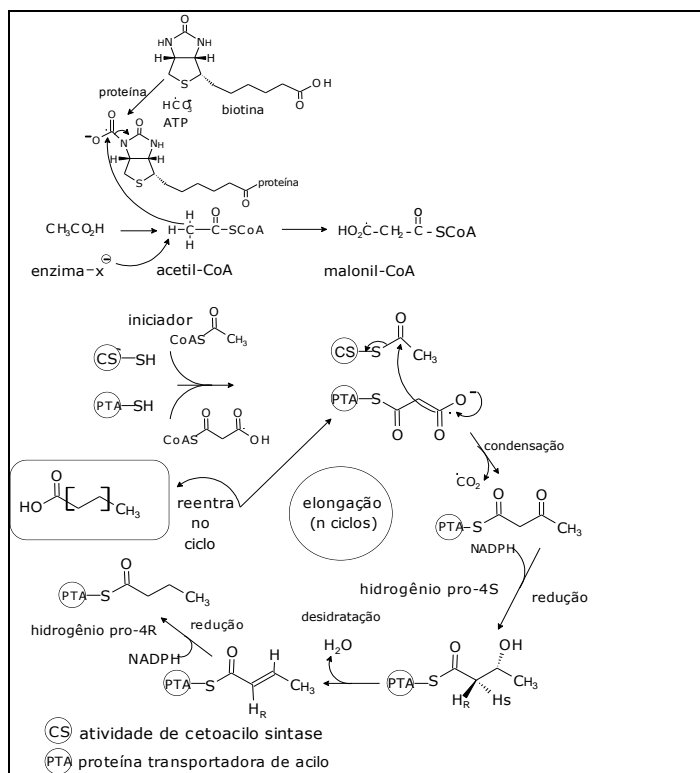
### 2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais

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 isoprenoídes, 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)

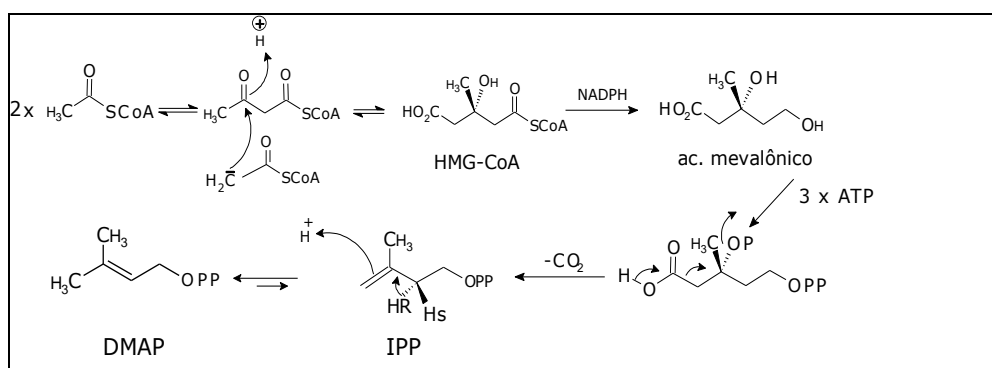
Figura 2 – Rota Biossintética dos ácidos graxos

### 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 C<sub>5</sub>, 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).

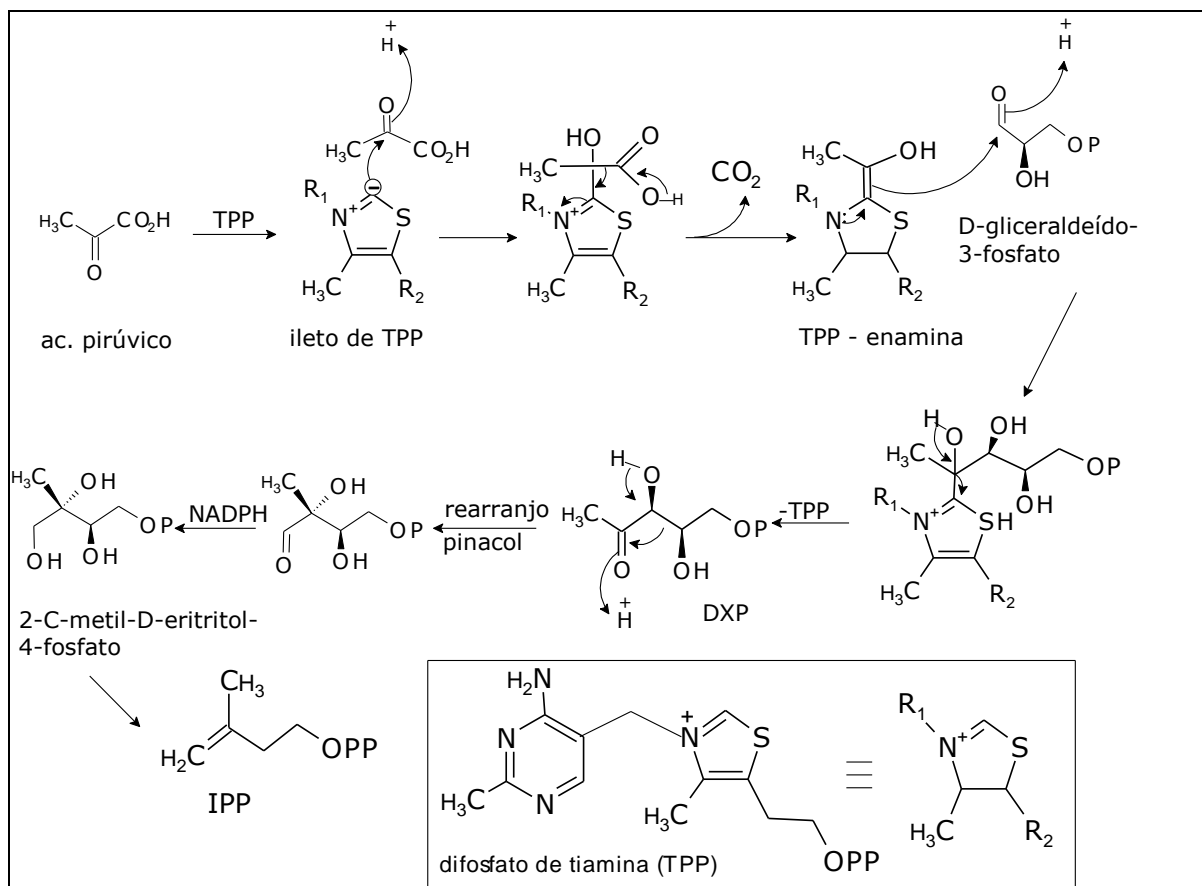
O ácido mevalônico, da via mevalonato, provém da condensação inicial de três moléculas do acetil-SCoA, que origina o éster β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), o qual, por via de hidrólise e redução enzimática dá origem ao ácido mevalônico (Figura 3). A transformação deste intermediário no IPP envolve a fosforilação sucessiva dos grupos hidroxilo, seguida da descarboxilação e eliminação de um grupo pirofosfato. Uma isomerase remove o próton pro-R (H<sub>R</sub>) 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.

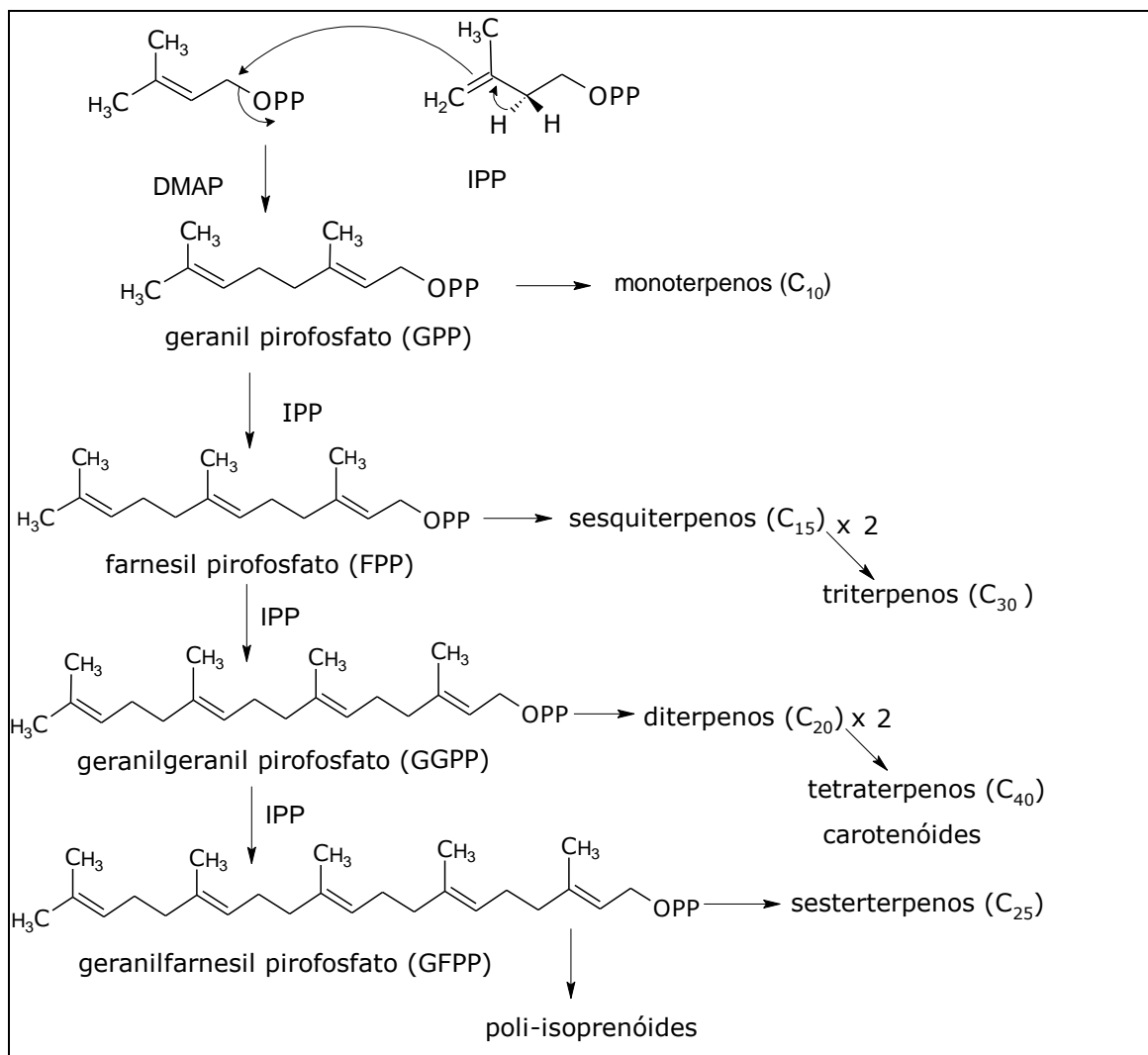
ABREU e HEGGIE, (2007) descrevem que a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), intermediário envolvido na outra via biosintética dos terpenóides, é formada a partir de dois produtos da glicose, o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído, num processo mediado pela coenzima tiamina difosfato (TPP). Por via de um 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  $\text{C}_{10}$  com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de farnesil pirofosfato ( $\text{C}_{15}$ ), geranylgeranyl pirofosfato ( $\text{C}_{20}$ ) e geranylgeranyl pirofosfato ( $\text{C}_{25}$ ), 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).

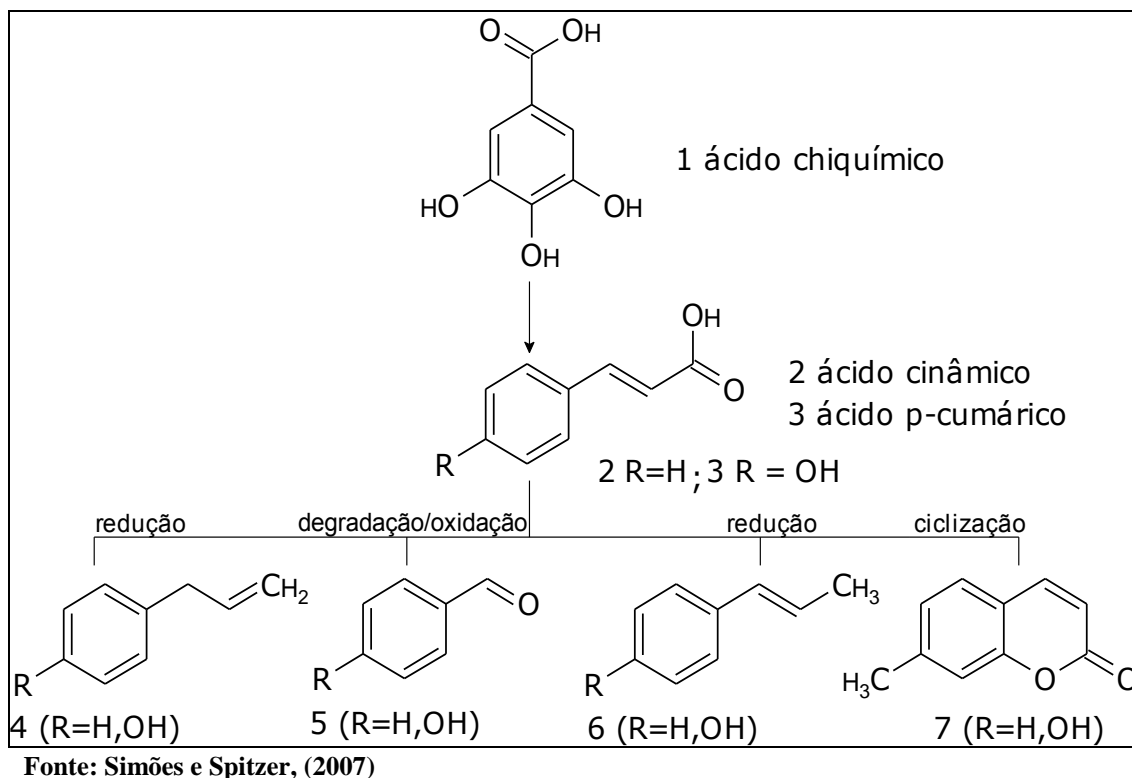


Figura 6 – Biossíntese dos fenilpropanos

## 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

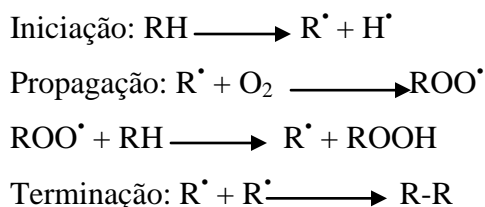


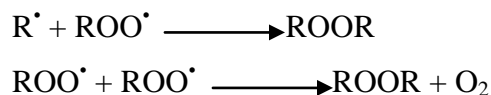
processo de envelhecimento celular (CAI *et al.* 2004; MARTINS *et al.* 2004; ROESLER *et al.* 2007).

#### 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  $\text{O}_2$  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 sinérgicas 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  $\alpha$ -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).

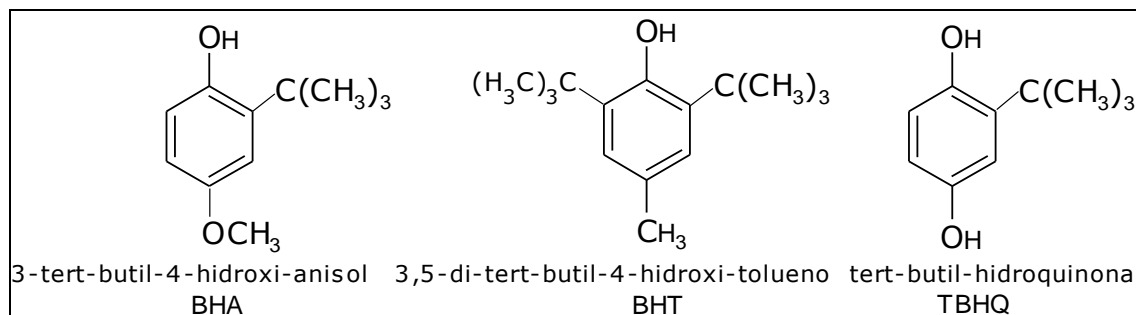


Figura 7 – Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos

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

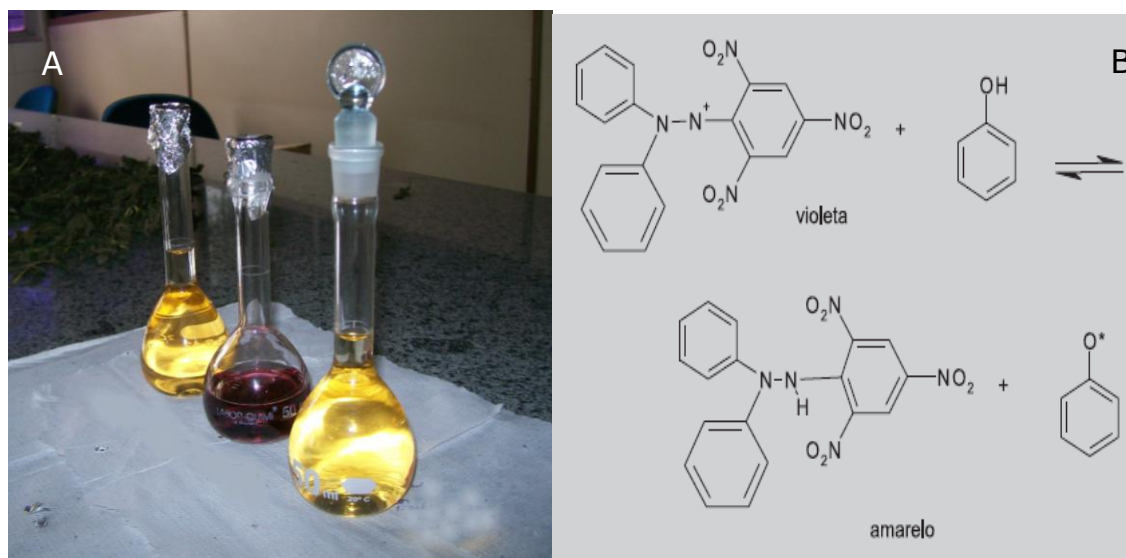
Segundo MORAIS (2007a), os testes antioxidantes *in vitro* podem ser agrupados em duas categorias: **i.** Usa-se um radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS<sup>+</sup>[2,2'-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolino-6-sulfonato)] e mede-se a capacidade do produto natural de sequestrar 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,  $\alpha$ -tocoferol ou BHT). Alguns dos métodos mais citados na literatura estão descritos a seguir.

- Sequestrador de radical DPPH;
- Sequestrador de radical ABTS;<sup>+</sup>
- Sistema  $\beta$ -caroteno-linoleato;
- Teste de peroxidação lipídica com  $\text{FeCl}_3$ ;
- 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  $0,3 \text{ mmolL}^{-1}$ ,

com posterior leitura da absorvância 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 (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE<sub>50</sub> 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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,  $\alpha$ -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 guaiol 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% (CL<sub>50</sub>) de 63,1±0,5 e 97,7±1,0 ppm respectivamente. Valores semelhantes de CL<sub>50</sub> 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  $\alpha$  e  $\beta$ -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, zimbros 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).

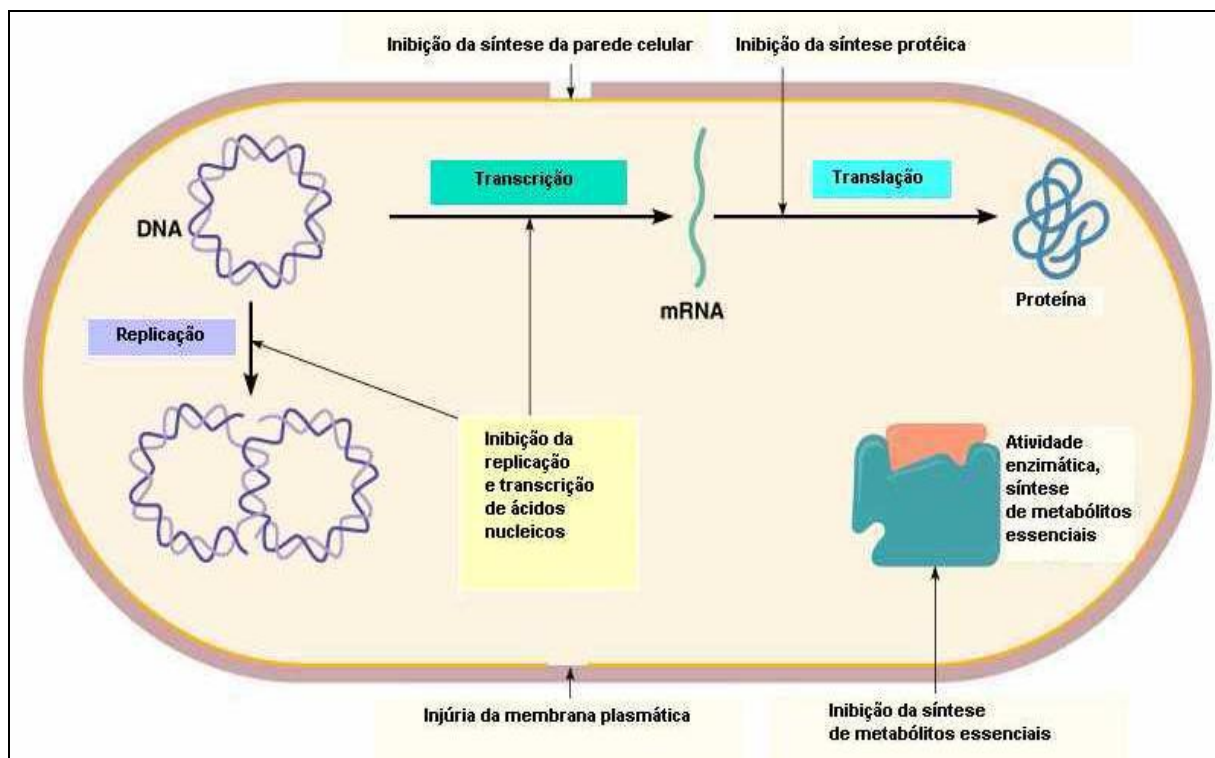
Durante a Idade Média, muitas substâncias de origem animal, mineral e vegetal foram utilizadas nas práticas medicinais sem o conhecimento verdadeiro de suas propriedades químico-farmacêuticas, pois, até então, as práticas médicas tinham caráter amínico, sendo desta forma, praticadas através de rituais místicos, onde a medicina a magia e o curandeirismo 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 penicilinases, cefalosporinases, 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 tetraciclina 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 superbactérias, 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 superbactéria 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 hydrofila*, *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.

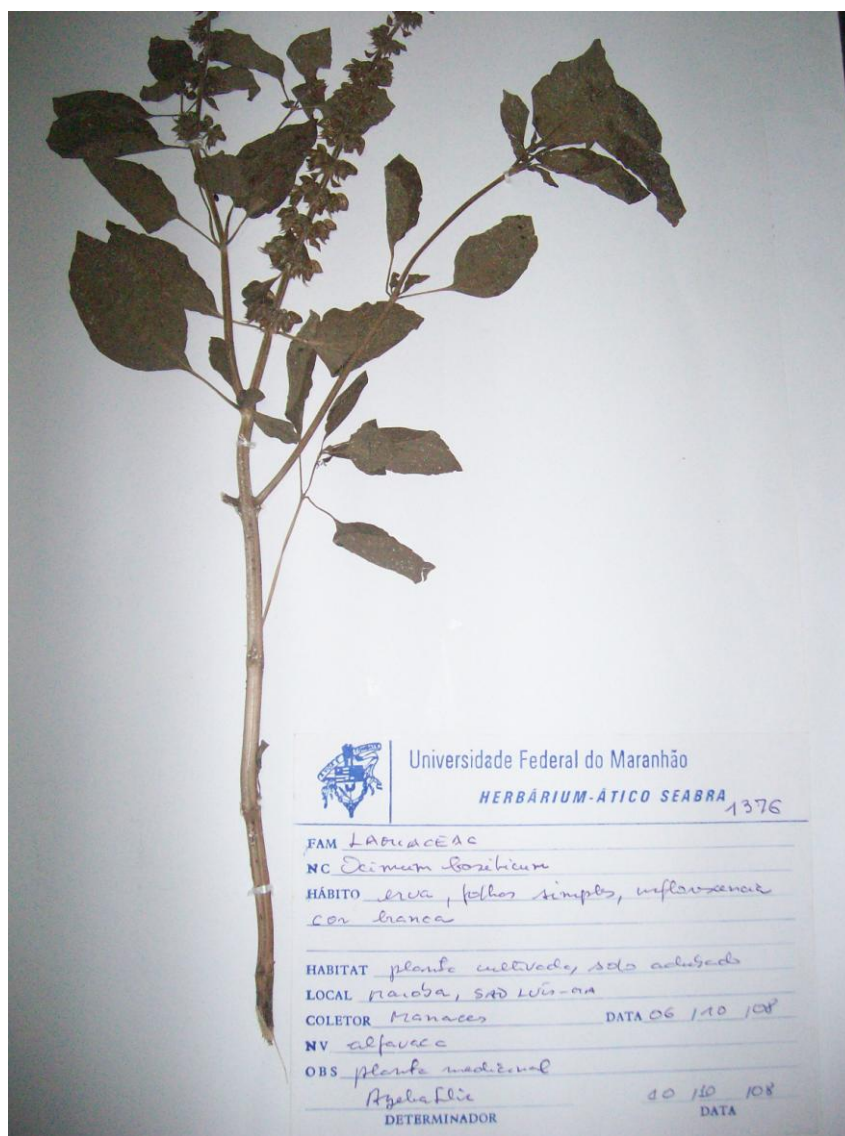
#### 4.1.7 Analisador térmico

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 semiarbusivas 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.

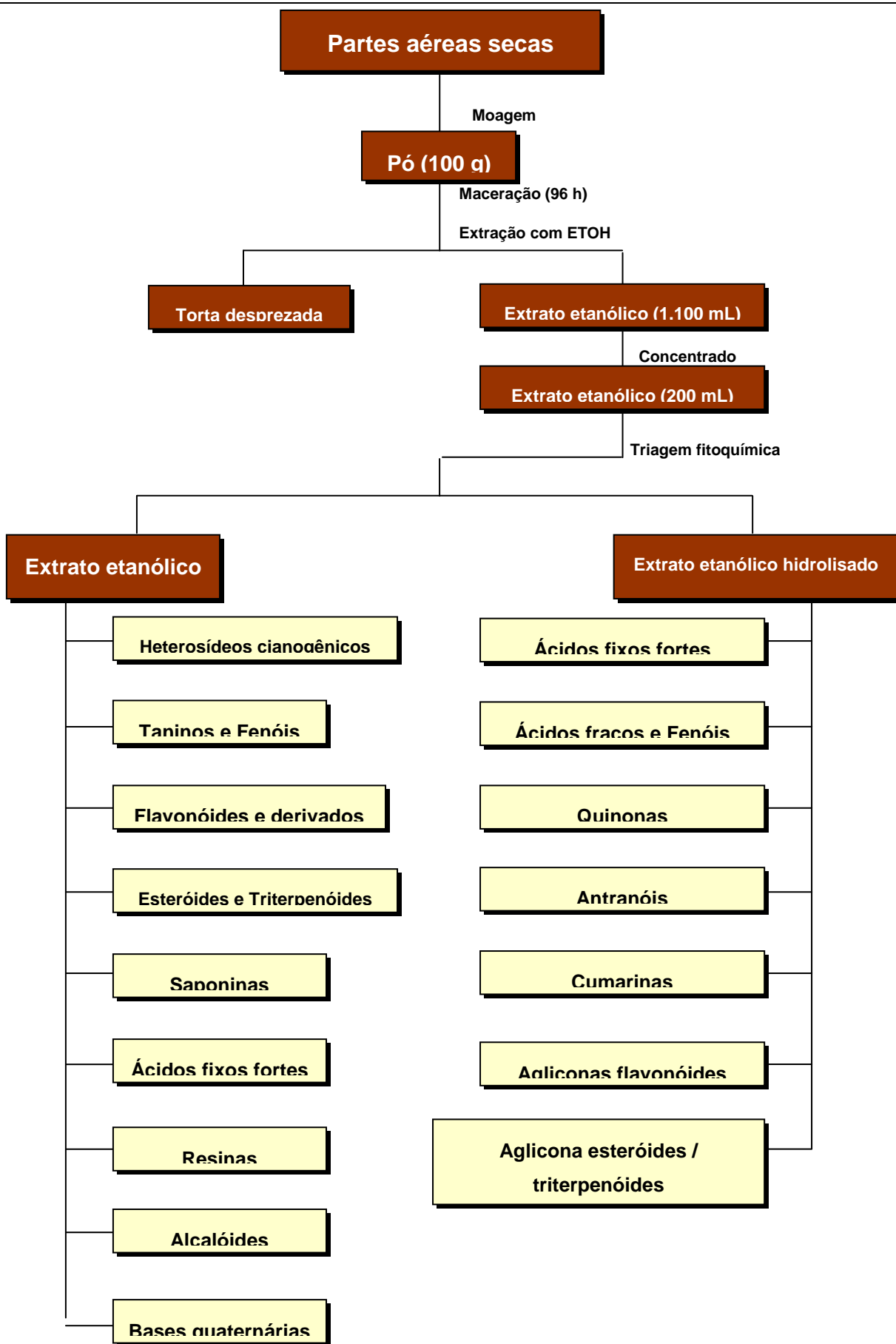


Figura 26 – Fluxograma de preparação do extrato etanólico e prospecção dos constituintes fitoquímicos das partes aéreas secas do *O. basilicum*

### 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<sup>-1</sup>, em atmosferas

de ar sintético e nitrogênio com fluxo de  $110 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  no intervalo de  $25\text{--}600^\circ\text{C}$ , 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  $25\text{--}600^\circ\text{C}$ , 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  $0,3 \mu\text{L}$  em diclorometano; Temperatura do injetor  $280^\circ\text{C}$ , modo split (1:10); Gás carreador, hélio (99,9995%) com vazão de  $1,0 \text{ mL}/\text{min}$ ; Programação de temperatura do forno:  $40^\circ\text{C}$  (5,0 min.) –  $240^\circ\text{C}$  ( $4^\circ\text{C}/\text{min}$ .);  $240^\circ\text{C}$  –  $300^\circ\text{C}$  ( $8^\circ\text{C}/\text{min}$ , 7,5 min) e linha de transferência  $280^\circ\text{C}$ . 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  $2,5 \text{ mL}$  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 absorvâncias foram iniciadas logo após todos os balões serem completados com álcool etílico para um volume de 50 mL. O decréscimo de absorvância 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 absorvâncias 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:

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

#### 4.2.6.1 Cálculo da concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>)

O valor da CI<sub>50</sub> 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 CI<sub>50</sub>, 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**

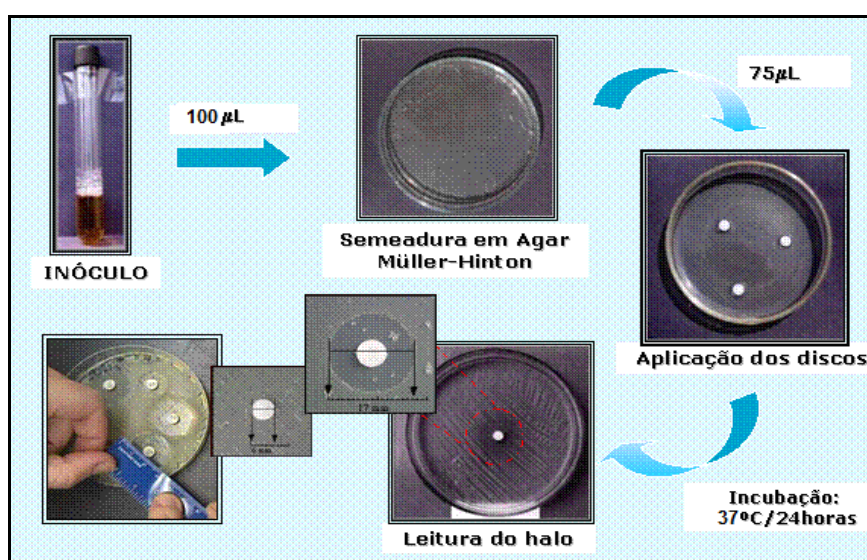
A atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do *O. basilicum* foi feita no laboratório de microbiologia de alimentos (Pavilhão Tecnológico) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) através da metodologia de difusão em discos.

##### **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.

#### 4.2.8.2 Atividade larvicida

Inicialmente, os ovos do *A. aegypti* foram colocados para eclodir a temperatura ambiente (31°C aproximadamente) em um recipiente retangular de alumínio ou polietileno contendo água mineral. As larvas obtidas foram alimentadas com ração de gato até atingirem o terceiro e quarto estágio, idade em que foram feitos os experimentos (Figura 22). Estes foram feitos de acordo com a metodologia proposta por SILVA (2006). Inicialmente, foi preparada uma solução-mãe de 1.000 ppm através da pesagem 50 mg do óleo para uma solução formada por 49,75 mL de água destilada e 0,25 mL de tween-80. Desta solução, foram preparadas cinco soluções nas concentrações 70, 100, 130, 150, 200 e 250 ppm. Para cada concentração foram utilizadas 10 larvas e 30 mL de cada solução nas concentrações citadas. Todos os testes foram realizados em triplicata e como controle negativo foi utilizado uma solução formada por 49,75mL de água para 0,25mL de tween-80, e como controle positivo, uma solução de temefós (*O,O,O',O'*-tetrametil *O,O'*-tiodi-*p*-fenileno bis (fosforotioato) a 100 ppm, equivalente a concentração utilizada pela fundação nacional de saúde (Funasa) para o controle larvicida do vetor.

Para quantificar a eficiência do óleo essencial como larvicida foram consideradas mortas as larvas que não reagiram ao toque ou moribundas após 24 horas do início do experimento.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 22 – Testes larvicidas do *Aedes aegypti* realizados em triplicata a temperatura ambiente segundo o método de Reed e Muench.

### 4.2.8.3 Análise estatística dos dados

A concentração letal a 50% ( $CL_{50}$ ) e o limite de confiança a 95% de probabilidade foram calculados pelo método REED e MUENCH (1938), PIZZI (1950), COLEGATE e MOLYNEUX (1993). Este método parte do princípio de que um ser vivo, que sobreviva a uma certa dose, também irá sobreviver a qualquer dose menor que esta; consequentemente, o ser vivo que morrer, em uma certa dose, também morrerá em doses maiores que esta. Então, a partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de insetos mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de interseção entre as curvas é a  $CL_{50}$ , pois nesse ponto o número de insetos vivos é igual ao número de insetos mortos.

# CAPÍTULO V

## *RESULTADOS E DISCUSSÕES*

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Rendimento do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum*

A extração produziu um óleo amarelo pálido quase incolor logo após destilado e menos denso que a água (Anexo 20). O rendimento do óleo coletado em 2 horas de destilação variou entre 1,5-2,0% (m/v) para as partes aéreas secas (Figura 23), e 0,28-1% (m/v) para as partes aéreas frescas (Anexo 21). Estes valores são semelhantes aos relatados por SILVA *et al.* (2003); Chalchat e Özcan, (2008). Inicialmente a extração do óleo essencial foi realizada no tempo de 5 horas, porém observou-se que grande parte do óleo essencial foi extraída no início da destilação, mantendo os níveis de rendimento satisfatório na primeira hora e diminuindo consideravelmente nos 60 minutos restantes. Desta forma, numa relação custo benefício, esta poderia ser realizada em apenas 90 minutos o que evitaria desperdícios e não comprometeria a quantidade e a qualidade do óleo essencial extraído.

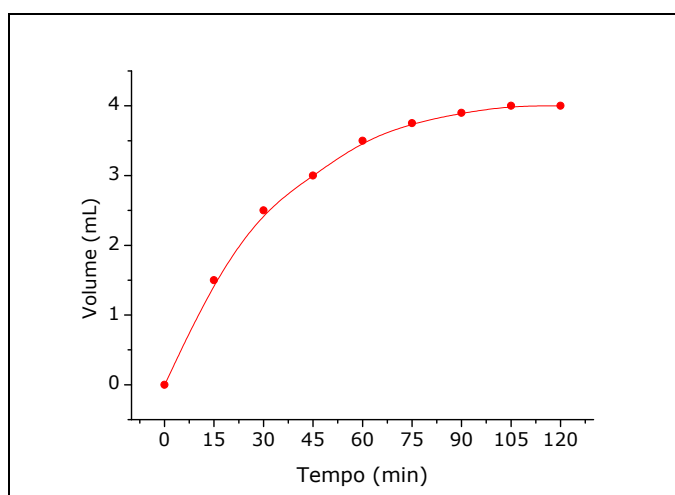


Figura 23 – Cinética de extração do óleo essencial obtido das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum* no tempo de 2 horas através de um extrator tipo Clevenger.

### 5.2 Análises físicas do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum*

Os resultados obtidos a partir das análises físicas do óleo essencial do *O. basilicum* estão indicados na Tabela 1.



**Tabela 1 – Propriedades físicas do óleo essencial do *Ocimum basilicum***

Propriedades físico-químicas	Valores	*Referência
Densidade relativa g/cm <sup>3</sup>	0,955±0,005	0,95±0,02
Índice de refração	1,4991±0,005	1,4995±0,002
Solubilidade a 60% (v/v)	1:50	-
Solubilidade a 70% (v/v)	1:12	-
Solubilidade a 80% (v/v)	1:2	-
Solubilidade a 90% (v/v)	1:1	-

\*Hussain *et al.* (2008).

### 5.3 Triagem fitoquímica

A prospecção fitoquímica revelou, além de óleos essenciais, os seguintes metabólitos: taninos, depsídeos e depsidonas, esteróides livres, flavonóides; saponinas, aglicona flavonóides, aglicona triterpenóides e esteróides, ácidos orgânicos e resinas. Estes resultados, concordam em parte com NOGUEIRA *et al.* (2007), pois os mesmos relatam em seus resultados a ausência de saponinas para esta espécie vegetal.

Não foram encontrados na literatura relatos da presença de depsídeos e depsidonas para a espécie vegetal em estudo. SILVA *et al.* (1998) relatam que estes metabólitos são comuns em líquens, mas também podem ocorrer em plantas superiores. Há relatos na literatura demonstrando que essas substâncias apresentam propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas (MACEDO *et al.* 2007).

Alguns metabólitos secundários encontrados na triagem fitoquímica são responsáveis por inúmeras atividades biológicas. Os taninos, por exemplo, apresentam principalmente propriedades adstringentes sendo usados como anti-diarréicos, antissépticos e vasoconstritores, além de apresentarem atividade antimicrobiana, antioxidante e antifúngica (BRUNETON, 1991; MARTINS *et al.* 2000; BOSCOLO *et al.* 2007; SIMÕES *et al.* 2007).

As saponinas são laxativas suaves, diuréticas e expectorantes (MARTINS *et al.* 2000), os esteroides ou fitosteróis apresentam propriedades farmacológicas promissoras.

Estudos recentes relacionam este metabólito com a redução das doenças cardíacas através da diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL. Também vem sendo avaliado seu papel como agente antineoplasmático, principalmente em câncer de estômago, cólon, próstata e mama, assim como ações imunomoduladoras ao nível celular, além de propriedades cosméticas e melhora sintomática da hiperplasia prostática benigna, entre outros (SAMPAIO, 2007).

Os óleos essenciais apresentam ação antivirótica, analgésica, bactericida, cicatrizante, expectorante; relaxante, vermífugo, antiespasmódica, cardiovascular, anestésica local; antisséptica, anti-inflamatória, inseticida e antitumoral (BRUNETON, 1991; MARTINS *et al.* 2000; KÈITA *et al.* 2001; SARTORATTO *et al.* 2004; BARRETO e VEIGA JÚNIOR, 2005).

Quanto aos flavonoides encontrados, existem publicações importantes que demonstram a importância destes metabólitos, pois atuam como antiescleróticos e anti-edematosos, antioxidantes, dilatadores das coronárias, espasmolíticos, anti-hepatotóxicos, anti-inflamatórios, entre outros (GROS *et al.* 1985; DI STASI, 1996; MARTINS *et al.* 2000; PINHEIRO *et al.* 2007).

#### 5.4 Estudo térmico

O perfil termogravimétrico apresentado nas Figuras 24 e 25 representam o comportamento térmico do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* sob atmosfera de nitrogênio (inerte) e ar, no intervalo de temperatura de 25 a 600°C. A curva TG/DTG do óleo essencial em atmosfera inerte apresentou dois eventos térmicos (Figura 24), tendo o primeiro evento ocorrido no intervalo de 28,17-189,80°C, com o máximo confirmado pela DTG em 131,87°C com perda de 5,347mg de massa, ou seja 90,05% do total da amostra sendo atribuída a volatilização da fração terpênica do óleo essencial (HAZRA, *et al.* 2002). O segundo evento no intervalo de 189,80-376,82°C, com perda de 0,578 mg de massa, o que corresponde a 9,741% do restante da amostra, indica uma possível degradação térmica da fração aromática do óleo essencial.

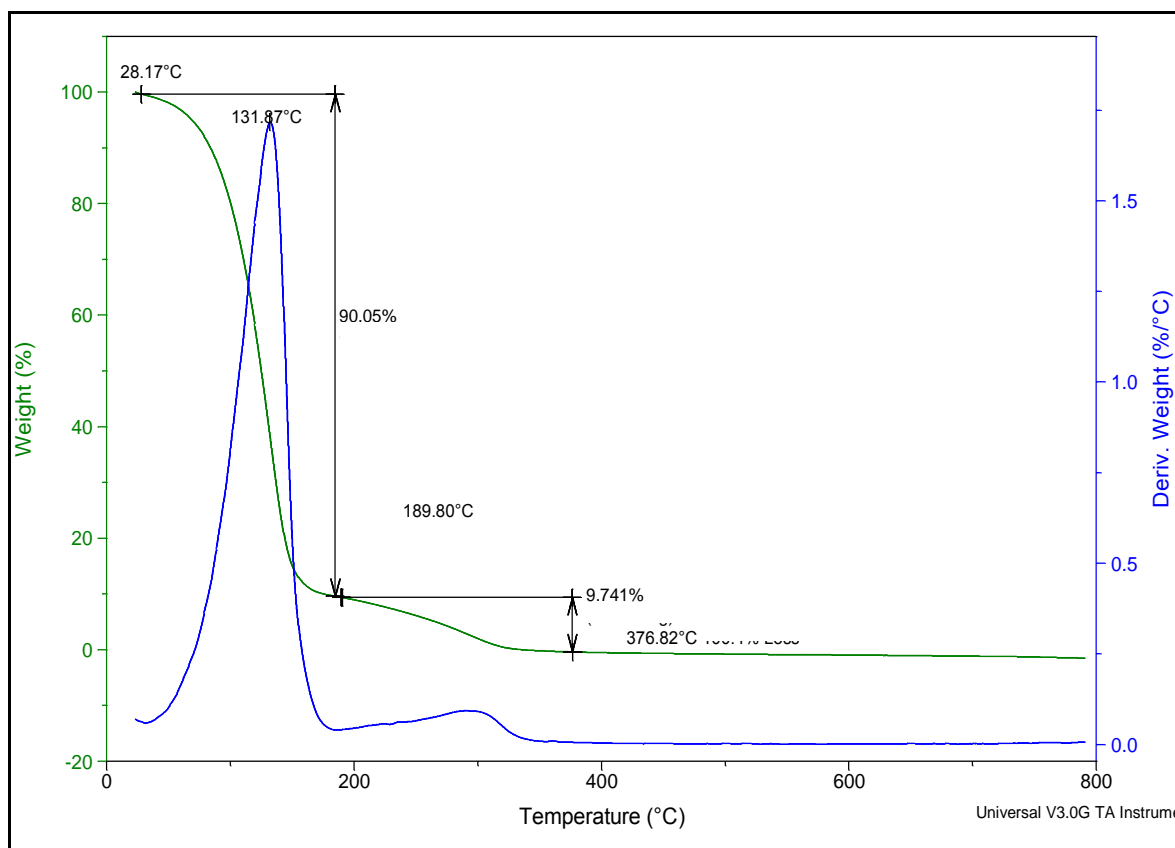


Figura 24 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*, em atmosfera de nitrogênio, com vazão de  $110 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  no intervalo de temperatura de 25 a  $600^\circ\text{C}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

Em atmosfera de ar (Figura 25), o primeiro evento térmico foi de  $34,64\text{-}201,42^\circ\text{C}$ , enquanto que o segundo evento atribuído a oxidação da fração aromática da amostra ocorreu em um intervalo de temperatura que vai de  $201,4^\circ\text{C}$  a  $344,97^\circ\text{C}$  relacionado a uma perda de massa. Observando-se as duas curvas termogravimétricas TG/DTG em atmosfera inerte e ar percebe-se que o comportamento da amostra é semelhante.

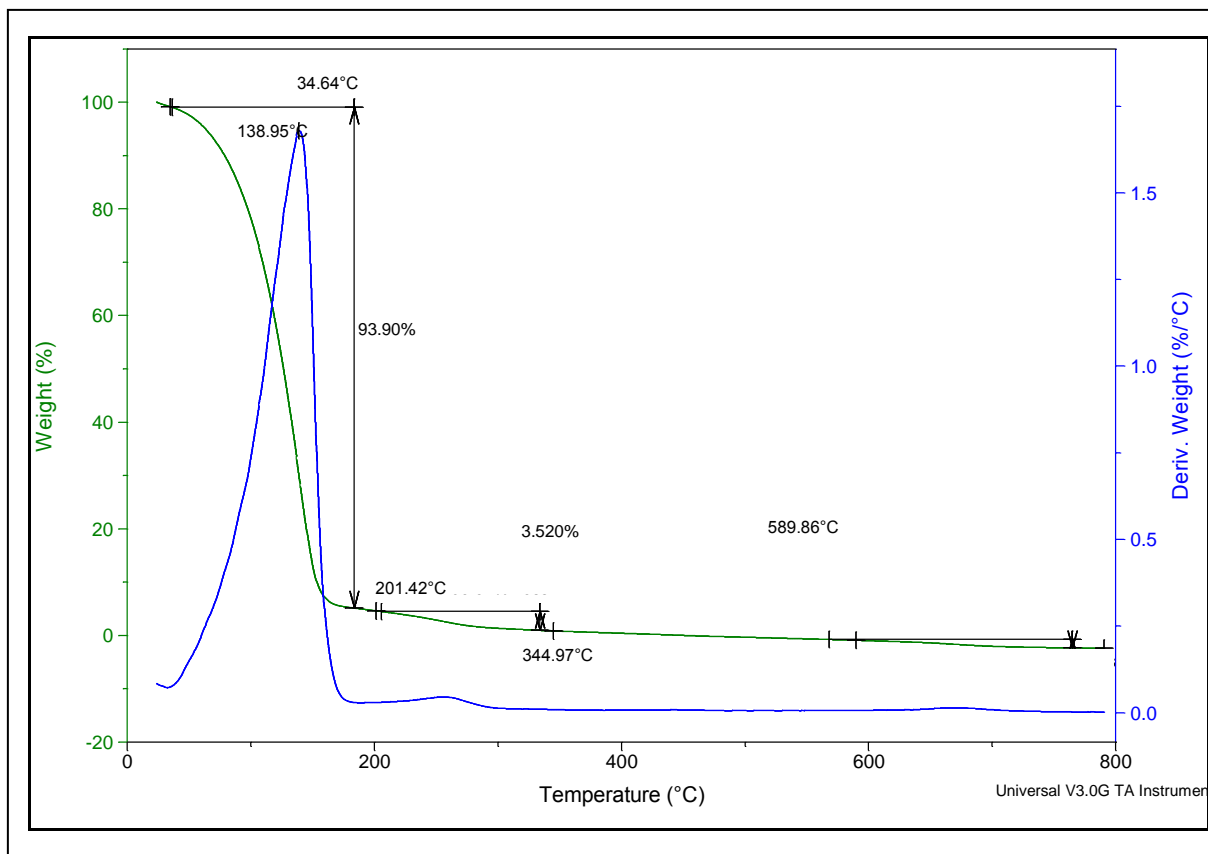


Figura 25 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*, em atmosfera de ar, com vazão de  $110 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  no intervalo de temperatura de 25 a  $600^\circ\text{C}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

A figura 26 representa o comportamento térmico do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum* em atmosfera de ar. Fazendo um paralelo em ambas às amostras, percebe-se que, tanto o óleo essencial das partes aéreas secas quanto o óleo essencial das partes aéreas frescas apresentam um perfil termogravimétrico semelhante, independente do tipo de atmosfera utilizada nos experimentos.

Em função de alguns problemas técnicos não foi possível analisar o óleo essencial das partes aéreas frescas em atmosfera de nitrogênio. No entanto, em função do comportamento térmico semelhante evidenciado nas demais amostras, pressupõe-se que o mesmo apresentaria um perfil semelhante às demais análises termogravimétricas, até porque, ocorreu pouquíssima variação na composição fitoquímica de ambas amostras do óleo essencial.

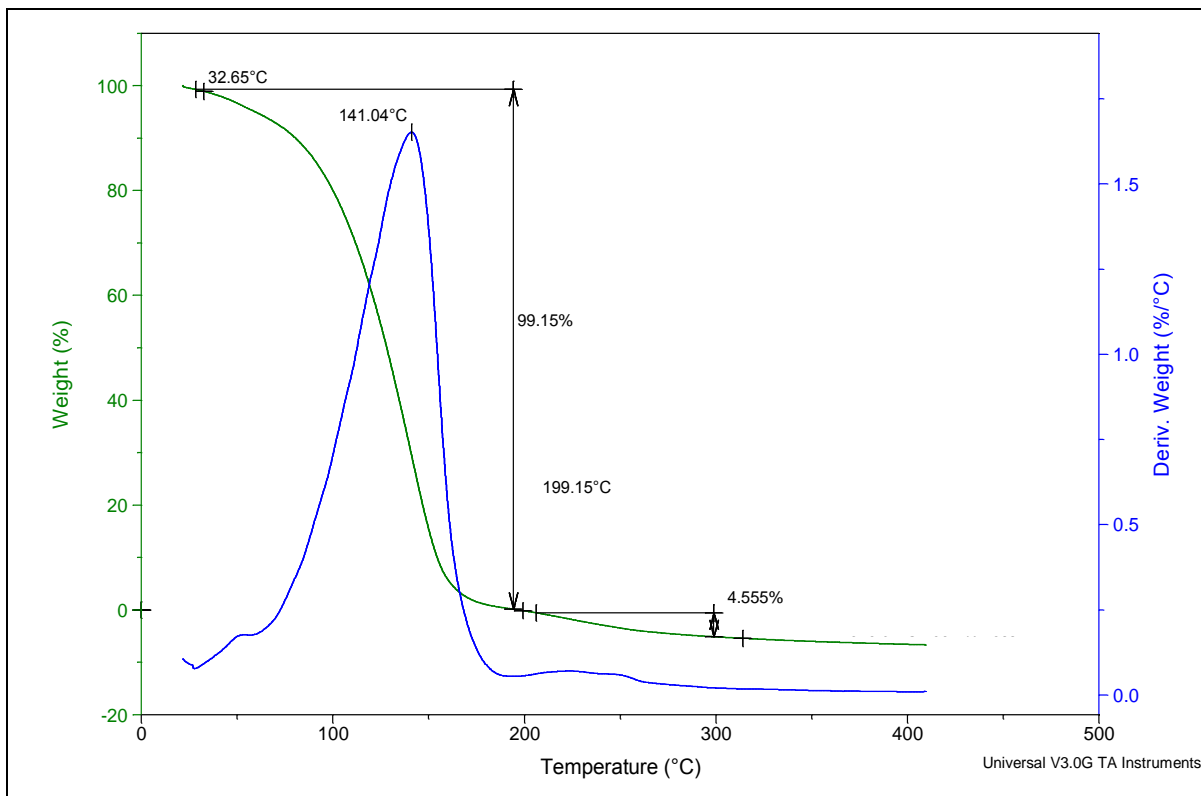


Figura 26 – Curvas TG/DTG do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum*, em atmosfera de ar, com vazão de  $110 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  no intervalo de temperatura de 25 a  $500^\circ\text{C}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

A Figura 27 mostra a curva DSC obtida em atmosfera de ar com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  para o óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*. De acordo com a Figura, esta apresentou um único evento endotérmico com temperatura de pico a  $142,90^\circ\text{C}$  e entalpia de  $388,5\text{J/g}$  atribuída a vaporização da fração terpênica do óleo essencial. Foram observados também dois picos exotérmicos, um com temperatura de pico a  $313,81^\circ\text{C}$  e entalpia de transição  $138,9\text{J/g}$ , outro com temperatura de pico  $444,55^\circ\text{C}$  e entalpia de transição  $22,62\text{J/g}$  respectivamente. Estes eventos exotérmicos podem ser atribuídos a formação de compostos por oxidação, fenômeno já observado na análise por TG.

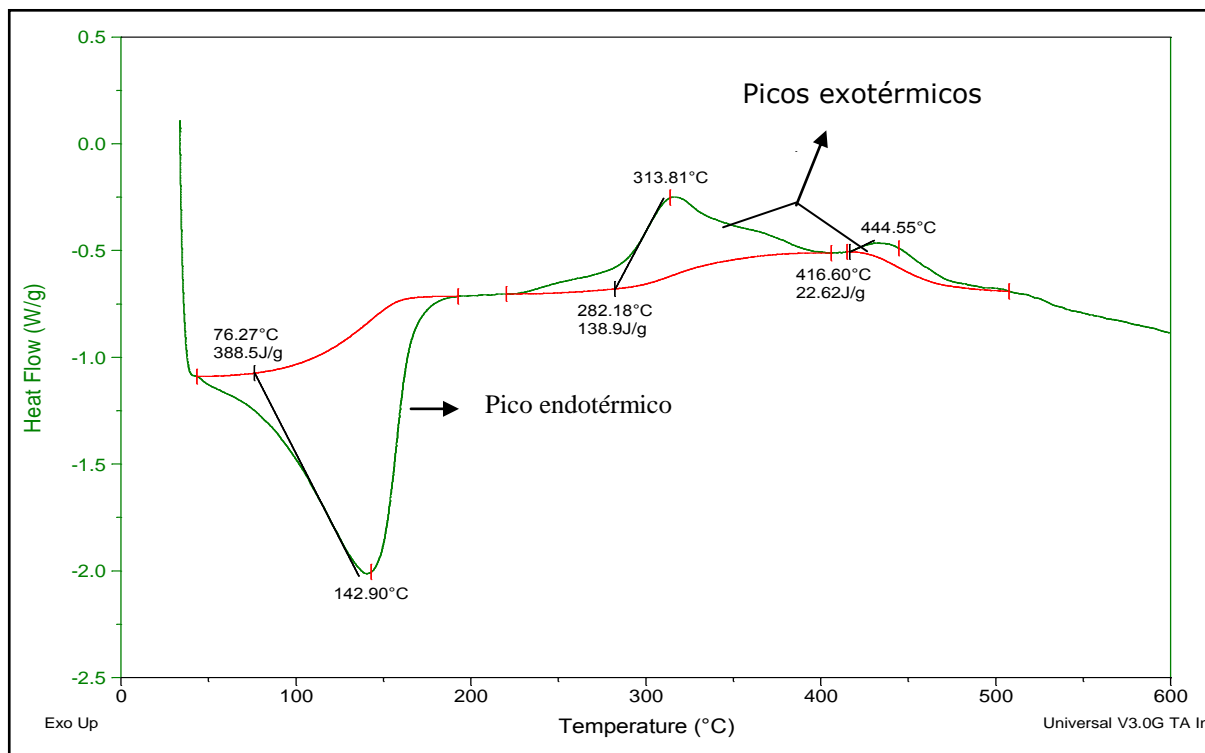


Figura 27 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* em razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a  $600^{\circ}\text{C}$  e vazão de  $110\text{ mL}.\text{min}^{-1}$

A Figura 28 expressa a curva DSC obtida em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  para o óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*. Como sugerido pela TG, em atmosfera de nitrogênio, esta apresentou dois eventos endotérmicos, tendo o primeiro temperatura de pico a  $139,53^{\circ}\text{C}$  e entalpia de transição de  $391,3\text{J/g}$ , fenômeno este, atribuído à vaporização da fração terpênic da amostra, enquanto o segundo apresentou temperatura de pico a  $418,17^{\circ}\text{C}$  e entalpia de transição de  $9,263\text{ J/g}$  atribuído a uma possível decomposição térmica da fração aromática do óleo essencial. Comparando ambos os resultados obtidos por DSC, percebe-se que o óleo essencial em atmosfera inerte apresenta um perfil térmico mais estável, com pouca tendência a formação de subprodutos.

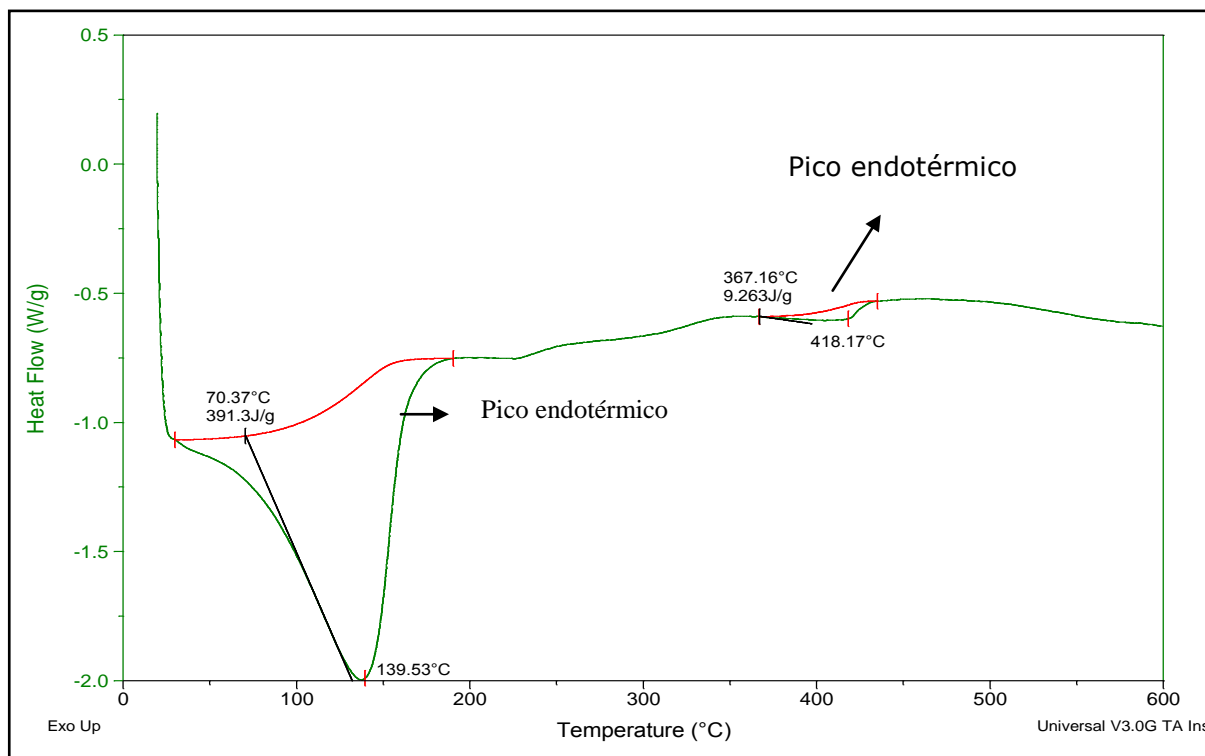


Figura 28 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , em atmosfera de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 25 a  $600^{\circ}\text{C}$  e vazão de  $110\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

A Figura 29 mostra a curva DSC obtida em atmosfera de ar com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum*. De acordo com o termograma da respectiva figura, observa-se que o gráfico apresenta três eventos térmicos, semelhante portanto a curva DSC do óleo essencial das partes aéreas secas em atmosfera de ar, desta forma, como sugerido pelas análises por TG-DTG podemos admitir que independente do óleo essencial ser obtido das partes aéreas secas ou frescas o perfil térmico é o mesmo. No entanto, nas análises por DSC, quando mudamos a atmosfera de oxidante para inerte, obtivemos termogramas diferentes.

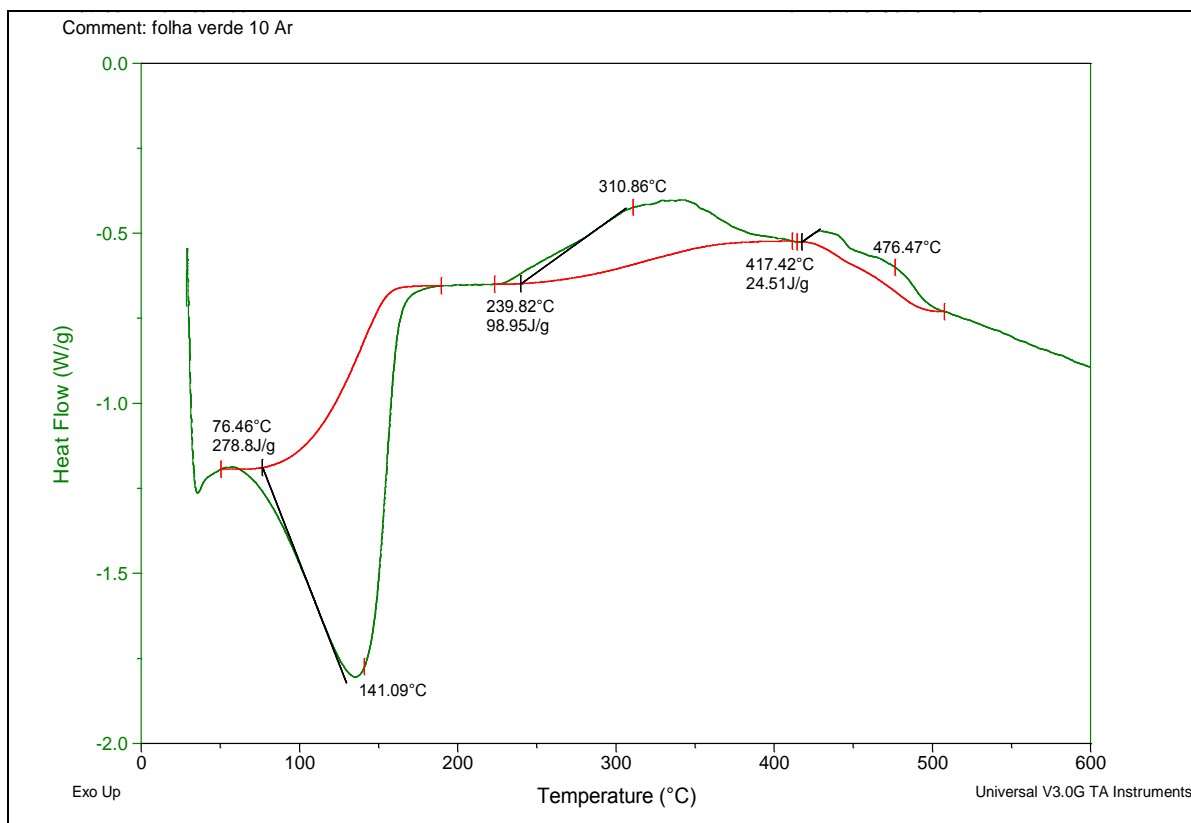


Figura 29 – Curva DSC do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum* com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , em atmosfera de ar, no intervalo de temperatura de 25 a  $600^{\circ}\text{C}$  e vazão de  $110\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

### 5.5 Análises cromatográficas

Através das análises por cromatografia em fase gasosa foram obtidos e identificados 6 picos cromatográficos, correspondentes aos principais constituintes voláteis do óleo essencial obtido das partes aéreas secas e frescas do *Ocimum basilicum*, espécie vegetal conhecida popularmente como alfavaca, Figura 30.



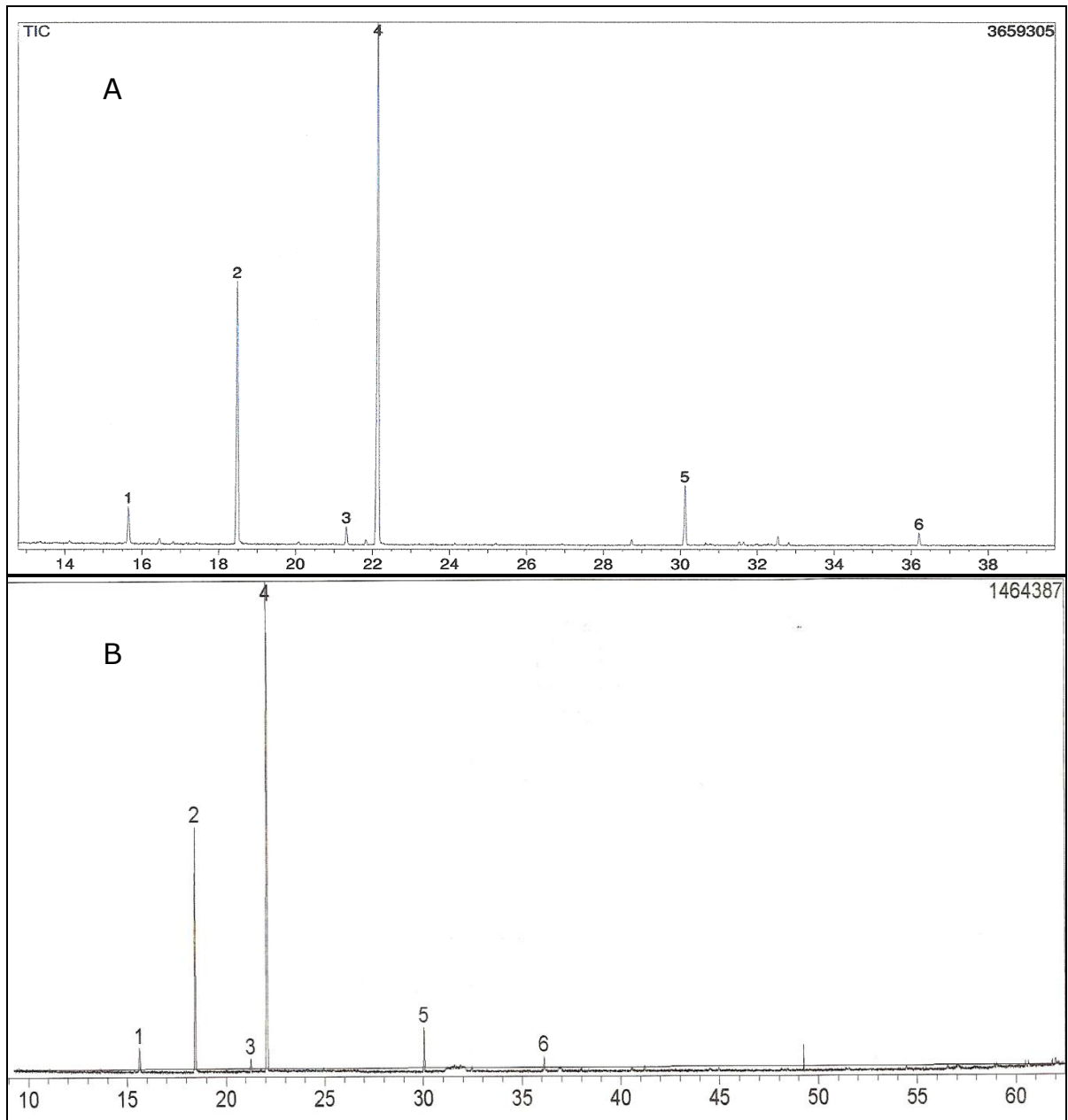


Figura 30 – Cromatogramas do óleo essencial do *O. basilicum* realizado em um equipamento Shimadzu, modelo QP-5000. A) Óleo essencial das partes aéreas secas. B) Óleo essencial das partes aéreas frescas.

Através das análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi possível identificar e quantificar, por normalização da área dos picos, os constituintes listados na Tabela 2. A proposta de identificação por espectrometria de massas para os 4 principais constituintes do óleo essencial está representada nas Figuras 31 a 38, as demais encontram-se nos Anexos 22, 23 e 24.

**Tabela 2 – Composição percentual do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum* obtida por CG-EM.**

Componentes <sup>b</sup>						
Pico	tr <sup>a</sup> (A)	tr <sup>a</sup> (B)	Partes aéreas secas (A)	Partes aéreas frescas (B)	Conc. (%)	
					A	B
1	15,66	15,61	eucaliptol <sup>c</sup>	eucaliptol <sup>c</sup>	3,48	2,61
2	18,49	18,43	linalol <sup>c</sup>	linalol <sup>c</sup>	25,88	25,70
3	21,32	21,25	4-metil-1(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol <sup>c</sup>	Metil - heptadienol <sup>c</sup>	1,43	1,40
4	22,16	22,09	Metilchavicol <sup>d,e,f</sup>	metilchavicol <sup>c</sup>	62,39	64,70
5	30,12	30,03	$\alpha$ -farneseno <sup>e,f</sup>	$\alpha$ -farneseno <sup>c</sup>	6,14	4,36
6	36,21	36,11	Cadinol <sup>d,f</sup>	cadinol <sup>c</sup>	0,67	1,24

<sup>a</sup>tempo de retenção em minutos

<sup>b</sup>componentes listados em ordem de eluição em uma coluna HP-5MS.

<sup>c</sup>AMDIS; <sup>d</sup>WILEY139 <sup>e</sup>NIST21; <sup>f</sup>NIST107.

De acordo com a técnica adotada foi possível identificar 99,99% da composição total do óleo essencial em ambas as amostras. A fração aromática está representada por um único componente, o metilchavicol (estragol) que é o componente majoritário, enquanto o eucaliptol, linalol e 4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol foram os monoterpênicos detectados na amostra seca. Para o óleo essencial da amostra fresca o Metil-heptadienol foi a única alteração registrada na composição fitoquímica do óleo essencial. A fração sesquiterpênica está representada nas duas amostras pelos compostos  $\alpha$ -farneseno e cadinol.

Como relatado no parágrafo anterior houve pouca variação na composição fitoquímica do óleo essencial. Assim, podemos afirmar com base nos dados da Tabela 2, que houve apenas uma alteração correspondente ao metabólito representado pelo pico 3 do cromatograma da Figura 30. Em ambas as amostras do óleo essencial o composto em questão pertence a função álcool. Porém, no óleo essencial das partes aéreas secas, o composto é um álcool alifático de cadeia fechada enquanto no óleo essencial das partes aéreas frescas o composto é um álcool alifático de cadeia aberta.

Quanto à concentração de cada substância, como mostrado na Tabela 2, observou-se que ocorreram variações nas duas amostras do óleo essencial, pois no processo de secagem a concentração do metilchavicol diminuiu enquanto o linalol, eucaliptol e  $\alpha$ -farneseno aumentaram; esse fato também foi relatado por GRAYER *et al.* (1996) e KLIMÁNKOVÁ *et al.* (2008). Desta forma, esta informação poderá ser importante pois, dependendo do fim a que se destina o óleo essencial, pode-se optar pela destilação das partes aéreas frescas ou secas. Porém, deve-se chamar a atenção para o rendimento, pois, de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, é mais viável trabalhar com a espécie vegetal seca, pois o rendimento é bem superior ao óleo obtido das partes aéreas frescas.

Como foi demonstrado pelas análises por CG-EM, esses resultados são semelhantes aos relatados por GRAYER *et al.* (1996); PASCUAL-VILLALOBOS, BALLESTA-ACOSTA (2003); TELCI *et al.* (2006); SILVA, *et al.* (2007). Corroborando com este fato a literatura relata que o linalol, metilchavicol, eugenol, metilcinamato, metileugenol, citral e bergamoteno representam os componentes voláteis dominantes em todos os trabalhos publicados sobre o *Ocimum basilicum* (TELCI *et al.* 2006; SOARES *et al.* 2007; KLIMÁNKOVÁ *et al.* 2008). Desta forma, a variedade aqui estudada do *O. basilicum* pode ser classificada como pertencente ao quimiotipo metilchavicol – linalol, semelhante a variedade que ocorre no Ceará (SILVA, *et al.* 2007). Estes autores relatam que, nesta variedade, os dois principais constituintes podem variar em função da técnica de extração utilizada, pois segundo os mesmos, através da extração por arraste a vapor, microondas e CO<sub>2</sub> pressurizado o metilchavicol é o constituinte majoritário enquanto que pela extração por solvente o linalol é o componente dominante.

Como foi demonstrado pelas análises cromatográficas, a variedade aqui estudada apresentou composição fitoquímica semelhante ao quimiotipo europeu (linalol e metilchavicol), de alto valor comercial, o que poderá converter esta espécie vegetal numa promissora fonte de matéria- prima para diversas indústrias, além de seu uso clássico na indústria de cosméticos e de alimentos, o que poderá transformar esta espécie vegetal numa fonte de renda alternativa, através do seu cultivo, aos agricultores do nordeste brasileiro.

As Figuras 31 e 32 apresentam os espectros de massas gerados a partir do pico 1 do cromatograma mostrado na Figura 30. Este composto foi identificado como sendo o eucaliptol, através do programa AMDIS, software utilizado quando não ocorre um consenso na identificação de um composto através das bibliotecas disponíveis no equipamento.

Entre todos os fragmentos mostrados no espectro de massas do eucaliptol merecem destaque os seguintes: fragmento de massas  $m/z=154$  [ $M^{*+}$ ] correspondente ao íon

molecular, o que indica a fórmula molecular do composto ( $C_{10}H_{18}O$ ); fragmento de massa  $m/z=139$  [ $M^+-15$ ], correspondente a perda de uma metila ( $CH_3$ ), pico com massa  $m/z=125$  [ $M^+-29$ ], relacionado com a perda de uma etila ( $C_2H_5$ ), os demais picos em destaque são:  $m/z=43$ , corresponde ao pico do íon  $CH_3CO^+$ , que é o pico base, fragmento muito estável, característico de estabilidade por ressonância;  $m/z=41$ , este pico é característico de uma clivagem que resulta na formação do íon alila ( $C_3H_5^+$ ), (CAMPOS, 1977; SILVERSTEIN, 1994; ADAMS, 1995; HARRIS, 2005).

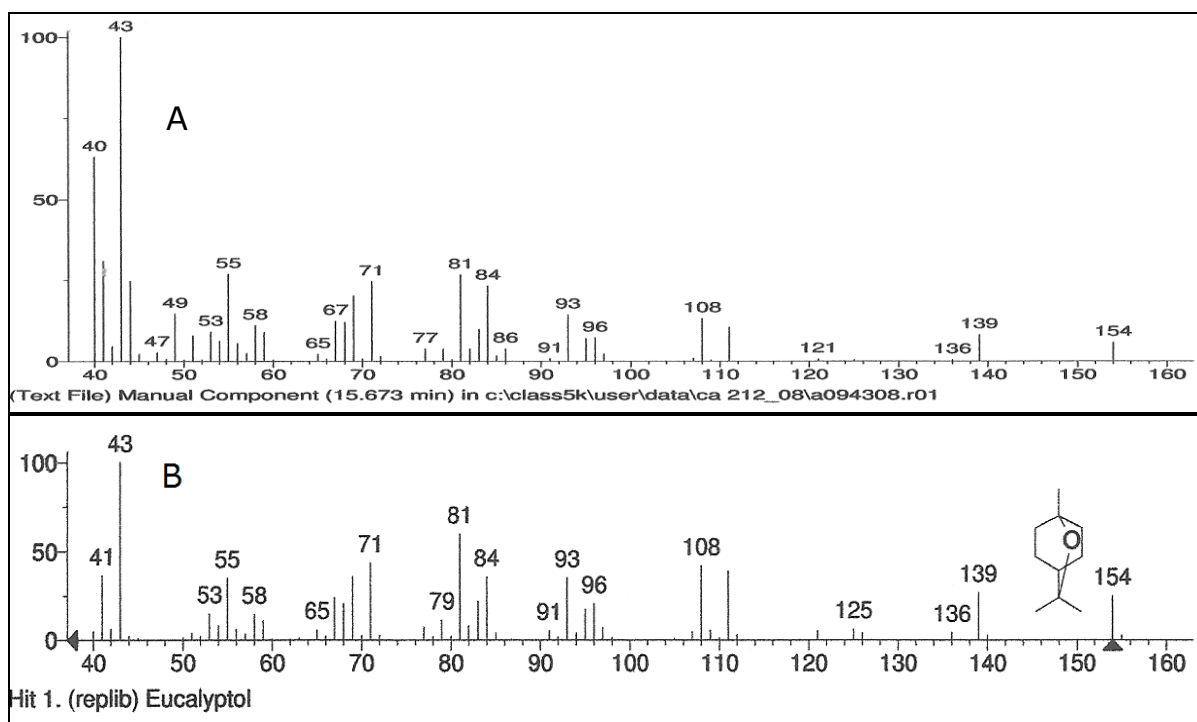


Figura 31 – Espectro de massas do pico 1 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS.

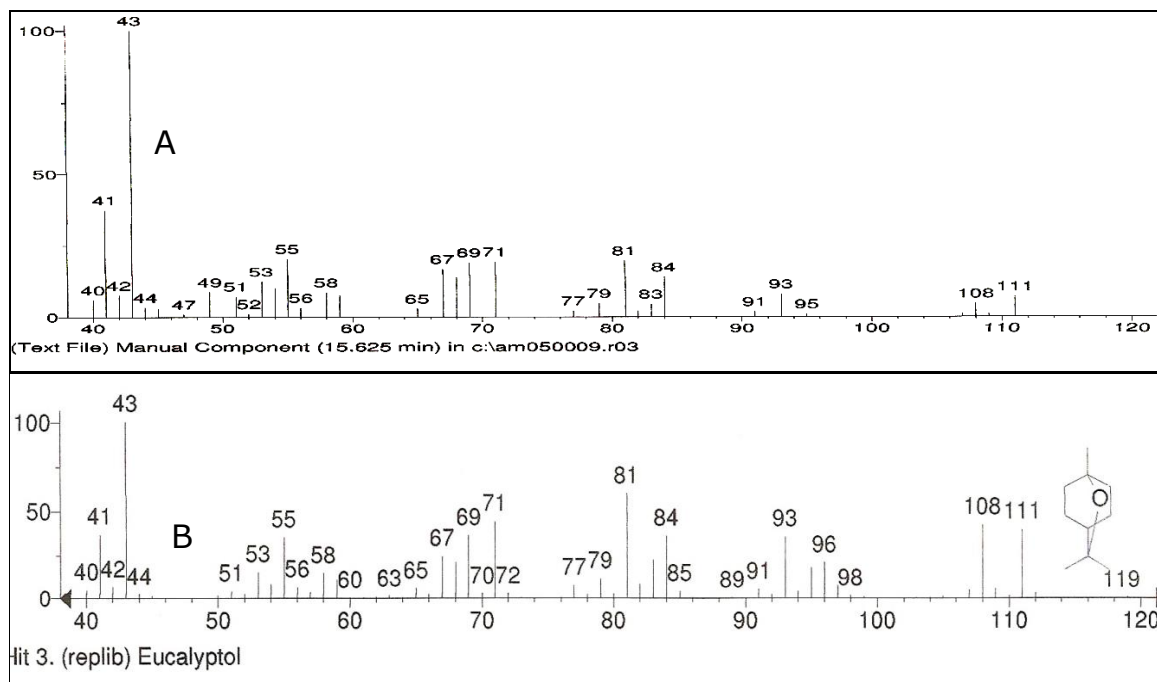


Figura 32 – Espectro de massas do pico 1 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS.

Nas Figuras 33 e 34, que correspondem aos espectros de massas do óleo essencial da amostra seca e fresca respectivamente, o linalol foi caracterizado pela presença dos fragmentos das seguintes relações massa carga:  $m/z=136 [M^{*+}-18]$  corresponde a perda de água ( $H_2O$ ), enquanto o pico  $m/z=121 [M^{*+}-33]$  indica a perda de uma metila e água ( $H_2O$ ). Nos álcoois de cadeia longa  $C>6$ , a fragmentação molecular se assemelha aos hidrocarbonetos. O espectro na verdade, assemelha-se, em muito ao alceno de cadeia correspondente. Assim, os picos de massas  $m/z = 107$  e  $m/z = 93$  seguem esta tendência, pois se diferenciam pela perda de unidades metilênicas. O pico de massa de relação massa carga  $m/z = 71$  está relacionado com a formação do íon positivo de estrutura  $R_2C=O^{*+}H$ . No linalol, álcool terciário, ocorre a clivagem homolítica da ligação C-C vizinha ao carbono alfa do grupo funcional de forma a estabilizar esse íon por ressonância. O pico de relação massa carga  $m/z=41$ , indica o pico base, que representa uma clivagem alílica, característico do cátion alila. (CAMPOS, 1977; SILVERSTEIN, 1994; MCMURRY, 2005;).

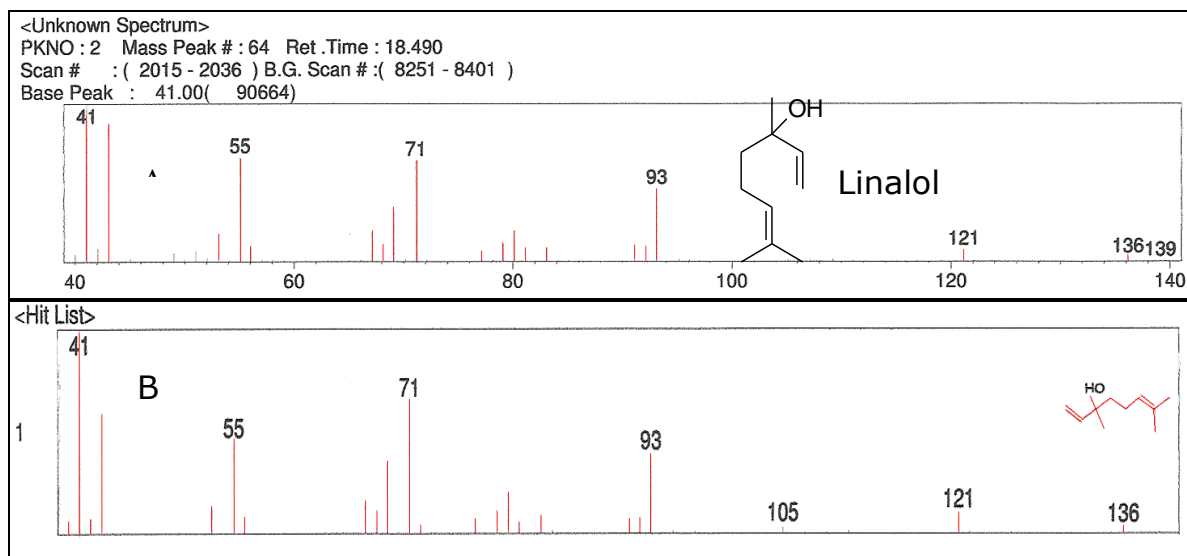


Figura 33 – Espectro de massas do pico 2 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca NIST21.

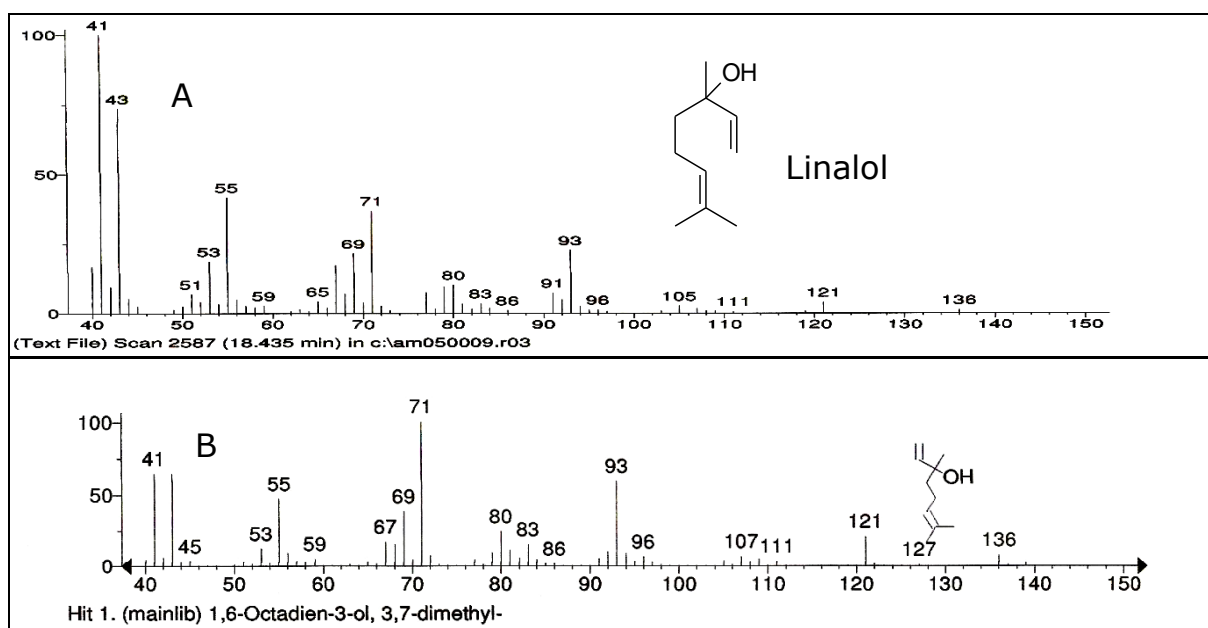


Figura 34 – Espectro de massas do pico 2 e sua respectiva proposta de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) proposta de identificação segundo o programa AMDIS.

As Figuras 35 e 36 correspondem aos espectros de massas da substância identificada como sendo o metilchavicol, componente majoritário do óleo essencial do *O*.

*basilicum*, este composto foi identificado através dos seguintes fragmentos de massas, onde os principais picos com suas relações massa carga foram:  $m/z=148$  representa o pico base e ao mesmo tempo o íon molecular, que confirma a fórmula molecular do composto como  $C_{10}H_{12}O$ . O pico de massa  $m/z=133$  corresponde à perda de uma metila [ $M^{\bullet+}-15$ ], o pico de relação massa carga  $m/z=117$  se refere ao fragmento  $C_9H_9^+$  gerado a partir de um rearranjo do íon molecular, com conseqüente perda de uma molécula neutra ( $H_2CO$ ) e de um radical  $\bullet H$ , o pico de massa  $m/z=105$  se refere ao fragmento  $C_8H_9^+$  gerado pela perda de (CO), enquanto que o pico de  $m/z=91$  corresponde ao tropílio, íon clássico de todo sistema aromático. O fragmento  $m/z=77$  está relacionado com o cátion aromático  $C_6H_5^+$  gerado pela perda de uma molécula neutra ( $H_2CO$ ) e da cadeia lateral do composto aromático (CAMPOS, 1977; SILVERSTEIN, 1994; ADAMS, 1995).

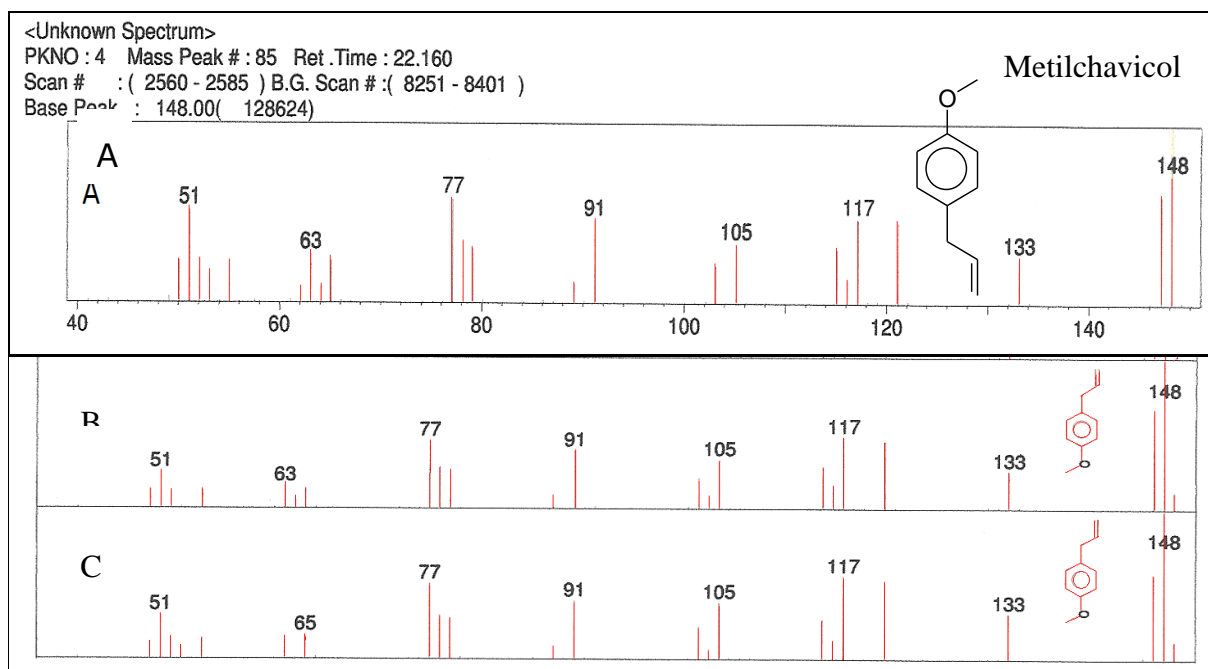


Figura 35 – Espectro de massas do pico 4 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca wiley139. C) Biblioteca NIST107.

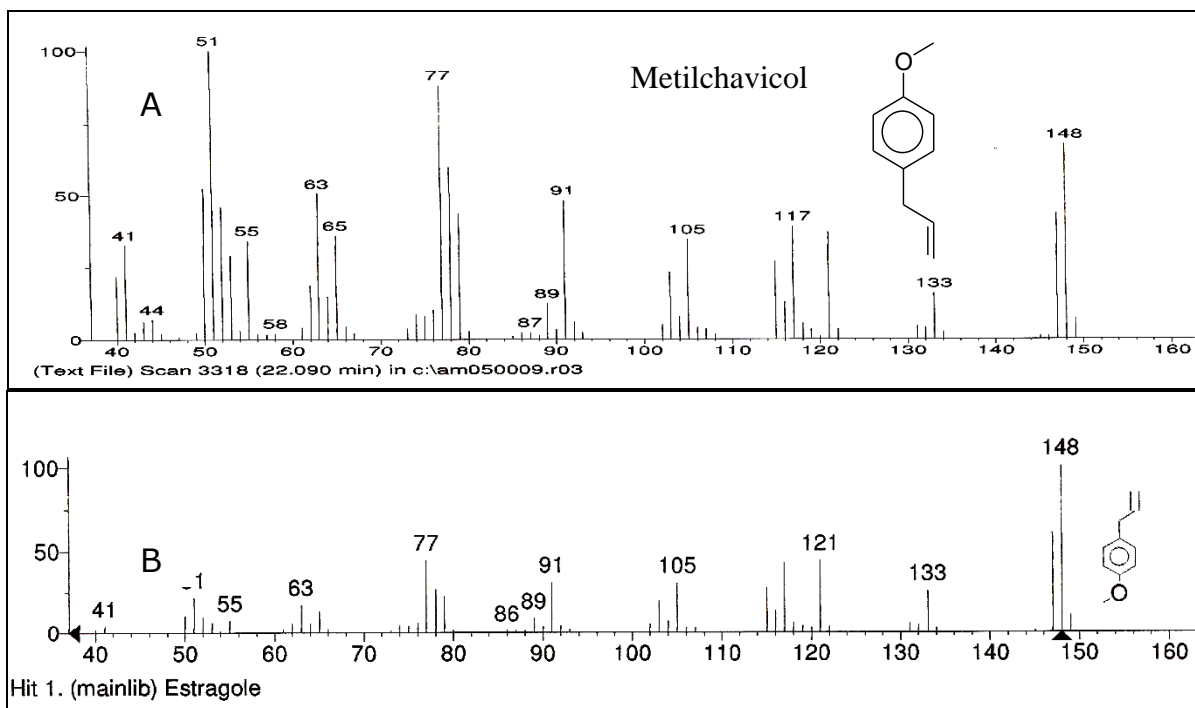


Figura 36 – Espectro de massas do pico 4 e sua respectiva propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação segundo o programa AMDIS.

As Figuras 37 e 38 representam a fragmentação através da espectrometria de massas, do composto identificado como  $\alpha$ -farneseno. Os principais picos de fragmentação para esta substância correspondem às seguintes relações massa/carga:  $m/z=204$  [ $M^{\bullet+}$ ] representa o íon molecular, o que confirma a fórmula molecular do composto como sendo  $C_{15}H_{24}$ . O fragmento de massa 189 é característico da perda do radical metila a partir do íon molecular [ $M^{\bullet+}-15$ ]. Sendo o  $\alpha$ -farneseno um polialceno, o padrão de fragmentação deste composto é caracterizado por aglomerados de picos a intervalos de 14 unidades. Nestes aglomerados os picos  $C_nH_{2n-1}$  e  $C_nH_{2n}$  são mais intensos do que os picos  $C_nH_{2n+1}$ .

Nos espectros de massas do  $\alpha$ -farneseno, como mostrado pelas Figuras 37 e 38, os picos em  $m/z$  41, 55 e 69 correspondem à fórmula  $C_nH_{2n-1}$ , onde o pico em  $m/z$  41 corresponde ao íon alila, pode-se observar também que os mesmos diferem apenas por uma unidade metilênica, enquanto os picos 119 e 107 seguem a mesma tendência. O pico em  $m/z$  93 pode ser entendido como sendo produzido por uma estrutura de fórmula  $C_7H_9^+$  formada por isomerização seguida por uma clivagem alílica (CAMPOS, 1977; SILVERSTEIN, 1994).



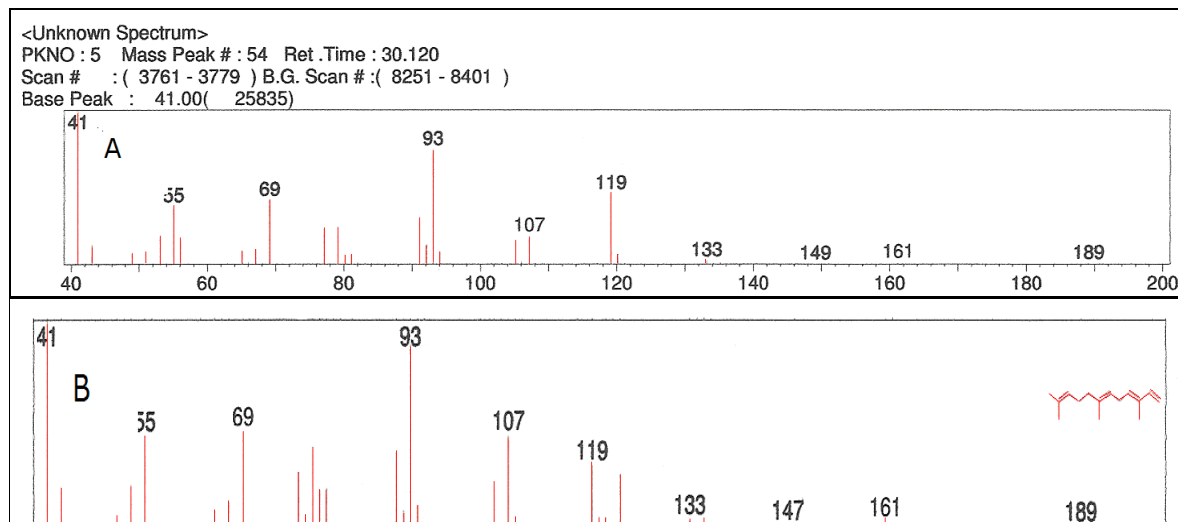


Figura 37 – Espectro de massas do pico 5 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas secas. B) Proposta de identificação segundo a biblioteca NIST107.

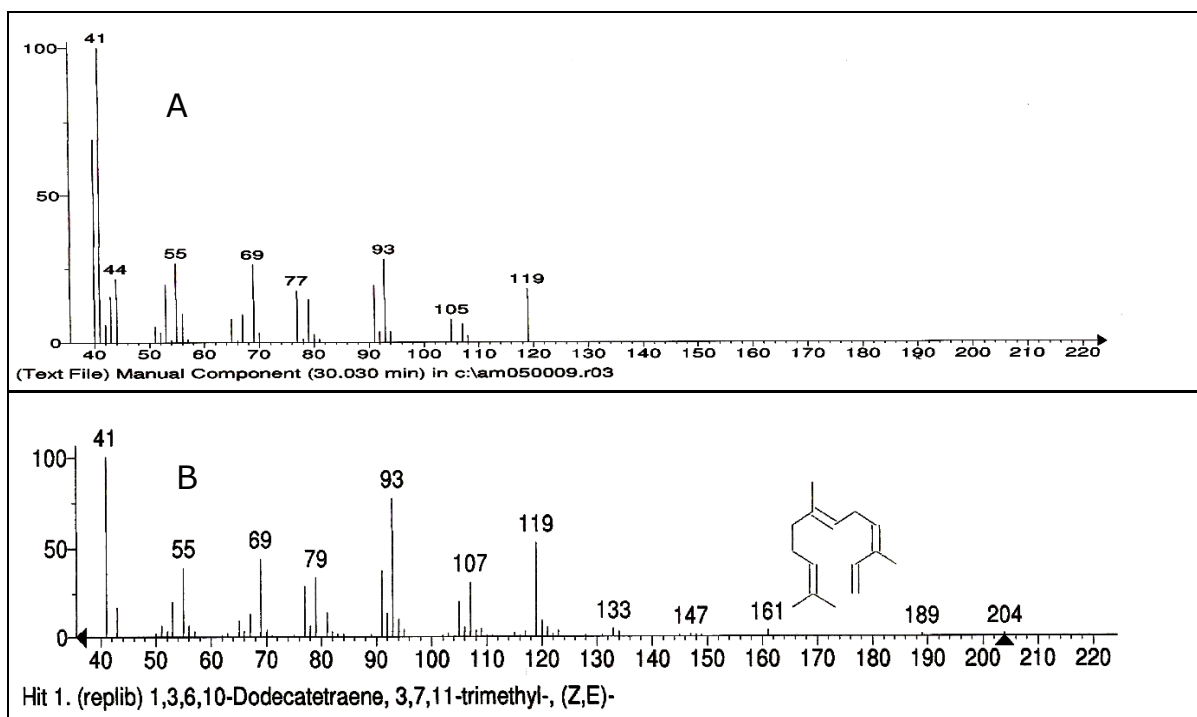


Figura 38 – Espectro de massas do pico 5 e suas respectivas propostas de identificação. A) Espectro de massas do óleo essencial das partes aéreas frescas. B) Proposta de identificação, segundo o programa AMDIS.

### 5.6 Atividade antioxidante do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

As Tabelas 3 e 4 apresentam os dados médios da porcentagem de atividade antioxidante para diferentes concentrações do óleo essencial. Os valores de  $CI_{50}$ , que representam a concentração do óleo na qual a atividade antioxidante (antiradical) de 50% é observada, também estão expostos nas respectivas tabelas.

**Tabela 3 – Atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum* pelo método do radical DPPH.**

Concentração do óleo essencial em (g/mL)								
*T	3,82. $10^{-3}$	5,73. $10^{-3}$	7,64. $10^{-3}$	9,55. $10^{-3}$	1,14. $10^{-2}$	1,33. $10^{-2}$	1,52. $10^{-2}$	$CI_{50}$ g/mL
0-30	19,28	23,29	23,71	29,51	29,82	32,71	32,71	$3,73 \cdot 10^{-2}$
30-60	22,28	27,17	28,02	36,36	38,18	42,11	43,28	$1,93 \cdot 10^{-2}$
60-90	24,30	30,07	32,17	41,96	44,61	49,64	51,15	$1,39 \cdot 10^{-2}$
90-120	26,38	33,53	36,72	47,76	50,64	56,34	58,66	$1,12 \cdot 10^{-2}$
120-150	28,18	36,48	40,25	52,93	55,90	62,23	64,46	$9,88 \cdot 10^{-3}$

\*Tempo em minutos

**Tabela 4 – Atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum* pelo método do radical DPPH.**

Concentração do óleo essencial em (g/mL)									
* T	9,46. $10^{-4}$	1,91. $10^{-3}$	2,87. $10^{-3}$	3,82. $10^{-3}$	4,78. $10^{-3}$	5,73. $10^{-3}$	6,69. $10^{-3}$	7,64. $10^{-3}$	$CI_{50}$ g/mL
0-30	21,69	26,06	30,06	31,08	31,88	32,19	32,37	32,95	$8,29 \cdot 10^{-1}$
30-60	24,68	30,80	34,24	34,27	38,62	40,00	41,19	41,79	$5,85 \cdot 10^{-3}$
60-90	35,77	35,15	39,78	39,55	44,79	46,79	54,43	59,65	$5,06 \cdot 10^{-3}$
90-120	29,53	42,28	47,67	48,25	55,79	58,39	61,67	63,33	$3,36 \cdot 10^{-3}$
120-150	29,78	45,64	51,80	52,60	62,09	65,26	69,53	72,79	$2,54 \cdot 10^{-3}$
150-180	31,85	51,75	58,12	59,79	71,09	74,88	80,06	83,94	$1,79 \cdot 10^{-3}$
180-210	34,52	60,26	66,30	68,28	80,18	84,41	89,51	93,52	$1,12 \cdot 10^{-3}$
210-240	36,43	65,59	73,73	75,50	88,87	92,73	97,25	99,90	$8,05 \cdot 10^{-4}$

\*Tempo em minutos

Comparando ambos os resultados obtidos, percebe-se que a capacidade de sequestrar radicais livres do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* foi mais eficiente, pois no tempo de 150 minutos se obteve para o óleo essencial das partes aéreas frescas uma  $CI_{50}$  de  $9,88 \times 10^{-3}$  g/mL, Tabela 3. Enquanto no óleo obtido das partes aéreas secas para o mesmo intervalo de tempo, obteve-se uma  $CI_{50}$  de  $2,54 \times 10^{-3}$  g/mL, aproximadamente 4 vezes mais eficiente, tabela 4.

A Figura 39 representa o desempenho antioxidante de ambos os óleos essenciais no tempo de 150 minutos. Observa-se claramente no gráfico que existe uma grande diferença entre os dois, pois com base na concentração de  $3,82 \times 10^{-3}$  g/mL, o óleo essencial da planta seca exerce 52,6% de atividade antioxidante, enquanto que o óleo essencial da planta fresca exerce apenas 28,18%. Uma forma de explicar essa diferença seria a existência de substâncias presentes no óleo essencial das partes aéreas frescas que atuam de forma antagônica com a(s) substância(s) responsável ou responsáveis pela atividade antioxidante do óleo essencial, pois através do processo de secagem ocorreram variações na relação fenilpropanos/terpenos (GRAYER *et al.* 1996; CARVALHO FILHO, 2006; KLIMÁNKOVÁ *et al.* 2008).

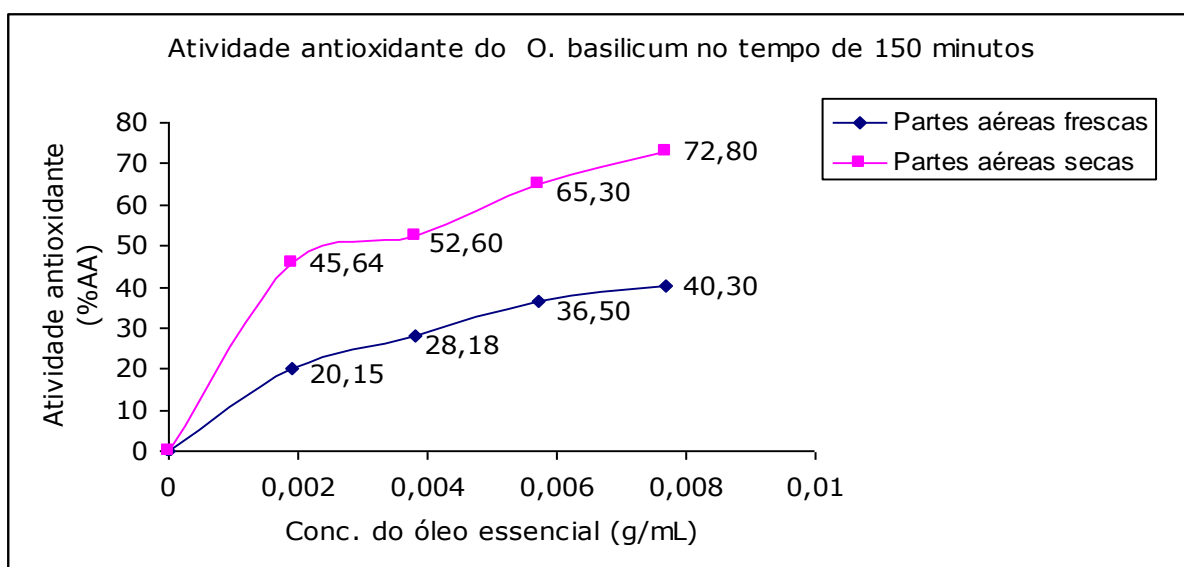


Figura 39 – Comparação da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas do *Ocimum basilicum*, no tempo de 150 minutos, através do método do radical DPPH.

No óleo essencial da espécie seca a atividade antioxidante foi extrapolada até o tempo de 240 minutos no intuito de acompanhar seu desempenho antioxidante em tempos maiores. A Figura 40 representa o comportamento do óleo essencial nos diferentes tempos. De acordo com os dados do gráfico percebe-se que os tempos de 30 e 60 minutos não são

suficientes para que o óleo exerça uma boa atividade antioxidante. Desta forma, faz-se necessário um tempo mínimo de 90 minutos para que o substrato apresente um desempenho antioxidante razoável. Percebe-se também que, a partir de 120 minutos, todas as concentrações testadas apresentam um comportamento semelhante de forma que no tempo de 150 minutos obteve-se uma CI de  $2,54 \times 10^{-3}$  g/mL, o que evidencia que o óleo das partes aéreas secas apresenta um potencial antioxidante melhor. Contudo, no tempo máximo de 240 minutos obteve-se uma  $CI_{50}$  de  $8,05 \times 10^{-4}$  g/mL o que demonstra que quanto maior o tempo melhor a resposta antioxidante do óleo essencial.

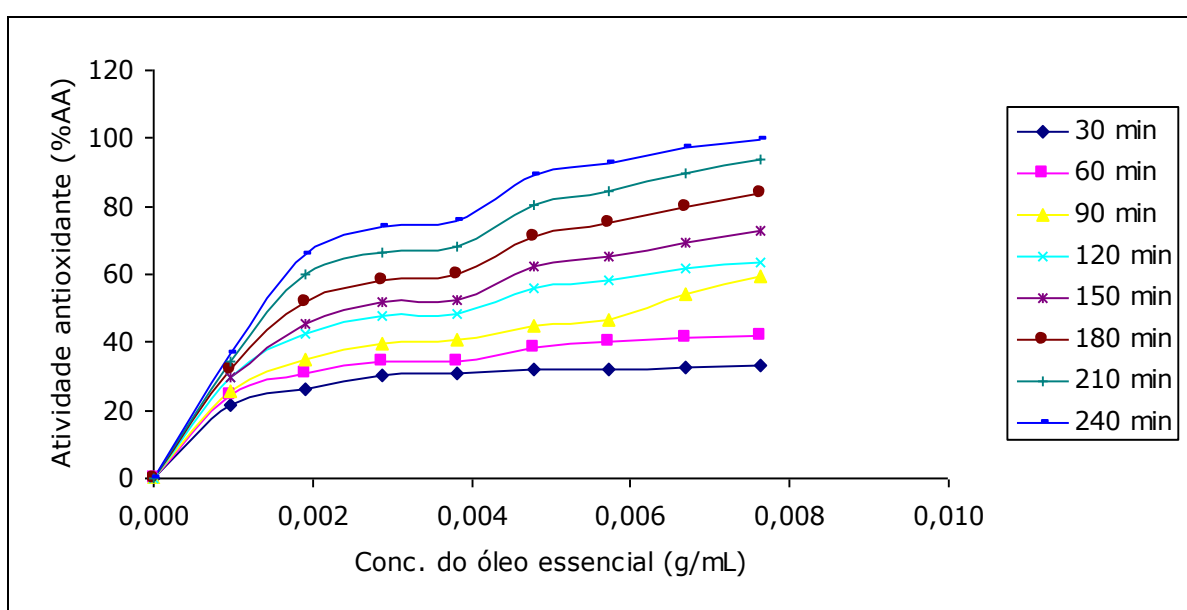


Figura 40 – Desempenho da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*, através do método do radical DPPH.

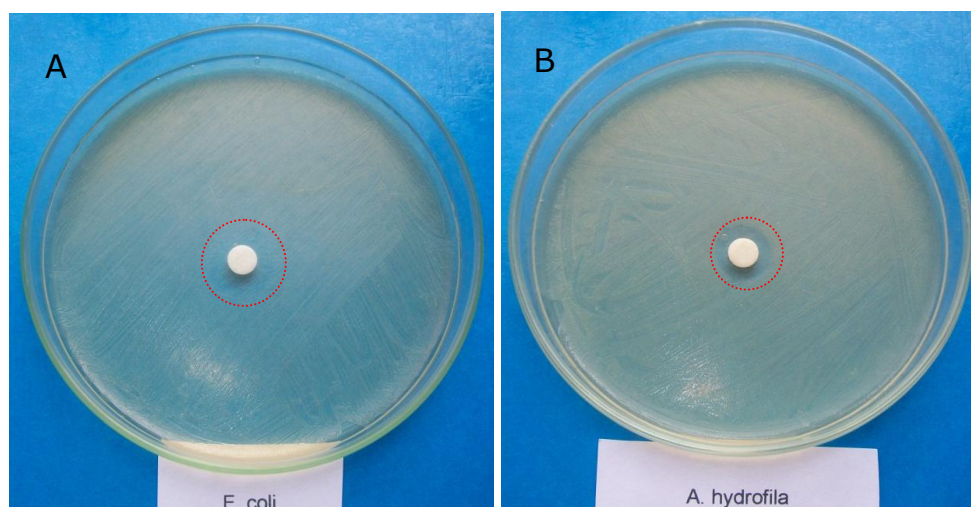
Os resultados obtidos nesse estudo são um tanto diferentes dos resultados encontrados por HUSSAIN *et al.* (2008) que relataram uma  $CI_{50}$  em torno de  $6 \mu\text{g/mL}$  para o *O. basilicum* quimiotipo linalol, o que pode ser justificado pela diferença dos principais constituintes das espécies estudadas. A variedade relatada por HUSSAIN *et al.* (2008), apresenta como constituintes majoritários o linalol (60,6%) e cadinol (12,4%), ambos compostos hidroxilados, enquanto a variedade estudada por nós apresentou como principais constituintes o metilchavicol (64,70%) e linalol (25,70%) para a amostra fresca, (62,39%) e (25,88%) para a amostra seca, destes dois metabólitos apenas o linalol apresenta o grupo funcional hidroxila, ou seja; o constituinte em menor quantidade. A literatura relata que a presença deste grupo funcional (Hidroxila) é fundamental para que uma determinada

substância apresente uma boa atividade antioxidante (SCOTTI *et al.* 2007; CARPES *et al.* 2008). Sendo assim, é compreensível entender, por que o quimiotipo aqui estudado apresentou menor atividade antioxidante. Porém, o valor encontrado está de acordo com o valor relatado por POLITEO *et al.* (2007) que descreveram uma  $CI_{50}$  de 1,378g/L para o quimiotipo linalol (28,6%) metilchavicol (21,7%).

Em nossa pesquisa foi verificado, conforme demonstrado pelas análises por CG-EM, que a espécie pertence ao quimiotipo metilchavicol-linalol, o mesmo quimiotipo relatado por POLITEO *et al.* (2007), porém na variedade aqui em estudo o metilchavicol está numa concentração três vezes maior, o que evidencia um forte indício de que a atividade antioxidante relatada aqui deve-se somente a ação do linalol e que o componente majoritário (metilchavicol) atua de forma antagônica, pois na amostra fresca onde este metabólito está em maior concentração a atividade antioxidante do óleo essencial é acentuadamente menor.

### 5.7 Atividade antibacteriana do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

Os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial do *O. basilicum* frente as sete bactérias patogênicas estão na Tabela 5. O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana frente a todos os microrganismos testados. Os resultados obtidos através do método da difusão em discos indicaram que a *E. coli* e *A. hydrofila* foram os microrganismos mais sensíveis (Figura 41). A menor atividade foi observada frente a cepa *L. monocytogenes*.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Fonte: O próprio autor, (2009)

Figura 41 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do *Ocimum basilicum*. A) Halo de inibição do óleo essencial das partes aéreas secas frente a *E. coli*.

B) Halo de inibição do óleo essencial das partes aéreas secas frente a *A. hydrofila*.

**Tabela 5 – Atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas do *O. basilicum* pelo método da difusão em discos.**

Microrganismos	Halos de inibição (mm)					
	Óleo essencial		Antibióticos (controle positivo)			
	OEPAF	OEPAS	Pen10µg	Amp10µg	Van30µg	Tet30µg
<i>E. coli</i>	13,0±0,83	17,8±0,45	-	15,6±0,57	-	15,3±0,53
<i>Staphy. aureus</i>	13,0±0,79	13,9±0,22	24,0±1,0	24,0±1,0	18,0±1,0	15,3±0,53
<i>S. marcescens</i>	11,8±0,57	11,8±0,27	*18,0±1,0	19,0±1,0	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	11,4±0,42	11,4±0,55	-	*14,0±1	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	12,6±0,65	15,0±1,0	*20,0±0,0	*16,0±0,0	-	-
<i>A. hydrofila</i>	12,4±0,65	15,9±1,52	*15,0±0,0	*18,3±0,57	*15±0,0	-
<i>B. cereus</i>	12,0±0,79	13,6±0,55	*16,0±1,0	9,0±1,0	-	*18,0±0,0

OEPAF: Óleo essencial das partes aéreas frescas; OEPAS: Óleo essencial das partes aéreas secas; (-) não formou halo de inibição; \* Ação bacteriostática. Pen: penicilina; Amp: ampicilina; Van: vancomicina; Tet: tetraciclina.

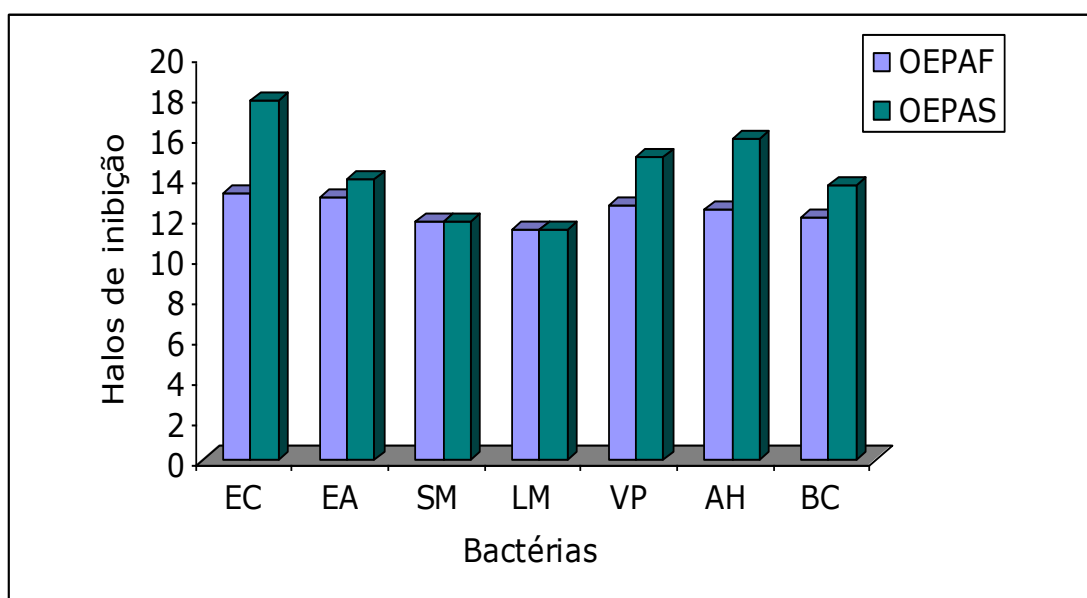
Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou um amplo espectro de ação, porém os mais significativos foram obtidos sobre bactérias gram-negativas. Estes resultados, de certa forma, contrariam alguns trabalhos relatados na literatura, pois estes afirmam que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis a ação dos óleos essenciais do que as bactérias gram-negativas (CIMANGA *et al.* 2002; BURT 2004; LOPEZ *et al.* 2005; BOZIN *et al.* 2006; ALVARENGA *et al.* 2007; HUSSAIN *et al.* 2008; NEDOROSTOVA *et al.* 2009). Porém, nem todos os estudos com óleos essenciais concluem que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis (TASSOU *et al.* 1995; OUATTARA *et al.* 1997; WILKINSON *et al.* 2003). Outros autores descrevem que as bactérias gram-negativas são tão suscetíveis quanto as gram-positivas. Assim, entre as bactérias gram-negativas a *A. hydrofila* aparece como uma das mais sensíveis (DEANS e RITCHIE, 1987; STECCHINI *et al.* 1993; HAO *et al.* 1998a, b; WAN *et al.* 1998).

KOYAMA *et al.* (1997) afirmam que muitos componentes dos óleos essenciais, os quais são diferentes em cada óleo, têm a habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias gram-negativas. OHNO *et al.* (2003) relatam que é necessário examinar separadamente cada componente do óleo essencial, e a combinação destes, para averiguar se eles tem ação antibacteriana sozinhos ou sincronizados (sinergismo). Na

literatura, vários autores relatam a existência de sinergismo e antagonismo quando se misturam óleos essenciais em várias proporções ou seus principais componentes (ULTEE *et al.* 2000a; LAMBERT *et al.* 2001; DELAQUIS *et al.* 2002; GILL *et al.* 2002; MOUREY e CANILLAC, 2002).

TAVARES (1996), COUTINHO *et al.* (2004) relatam que as bactérias gram-negativas possuem uma efetiva barreira de permeabilidade, composta de outra membrana, que restringe a penetração de compostos no citoplasma da bactéria. Estes microrganismos apresentam mecanismos de defesa conhecido como bombas de resistência a multidrogas (MDRs). A presença de MDRs em bactérias inibe a ação tanto de antibióticos sintéticos como naturais, dificultando o controle desses microrganismos patogênicos.

Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que o óleo essencial das partes aéreas secas apresenta atividade antibacteriana melhor do que o óleo das partes aéreas frescas, pois este apresentou melhores resultados em quase todas as cepas testadas (Figura 42). Esse fenômeno pode ser explicado com base na variação da composição fitoquímica que um óleo essencial pode sofrer no processo de secagem, pois CELIKTAS *et al.* (2007); VAN VUUREN *et al.* (2007) relatam que mudanças na composição fitoquímica de um óleo essencial afetam diretamente suas propriedades biológicas.



OEPAF = Óleo essencial das partes aéreas frescas; OEPAS = Óleo essencial das partes aéreas secas; EC = *Escherichia coli*; EA = *Staphylococcus aureus*; SM = *Serratia marcescens*; LM = *Listeria monocytogenes*; VP = *Vibrio parahaemolyticus*; AH = *Aeromonas hydrophila*; BC = *Bacillus cereus*.

Figura 42 – Desempenho do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum* como agente antibacteriano através do método da difusão em discos.

SUPPAKUL *et al.* (2003) demonstraram que o óleo essencial do *O. basilicum* apresenta boa atividade antimicrobiana frente a uma ampla faixa de microrganismos. Enquanto WANNISSORN *et al.* (2005) relataram que a espécie apresenta moderada atividade antibacteriana. Porém OPALCHENOVA e OBRESHKOVA (2003) encontraram forte atividade antibacteriana para o quimiotipo linalol, frente às cepas bacterianas resistentes dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*. HUSSAIN *et al.* (2008) afirmaram que no quimiotipo linalol as propriedades antibacterianas são atribuídas a este monoterpene e a outros compostos oxigenados.

Na espécie vegetal, objeto de nosso estudo, foram encontrados, com destaque, os terpenos eucaliptol,  $\alpha$ -farneseno, linalol, e o fenilpropano metilchavicol. BURT (2004) relata que o metilchavicol apresenta propriedade antibacteriana inferior ao eugenol e a combinação carvacrol/ácido cinâmico, porém superior a atividade do cinamaldeído e citral/geraniol. CIMANGA *et al.* (2002), SCHNEIDER *et al.* (2007) afirmam que o eucaliptol apresenta atividade antibacteriana e que o mesmo, segundo o primeiro autor, é responsável pelas propriedades antimicrobianas das espécies vegetais *E. camadulensis* e *C. citratus*. Não foram encontrados na literatura relatos de atividade antibacteriana para o metabólito  $\alpha$ -farneseno descrito neste trabalho. Desta forma, como relatado por HUSSAIN *et al.* (2008) a atividade antibacteriana observada em nosso trabalho, está relacionada ao linalol e a outros metabólitos oxigenados presentes nesta variedade de *O. basilicum*.

Comparando a ação do óleo essencial com os antibióticos padrões testados, observou-se que este apresentou melhores resultados do que os antibióticos, frente às cepas da *E. coli* e *A. hydrofila*. A vancomicina e a penicilina mostraram ação específica sobre determinados grupos de bactérias, ou seja; são potentes antibióticos sobre bactérias gram-positivas e alguns cocos-gram negativos, mas desprovidos de efeitos sobre os bacilos gram-negativos (SILVEIRA *et al.* 2006), enquanto que a ampicilina é um antibiótico com amplo espectro de ação, agindo tanto sobre bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. De acordo com os resultados observou-se também que a cepa do *Staphylococcus aureus*, testada, continua sensível à ação da vancomicina e a penicilina, enquanto que a cepa de *Listeria monocytogenes* se mostrou menos suscetível tanto a ação do óleo essencial quanto aos antibióticos testados.



## 5.8 Atividade Larvicida

### 5.8.1 Atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*

Os resultados da atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum* frente às larvas do *Aedes aegypti* estão na Tabela 6.

**Tabela 6 – Mortalidade das larvas do *A. aegypti* após 24h de exposição a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum*.**

Dose (ppm)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade (%)
250	2,3979	10,0	0,0	33,66	0,0	100,0
200	2,3010	10,0	0,0	23,66	0,0	100,0
150	2,1760	9,66	0,34	13,66	0,34	96,66
130	2,1139	2,00	8,0	4,0	8,34	20,0
100	2,0000	2,00	8,0	2,0	16,34	20,0
70	1,8450	0,0	10,0	0,0	36,34	0,0

A atividade larvicida do óleo essencial do *O. basilicum* foi testada nas seis concentrações diferentes. Os dados sobre o número de larvas vivas e mortas são uma média dos ensaios realizados em triplicata. A concentração de 70 ppm não apresentou atividade larvicida pois, nessa concentração, a taxa de mortalidade foi igual a zero. A concentração de 200 ppm do óleo essencial apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% das larvas testadas (Figura 43). As concentrações de 100, 130 e 150 ppm apresentaram uma taxa de mortalidade de 20, 20 e 96,66% respectivamente. A concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>), ou seja; aquela concentração que mata 50% das larvas testadas foi encontrada no intervalo entre as concentrações de 130 e 150 ppm (Figura 44). A CL<sub>50</sub> do óleo essencial das partes aéreas frescas do *O. basilicum* foi estimada em 134,75±2,00 ppm, para um limite de confiança de 95% de probabilidade.

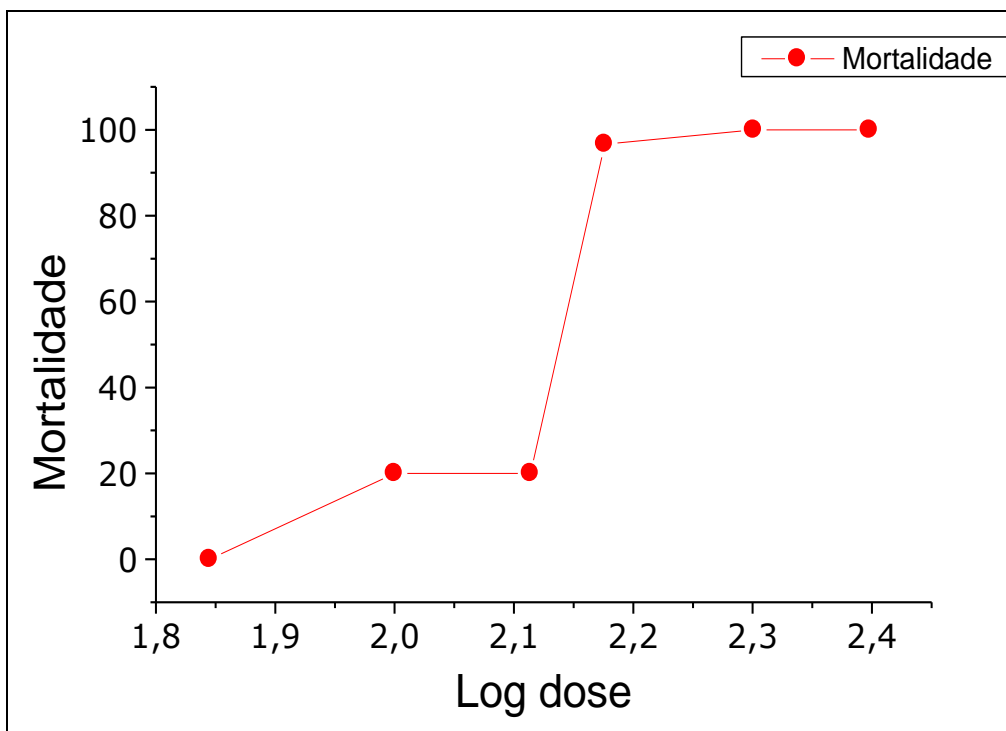


Figura 43 – Taxa de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*, após 24h, segundo o método Reed-Muench.

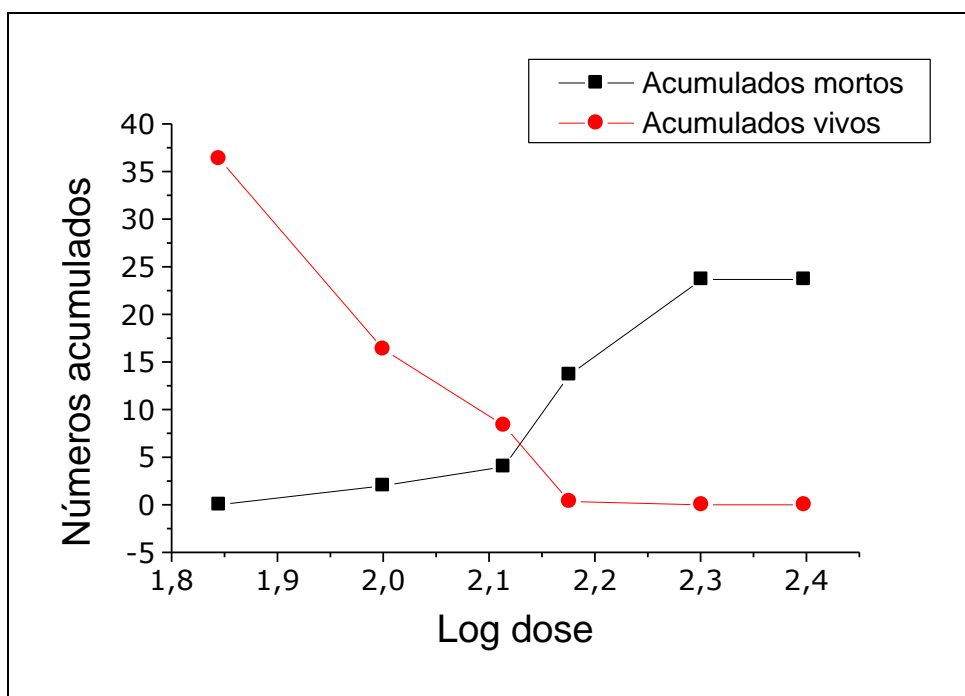


Figura 44 –  $CL_{50}$  do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum* calculado pelo método Reed-Muench. O ponto de interseção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.

### 5.8.2 Atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*

Os resultados da atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* frente às larvas do *A. aegypti* estão na Tabela 7.

**Tabela 7 – Mortalidade das larvas do *A. aegypti* após 24h de exposição a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*.**

Dose (ppm)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade (%)
250	2,3979	10	0,0	39,99	0,0	100
200	2,3010	10	0,0	29,99	0,0	100
150	2,1760	9,33	0,67	19,99	0,67	93,33
130	2,1139	7,66	2,34	10,66	3,01	76,66
100	2,00	3,0	7,0	3,00	10,01	30,00
70	1,8450	0,0	10	0,0	20,01	0,0

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a atividade larvicida do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* nas seis concentrações diferentes. A concentração com menor atividade larvicida contra o *A. aegypti* foi 100 ppm, que apresentou 30% de mortalidade. A concentração de 200 ppm mostrou ser a mais ativa, com uma taxa de mortalidade de 100% das larvas testadas, enquanto que as concentrações de 150 e 130 ppm apresentaram uma taxa de mortalidade de 93,33 e 76,66% respectivamente (Figura 45). A concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) ficou no intervalo entre as concentrações de 100 e 130 ppm (Figura 46). A CL<sub>50</sub> estimada para o óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum* ficou em 112,93±2,00 ppm, para um limite de confiança de 95% de probabilidade.

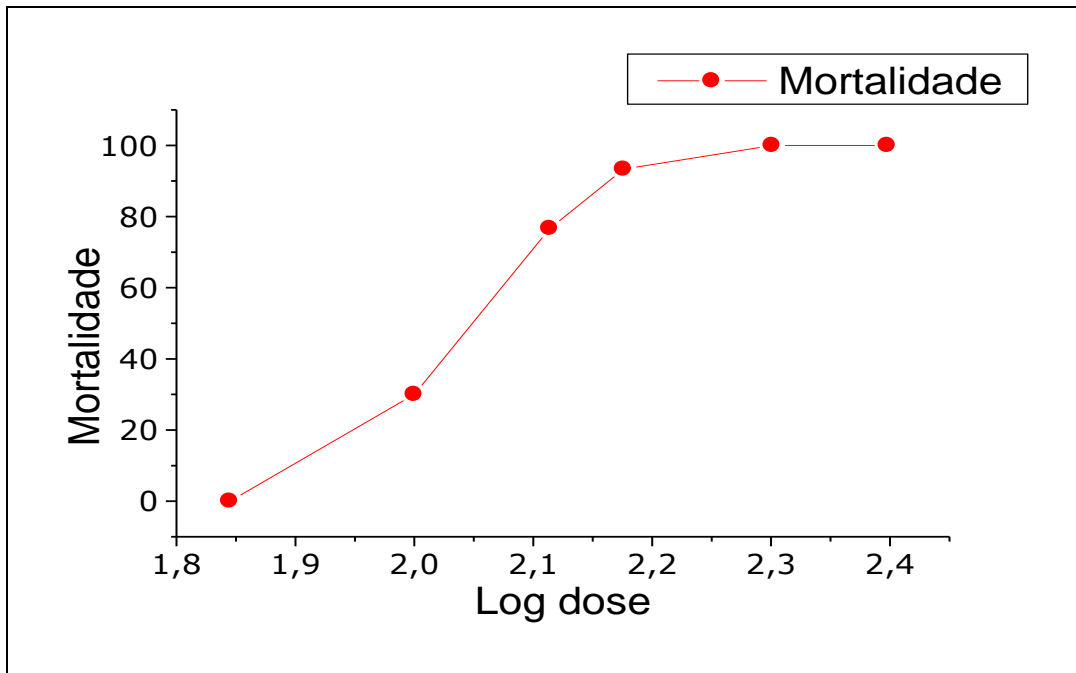


Figura 45 – Taxa de mortalidade das larvas do *A. aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*, após 24 h, segundo o método Reed-Muench.

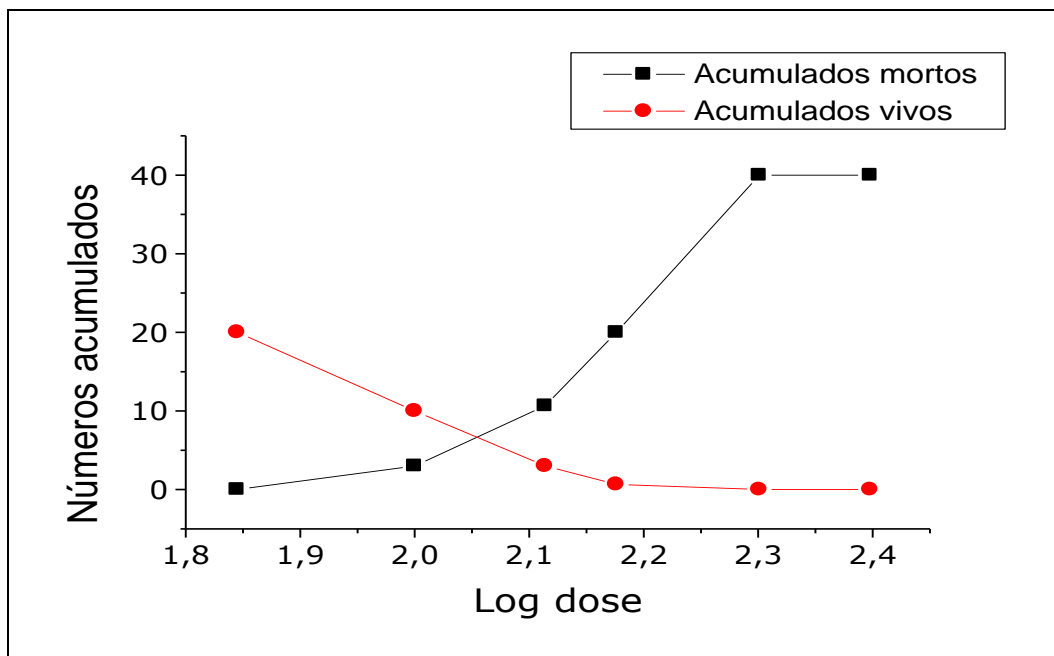


Figura 46 –  $CL_{50}$  do óleo essencial das partes aéreas secas do *O. basilicum*, calculado pelo método Reed-Muench. O ponto de interseção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.

Como parâmetro de controle nos testes larvicidas foi utilizado temefós na concentração de 100 ppm, equivalente ao utilizado pela Fundação Nacional de Saúde (Funasa), órgão do Governo federal responsável pelo controle da dengue no Brasil. Nessa concentração foram obtidos 100% de mortalidade das larvas após 24 horas de exposição. Admitindo-se essa concentração como padrão, um óleo essencial para exibir uma boa atividade larvicida deverá apresentar uma concentração letal a 50%, ( $CL_{50}$ ) próximo a este valor.

Os ensaios larvicidas mostraram que o óleo essencial das partes aéreas secas  $CL_{50}$  (112,93±2,00) apresenta uma atividade superior ao óleo essencial das partes aéreas frescas  $CL_{50}$  (134,75±2,00), sugerindo assim que alguns compostos presentes na amostra fresca inibem os metabólitos responsáveis por tal atividade biológica.

Como caracterizado pelas análises por CG-EM no item 5.5, tabela 2, o processo de secagem acarretou alterações na relação terpenos/ fenilpropanos, o que provocou um leve aumento na concentração do linalol com consequente diminuição do metilchavicol. Este fenômeno também foi relatado por GRAYER *et al.*, (1996) e KLIMANKOVÁ *et al.*, (2008) que observaram variações significativas entre a composição fitoquímica do óleo essencial das partes aéreas frescas e secas. Assim, admite-se que essas variações contribuíram para potencializar a ação larvicida do óleo essencial das partes aéreas secas desta espécie vegetal.

De acordo com os resultados, obteve-se uma correlação positiva entre a concentração do óleo essencial e o percentual de mortalidade, sendo desta forma a atividade larvicida proporcional à concentração do óleo, e que as larvas dos estádios I e II foram mais susceptíveis do que as larvas dos estádios III e IV. Esse fenômeno também foi observado por MURUGAN *et al.* (2007), quando testaram o extrato metanólico de *O. basilicum* frente aos quatro estádios larvais.

Como já demonstrado, o óleo essencial das partes aéreas do *O. basilicum* tem como principais constituintes o metilchavicol, linalol,  $\alpha$ -farneseno e eucaliptol. Entre estes compostos o eucaliptol e o metilchavicol apresentam baixa atividade larvicida (SIMAS *et al.* 2004), enquanto que, para o  $\alpha$ -farneseno, não foram encontrados, na revisão da literatura, relatos de atividade larvicida para este metabólito secundário.

FURTADO *et al.* (2005) encontraram para o óleo essencial de *O. basilicum purpurascens* (quimiotipo linalol)  $CL_{50}$  de 67 mg/ml. SIMAS *et al.* (2004) relataram para o ( $\pm$ )-linalol (padrão analítico) uma  $CL_{50}$  maior que 100 ppm. TELES (2009) encontrou para o (-) linalol uma  $CL_{50}$  de 279,89 ppm, enquanto para ( $\pm$ ) linalol o mesmo autor relata uma  $CL_{50}$  estimada em 346,73 ppm.

Confrontando nossos resultados com os da literatura, percebe-se que não é possível afirmar que a atividade larvívica do óleo essencial das partes aéreas do *Ocimum basilicum*, relatada neste trabalho, seja atribuída somente à ação do linalol, uma vez que os valores de  $CL_{50}$  encontrados apresentaram valores bem melhores do que os relatados na literatura para este monoterpene. Isto sugere que outros metabólitos atuaram como sinergistas, uma vez que o óleo essencial estudado é formado de uma mistura de terpenos e fenilpropano. Desta forma, é provável que outros terpenos estejam atuando de forma sinérgica com o linalol, pois os mesmos são substâncias que aumentam a absorção transmembranar tanto de drogas lipofílicas quanto de drogas hidrofílicas (SIMAS *et al.* 2004).

# CAPÍTULO VI

## *CONCLUSÕES*

---

## 6. CONCLUSÕES

Na espécie estudada foram encontrados, com maiores destaques, flavonoides, saponinas, esteroides livres, agliconas esteroides e triterpenoides, depsídeos e depsídonas. Desta forma, caberia um estudo mais aprofundado para tentar identificar-se a estrutura química desses metabólitos e seus possíveis atributos medicinais.

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Ocimum* são muito utilizados pela indústria cosmética nas mais variadas aplicações, no entanto, pouco se sabe sobre a estabilidade térmica dessas matérias-primas, de forma que os resultados obtidos, sugerem que termicamente os terpenos são menos estáveis do que os fenilpropanos. Este fato pode ser explicado em função da origem biossintética, sendo os primeiros compostos alifáticos, enquanto que os fenilpropanos são compostos aromáticos.

Através do estudo por CG-EM, foi demonstrado que o óleo essencial da variedade de *O. basilicum* estudado apresenta em sua composição química o metilchavicol como principal componente seguido do linalol; assim, ficou demonstrado que a espécie vegetal aqui pesquisada pertence ao quimiotipo metilchavicol-linalol semelhante à variedade que ocorre no Estado do Ceará.

O estudo antioxidante revelou que o óleo essencial das partes aéreas secas dessa variedade apresenta atividade antioxidante superior ao óleo essencial das partes aéreas frescas. No entanto, é necessário um tempo mínimo de 90 minutos para que a atividade antioxidante se intensifique, e um máximo de 240 minutos, o que evidencia um gradativo aumento do poder antioxidante com o decorrer do tempo.

O melhor desempenho do óleo essencial das partes aéreas secas, frente ao óleo essencial das partes aéreas frescas, pode ser atribuído a alterações que ocorrem na relação fenilpropanos/terpenos durante o processo de secagem da espécie vegetal. Assim, o(s) metabólito(s) responsável ou responsáveis pela ação antioxidante é/são favorecido(s) através de um possível aumento deste(s) no óleo essencial, provocando então, um aumento significativo na atividade antioxidante. Partindo do princípio de que a ação oxidante que ocorre nos alimentos processados é função do tempo de prateleira, o óleo essencial da espécie estudada apresenta uma boa atividade antioxidante.

O estudo do óleo essencial das partes aéreas do *O. basilicum*, uma espécie vegetal muito utilizada com fins medicinais, demonstrou acentuada atividade antibacteriana com



amplo espectro de ação entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, porém com resultados mais promissores frente as bactérias gram-negativas.

Nesta pesquisa ficou evidenciado que o óleo essencial obtido das partes aéreas secas apresentou atividade larvicida superior ao óleo essencial das partes aéreas frescas. Comparando-se os resultados obtidos com o padrão temefós conclui-se que o óleo essencial das partes aéreas secas de *O. basilicum* apresenta atividade larvicida próximo ao larvicida sintético utilizado pela Fundação nacional da Saúde frente às larvas do *A. aegypti*, porém com a vantagem de ser menos tóxico ao meio ambiente e por apresentar pouca possibilidade de que o mosquito possa desenvolver resistência frente aos princípios ativos do óleo essencial. Consequentemente, podemos afirmar que o material pesquisado apresenta dupla vantagem em relação ao larvicida sintético.

# CAPÍTULO VII

## *SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS*

---

## 7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- ❖ O rendimento em óleo essencial obtido variou muito em relação aos dias coletados, tanto em relação às partes aéreas secas como em relação as partes aéreas frescas; esse fenômeno pode ter sido provocado pelo cultivo aleatório da espécie vegetal. Para amenizar essas variações e, conseqüentemente, otimizar o rendimento, em futuros estudos sobre a espécie vegetal esta deverá ser cultivada num ambiente em que seja possível o controle de todas as variáveis envolvidas no processo de cultivo, o que poderá ocorrer na própria instituição de pesquisa.
- ❖ Quanto aos metabólitos detectados na triagem fitoquímica, estes poderão ser isolados, em estudos futuros, para averiguar-lhes as potencialidades farmacológicas, antibacterianas ou como bioinseticidas.
- ❖ As análises térmicas realizadas com o óleo essencial da espécie vegetal foram pouco conclusivas o que se faz necessário novas análises no intuito de descobrir os possíveis subprodutos de sua decomposição térmica, uma vez que estas matérias-primas são muito utilizadas pelas indústrias de cosméticos com os mais variados fins.
- ❖ Sobre a atividade antioxidante do óleo essencial a literatura relata que o poder antioxidante de um substrato é maior quando este apresenta derivados fenólicos em sua constituição fitoquímica. Neste trabalho, ficou demonstrado que o substrato é formado em grande parte por um derivado fenólico(metilchavicol), porém este não apresenta grupos OH livres o que inibe de forma considerada a atividade antioxidante do óleo essencial. Sendo assim, com o propósito de melhorar o poder antioxidante do óleo essencial o metilchavicol poderá, em trabalhos futuros, ser hidroxilado no anel aromático ou no grupo propenil ligado ao mesmo.
- ❖ A atividade antibacteriana do óleo essencial foi realizada tendo o tween 80 como surfactante. Porém, na literatura, há relatos afirmando que estes compostos são responsáveis por comprometer ou inativar agentes antimicrobianos que apresentam grupos fenólicos ou carboxílicos. Desta forma, os óleos essenciais, a princípio, têm maior atividade antibacteriana quando formulado em base hidrofílica do que em base lipofílica; assim em trabalhos futuros, o óleo essencial do *O. basilicum* poderá ser testado frente aos mesmos microrganismos, porém formulado em surfactante de base hidrofílica.

- ❖ Foi observado que, durante os experimentos, ocorreu volatilização do óleo essencial, pois este foi submetido a uma temperatura de 37°C por 24 horas no processo de incubação dos microrganismos. Em vista do exposto, em futuros experimentos, como proposta de otimizar os resultados, as placas de petri na qual serão realizados os procedimentos, estas deverão ser lacradas com filme de polietileno como forma de evitar perdas por evaporação e garantir assim que todos os microrganismos sofram a ação dos princípios ativos do óleo essencial durante a incubação.
- ❖ O óleo essencial da espécie vegetal é potencialmente viável do ponto de vista químico para se tornar um larvicida eficiente frente as larvas do *A. aegypti*; no entanto, para potencializar-lhe o efeito seriam necessárias novas pesquisas no sentido de identificarem-se quais substâncias apresentam atividade larvicida, se esta é produzida somente por uma única substância ou é provocada por um conjunto de substâncias através de um efeito sinérgico.

## **CAPÍTULO VIII**

### ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. M.; HEGGIE, W.; Terpenóides e Esteróides. In: LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. Biossíntese de produtos naturais. Lisboa: IST Press, 2007. p 119-150.

ABURJAI, T.; DARWISH, R.M; AL-KHALIL, S.; MAHAFZAH, A.; AL-ABBADI, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 39-44, 2001.

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Illinois: Allured, 1995. 469p.

ALTMAN, F. Alimentos contaminados. *Época*, **26**: 38-43, 1998.

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, **9**: 86-91, 2007.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**: (1), 27-36, 2005.

BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol*, **214**: 143–147, 2002.

BARREIRO, A.P. *Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais*. Botucatu, UNESP, 2006. Dissertação de mestrado, 96p.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536p.

BARRETO, A.S; VEIGA JÚNIOR, V.F. *Inteligência vegetal na arte da sedução: interações biológicas, evolução, utilização, extração, identificação, química e farmacologia de óleos essenciais de plantas*. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 115p.

BARRETO, C.F. CAVASIN, G.M.; SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *aedes aegypti* L (díptera, culicidea) submetidas ao extrato bruto e etanólico *sapindus saponaria lin* (sapindaceae). *Revista de patologia tropical*. **1**: 37-57, 2006.

BARRETO, C.F. *Aedes aegypti* Linn. Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás*, v.1, n.2, p. 62-73, nov. 2005. Disponível em: [http://www.fmb.edu.br/revista/edições/vol1\\_num\\_2/dengue.pdf](http://www.fmb.edu.br/revista/edições/vol1_num_2/dengue.pdf) Acessado em 02/01/2009.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. Philadelphia, **45**: 493-496, 1966.

BLANK, A.F.; SOUZA, E.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; ALVES, P.B. Novas Cultivares Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, **42**: (12), 1811-1813, 2007.

BOSCOLO, O.H.; MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE, L.. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.* **9**: (1), 8-12, 2007.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1822–1828, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, **28**: 25-30, 1995

BRAZ-FILHO, R. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas do estudo químico de produtos naturais. In: MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. Produtos naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza: EdUECE, 2007. P.13-45.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde 2008.

BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

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

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**: 2157-2184, 2004.

CAMPOS, M.M. *Química orgânica*. São Paulo: Edgar Blucher; EDUSP, 1977. v.2, 924p.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. *Quim. Nova*, **31**: (7), 1660-1664, 2008.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES,P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Rev. bras. farmacogn.* **16**: (1) 24-30, 2006.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C.. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, **100**: (2), 553\_559. 2007.



CHALCHAT, J.C.; ÖZCAN, M.M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*, **110**: 501–503, 2008.

CHENG, S.S.; CHUA, M.T.; CHANG, E.H.; HUANG, C.G.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresource Technology xxx (2008) xxx–xxx*.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* **79**: 213–220, 2002.

CLARO, L.B.L.; TOMASSINI, H.C.B.; ROSA, M.L.G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, **20**: (6), 1447-1457, 2004

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Boca Raton: CRC Press. 1993. p. 446 – 449.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LOBO, K.; BARBOSA, I.J.F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. Julho de 2003/Junho de 2004. CONCEITOS. Disponível no site: [http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art\\_11.pdf](http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf). Acessado em 05/01/2009.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G., Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **5**: 165– 180, 1987.

DELAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G.. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **74**: 101–109, 2002.

DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALASA, P.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International*, **31**: (5), 351-354, 1998.

DI STASI, L.C. Uma proposta de ação interdisciplinar na pesquisa de novos medicamentos a partir de plantas medicinais. In: Di STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1996. P.216-230.

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1996. P.108-127.

DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. *Rev. Bras. Epidemiol*, **5**: 3, 2002.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, **83**: (2), 255-262, 2003

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a historia dos produtos naturais. Outubro 2006. Multiciência. Disponível no site:

[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf) . Acessado em: 31/01/2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. São Paulo: Ateneu, 1988.

FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, **22**: (2), 260-264, 2004.

FERREIRA, J.T.B., ZARBIN, P.H.G. Amor ao primeiro odor: a comunicação química entre os insetos. *Química Nova Escola*, **7**: 3-14, 1998.

FRANCO, J. *Prospecção fitoquímica e análise química e microbiológica do óleo essencial de Eucalyptus cinérea F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae*. Curitiba, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2005. Tese de mestrado, 77p.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal. Agric. Food Chem.*, **48**: 3597-3604, 2000.

FURTADO, F. R.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, **34**: (5), 843-847 (2005).

GILL, A.O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A.. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, **73**: 83–92, 2002.

GÓMEZ, M.E.D.B. *Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Área de Bromatologia, USP, 2003. Tese de Doutorado, 149 p.

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE, F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, **43**: (5), 1033-1039, 1996.

GROS, E.G., POMILIO, A.B., SELDES, A.M., BURTON, G. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Washington, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Serie de Química, Monografía n.30.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R.. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, **26**: 194–198, 1998.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G. *Dengue: na update*. *Lancet Infectious Discascs*, **2**: 32-42, 2001.

HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E.; DOYLE, M.P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology*, **15**: 367–378, 1998a.

HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *Journal of Food Protection*, **61**: (3), 307–312, 1998b.

HARRIS, D.C. *Análise química quantitativa*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC. 2005. 886p.

HAZRA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. Thermal analysis of the evaporation of compounds used in aromatherapy using thermogravimetry. *Thermochimica Acta*, **392-393**, 221-229, 2002.

HRAS, A.R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, **71**: (2), 229-233, 2000.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* **108**: 986\_995, 2008.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; CREGO, A.L.; SEÑORÁNS, F.J.; CAVERO, S.; REGLERO, G. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **48**: (9), 4060-4065, 2000.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, **83**: 547–550, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**: 703-725, 2001.

KÉITA, S.M.; VICENT, C.; SCHMIT J.P.; ARNASON, J.T.; BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *Journal of Stored Products Research*, Oxford, **37**: 339-349, 2001.

KLIMÁNKOVÁ, E.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; CAJKA, T.; POUŠTKA, J.; KOUDELA, M. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*, **107**: 464–472, 2008.

KNOBLOCH, K., WEIGAND, H., WEIS, N., SCHWARM, H.-M., VIGENSCHOW, H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin, pp. 429–445.

KOYAMA, S., YAMAGUCHI, Y., TANAKA, S., MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kisohinoki), *Chamaecyparis obtusa*. *General Pharmacol.* **28**: 797-804, 1997.

LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MAZZEI, M.; SALA, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science* **167**: 725–731. 2004.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P., NYCHAS, G.-J.E.,. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol *Journal of Applied Microbiology* **91**: 453–462, 2001.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, **91**: 131–137, 2005.

LEWINSOHN, E.; ZIV-RAZ, I.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; LASTOCHKIN, E.; LARKOV, O.; CHAIMOVITSH, D.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; PICHERSKY, E.; SHOHAM, Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol *O*-methyltransferase activities. *Plant Science*, **160**: 27–35. 2000.

LIMA, G.P.P.; ZIGIOTTO, D.C.; TAKAKI, M. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, **10**: 75-82, 2008.

LOBO, A.M.; LOURENÇO, A.M. Metabólitos derivados do ácido acético In: LOBO, A.M.; LOURENÇO, A.M. *Biossíntese de produtos naturais*. Lisboa: IST Press, 2007. p. 76-118.

LOPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLLE, R., & NERIN, C.. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 6939–6946, 2005.

MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A.. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**: 1166-1168, 2007.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. *Braz. J. Food Technol.*, **10**: 96-103, 2007.

MARTINS, C.M.; OLIVEIRA, D.M.; TEIXEIRA, T.F.S.; PELUZIO, M.C.G. O Paradoxo do papel da vitamina E na iniciação e progressão da aterosclerose e sua correlação com os radicais livres. *Rev Med Minas Gerais*, **14**: (2), 113-6, 2004.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: EUFC, 1988. 125p.

MATTEA, F.; CARDARELLI, D. A.; DAGHERO, J. D.; MATTEA, M. A. Natural antioxidants obtained with supercritical CO<sub>2</sub>. In: *V Encontro brasileiro de fluidos supercríticos*, Florianópolis – SC, 2004, Caderno de Resumos do V EBFS, 70 p.

MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; PAROUL, N. Caracterização química de extratos de *ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões. *Quim. Nova*, **29**: (6), 1198-1202, 2006.

MCMurry, J. *Química Orgânica*. São Paulo: Thomson Learning. 2005. v.1, 492p.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B.A. Ação antioxidante de compostos fenólicos em alimentos. *Bol. SBCT*, **36**: 1-11, 2002.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of dpph free radical method. *Phytotherapy research*, **15**: 127-130, 2001.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do nordeste do Brasil. *Quim. Nova*, **29**: (5), 907-910, 2006.

MORAIS, S.M. Antioxidantes naturais. In: Morais, S.M.; Braz-Filho, R. *Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, 2007a. p.123-148.

MORAIS, S.M.; FACUNDO, V.A.; BERTINI, L.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; dos ANJOS JÚNIOR, J.F.; FERREIRA, S.A.; BRITO, E.S.; SOUZA NETO, M.A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **35**: 670-675. 2007b.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTE, E.S.B. Produtos naturais no controle da dengue. In: Morais, S. M.; Braz-Filho, R. *Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*. EdUECE, Fortaleza. p. 13-45. 2007a.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* **13**: 289– 292, 2002.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Ieditora, 2002, 300p.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* Insecta: Diptera: Culicidae *Bioresource Technology*, **98**: 198–201, 2007.

NASCIMENTO, A.R. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isolados de sururu (Mytella falcata)*. Lavras, UFLA, 2004. Tese (Doutorado em Microbiologia), 91p.

NEDOROSTOVA, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVA, M.; PULKRABEK, J.F. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, **20**: 157–160, 2009.

NOGUEIRA, M.S.; FABRI, R.L.; SCIO, E. Atividade antibacteriana de espécies da família Lamiaceae. 47º Congresso Brasileiro de Química Disponível em <http://www.abq.org.br/cbq/2007>. Acessado em: 02/07/ 2007.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, S. M.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. **8**: 207-215, 2003.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil an essential oil from *Ocimum basilicum* L. gainst multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*, **54**: 105– 110, 2003.

ORAFIDIYA, L.O.; ADESINA J.R, S.K.; IGBENEGHU, O.A.; AKINKUNMI, E.O.; ADETOGUN, G.E.; SALAU. A.O. The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against common wound-infecting organisms. *The International Journal of Aromatherapy*, **16**: 57–62. 2006.

ORAFIDIYA, L.O.; OYEDELE, A.O.; SHITTU, A.O.; ELUJOBA, A.A. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. *International Journal of Pharmaceutics*, **224**: 177–183, 2001.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.-P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential. oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, **37**: 155– 162, 1997.

ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; ÜNVER, A. Effect of drying methods on the mineral content of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Food Engineering*, **69**: 375–379, 2005.



PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; BALLESTA-ACOSTA. M.C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 673–679. 2003.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 111-140.

PEREIRA, C.A.M; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **27**: (3), 624-632, 2007.

PINHEIRO, D.C.S.N.; LEITE, A.K.R.M.; GIRÃO, V.C.C. Plantas medicinais com atividade antiinflamatória. In: Morais, S.M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, 2007. P.182-183.

PIZZI, M., Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method. *Hum. Biol.* **22**: 151–190, 1950.

POKRYWIECKI, J.C. *Fracionamento do óleo essencial de manjeriço de cheiro (ocimum basilicum) com membranas em meio supercrítico para concentração do linalol com reciclo do solvente no processo de extração*. Florianópolis, UFSC, 2006. Tese de Doutorado. 225p.

POLITEO, O.; MILOS. M.J.M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, **101**: 379–385, 2007.

REED, L.J., MUENCH, H., A simple method of estimating fifty percent end-points. *AMER. J. HYG.* **27**: 493–497, 1938.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.L.A. Levantamentos etnofarmacológicos. *Ver. Racine*, **12**, 2002.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **27**: (1), 53-60, 2007.

RONAN, C.A. *História ilustrada da ciência*. Rio de Janeiro: J. Zahar, 1987. v.2.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food. Chemistry*, **69**: 67-174, 2000.

SAMPAIO, H.A.C. Fitosteróis na prevenção e controle de doenças. In: MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, 2007. P.195-206.

SANTOS, R.P.; NUNES, E.P.; NASCIMENTO, R.F.; SANTIAGO, G.M.P.; MENEZES, G.H.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**: (5), 1027-1030, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**: 275-280, 2004.

SCHNEIDER, N.F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARANGONI, C.; FLACH, A. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambuí). *Rev. Bras. Farm.*, **89**: (2), 131-133, 2008.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **43**: (2), 2007.

SEGATTO, C. O ataque das superbactérias. *Época*, 547: 130-136, 2008.

SIKKEMA, J.; de BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: (11), 8022–8028, 1994.

SILVA, F.; SANTOS, R.H.S.; DINIZ, E.R.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V.W.D.; LIMA, R.R. Teor e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L) em dois horários e duas épocas de colheita. *REV. BRAS. PL. MED.*, Botucatu, **6**: (1), 33-38, 2003.

SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; PINHEIRO, M.L.B; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C.M.; BOLZANI, V.S. Ésteres triterpênicos de *himatanthus succuuba* (spruce) woodson. *Quim. Nova*, **21**: (6), (1998).

SILVA, J.S.; MARIANO, Z.F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*. **3**: (6), 163-175, 2008.

SILVA, M.G.V. Óleos essenciais e atividade biológica. In: IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. 2007, Fortaleza. Palestras. Disponível em: [www.ivsboe.padetec.ufc.br/palestras/goretti.pdf](http://www.ivsboe.padetec.ufc.br/palestras/goretti.pdf) Acessado em: 14 de maio de 2009.

SILVA, W.J. *Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no estado de Sergipe contra Aedes aegypti* linn. São Cristovão, UFS, 2006. Dissertação de Mestrado, 81p.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ.; M.M. TEREZI. H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim. Nova*, **29**: (4), 844-855, 2006.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; LAGE, C.L.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova*, **27**: (1), 46-49, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: EdUFRGS.; EdUFSC, 2007. 1103p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: EdUFRGS.; EdUFSC, 2007. 1103p.

SOARES, R.D.; CHAVES, M.A.; SILVA, A.A.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, B.S.S. Influência da temperatura e velocidade do ar na secagem de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) Com relação aos teores de óleos essenciais e de linalol. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, **31**: (4), 1108-1113, 2007.

STECCHINI, M.L.; SARAIS, I.; GIAVEDONI, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*, **56**: (5), 406–409, 1993.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3197–3207, 2003.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.-J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**: 593– 600, 1995.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, **17(Suplemento)**: 99-102, 2001.

TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792p.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do stafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **33**: 281-301, 2000.

TELICI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G.; AVCI, B. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**: 489-497, 2006.

TELES, R.M. *Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade Larvicida Frente ao Aedes aegypti do Óleo Essencial da Espécie Vegetal Aniba duckei Kostermans*. João Pessoa, UFPB, 2009. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em química. 2009. 126p.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C., Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, **52**: (6), 399– 403, 1989.

TORRE, J.; LORENZO, M. P.; MARTÍNEZ-ALCÁZAR, M. P.; BARBAS, C. Simple high-performance liquid chromatography method for  $\alpha$ -tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves - New data on  $\alpha$ -tocopherol content. *Journal of Chromatography A*, **919**: (2), 305-311, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiology: an introduction*. 17.ed. New York: Addison Wesley Longman, 2001. p.549-575.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R.; The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: (4), 1561–1568. 2002a.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: (10), 4606– 4610, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, **64**: 373–378. 2001.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, **174**: (4), 233– 238. 2000a.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A.M.; OZEK, T.; DEMIRICI, B.;BASER, K. H. C. Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. *South African Journal of Botany*, **73**: (3), 441\_448, 2007.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: EDUFRGS; EDUFSC. 2007. P. 903-918.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J., The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, **84**: 152–158, 1998.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM,S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S.. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, **76**: 233\_236, 2005.

WILKINSON, J.M.; HIPWELL, M.; RYAN, T. CAVANAGH, H.M.A.. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 76– 81, 2003.

# CAPÍTULO IX

*ANEXOS*

---



Fonte: O próprio autor, (2009)

Anexo 01 – Refratômetro usado para obter o índice de refração do óleo essencial do *Ocimum basilicum*



Fonte: O próprio autor, (2009)

Anexo 02 – Evaporador rotatório usado na concentração dos extratos





Fonte: O próprio autor, (2009)

Anexo 03 – Espectrofotômetro UV-Vis Varian utilizado na determinação da atividade antioxidante do óleo essencial.



Fonte: O próprio autor, (2009)

Anexo 04 - Analisador térmico, aparelho no qual foram realizadas as análises por TG e DSC.

Anexo 05. Absorbâncias obtidas em um espectrofotômetro UV-Vis Varian, para o cálculo da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.

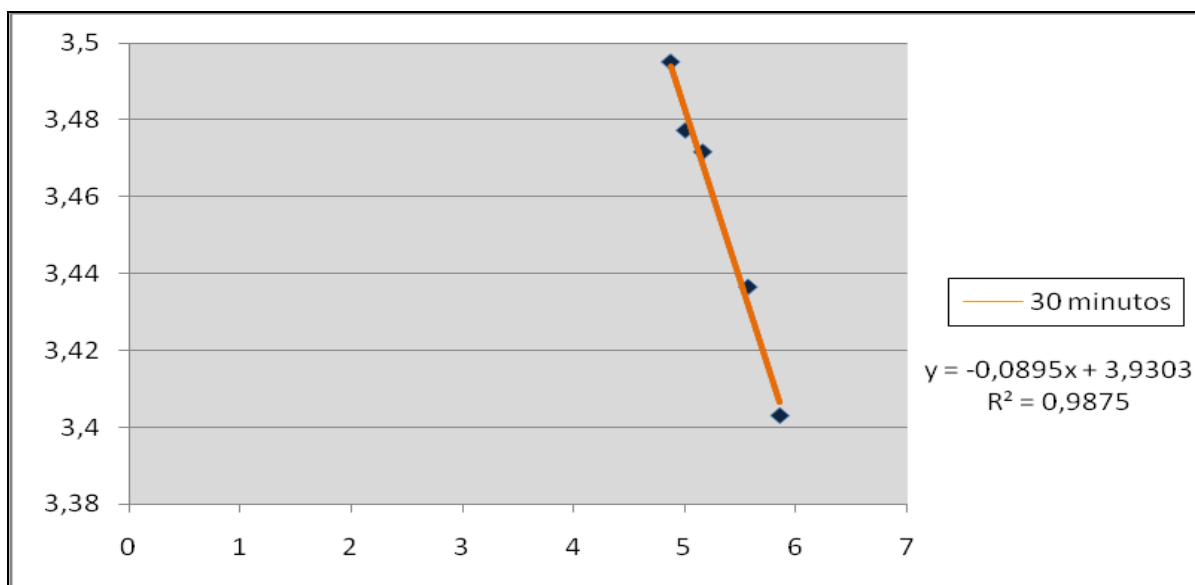
		Concentração do óleo essencial em (g/mL)							
*T	DPPH	3,82. 10 <sup>-3</sup>	5,73. 10 <sup>-3</sup>	7,64. 10 <sup>-3</sup>	9,55. 10 <sup>-3</sup>	1,14. 10 <sup>-2</sup>	1,33. 10 <sup>-2</sup>	1,52. 10 <sup>-2</sup>	
0-30	0,4225	0,4188	0,4018	0,4000	0,3755	0,3742	0,3620	0,3620	
30-60	0,4196	0,4038	0,3833	0,3797	0,3447	0,3371	0,3206	0,3157	
60-90	0,4156	0,3923	0,3683	0,3596	0,3189	0,3079	0,2870	0,2807	
90-120	0,4139	0,3824	0,3528	0,3396	0,2939	0,2820	0,2584	0,2488	
120-50	0,4120	0,3736	0,3394	0,3239	0,2716	0,2594	0,2333	0,2241	

\*Tempo em minutos

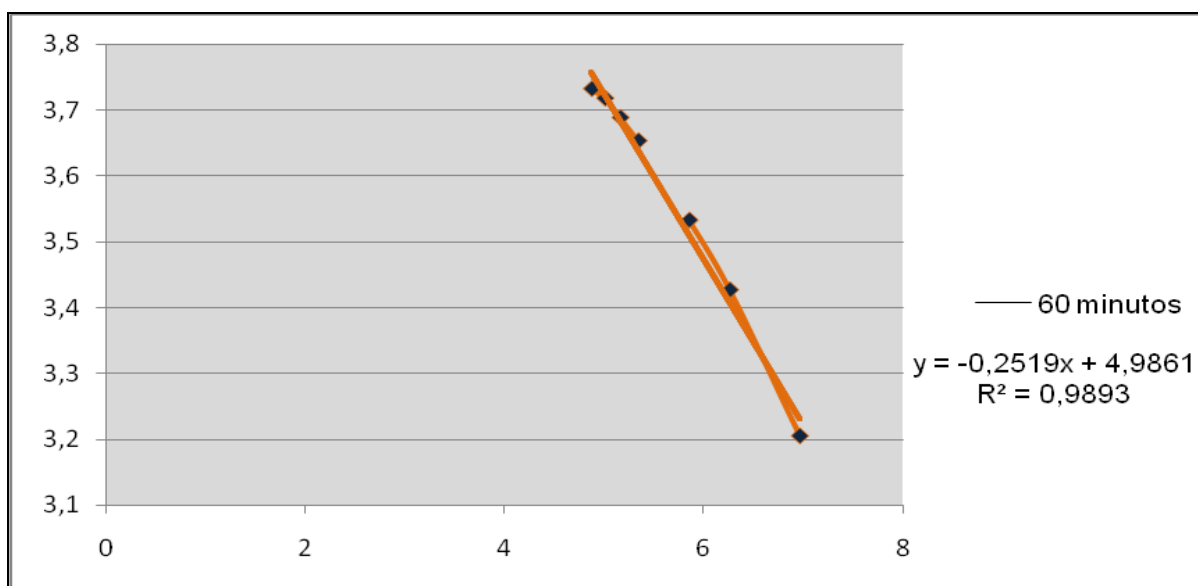
Anexo 06. Absorbâncias obtidas em um espectrofotômetro UV-Vis Varian, para o cálculo da atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*.

		Concentração do óleo essencial em (g/mL)							
*T	DPPH	9,56. 10 <sup>-4</sup>	1,91. 10 <sup>-3</sup>	2,87. 10 <sup>-3</sup>	3,80. 10 <sup>-3</sup>	4,78. 10 <sup>-3</sup>	5,73. 10 <sup>-3</sup>	6,69. 10 <sup>-3</sup>	7,64. 10 <sup>-3</sup>
0-30	0,3426	0,3460	0,3310	0,3173	0,3139	0,3145	0,3100	0,3128	0,3211
30-60	0,3493	0,3408	0,3194	0,3074	0,3073	0,2921	0,2873	0,2831	0,2880
60-90	0,3454	0,3341	0,3017	0,2857	0,2865	0,2684	0,2615	0,2531	0,2516
90-120	0,3433	0,3197	0,2759	0,2574	0,2554	0,2295	0,2206	0,2093	0,2036
120-150	0,3348	0,3128	0,2597	0,2391	0,2364	0,2046	0,1940	0,1797	0,1688
150-180	0,3303	0,3026	0,2869	0,2159	0,2104	0,1731	0,1599	0,1435	0,1300
180-210	0,3279	0,2917	0,2080	0,1882	0,1817	0,1420	0,1281	0,1114	0,0989
210-240	0,3217	0,2822	0,1884	0,1622	0,1565	0,1135	0,1011	0,0865	0,0780

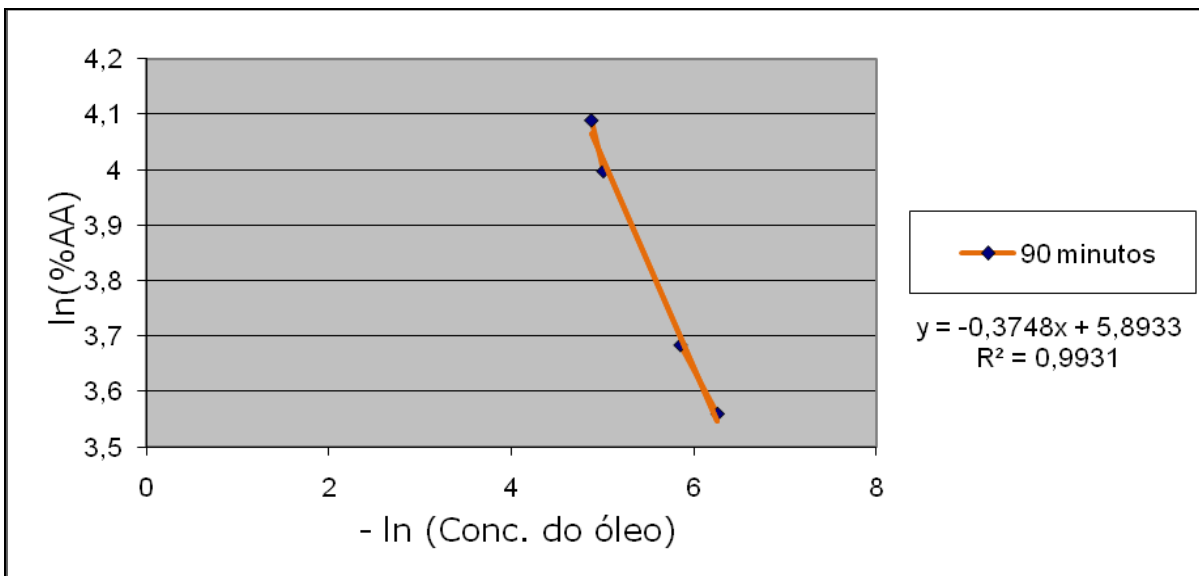
\*Tempo em minutos



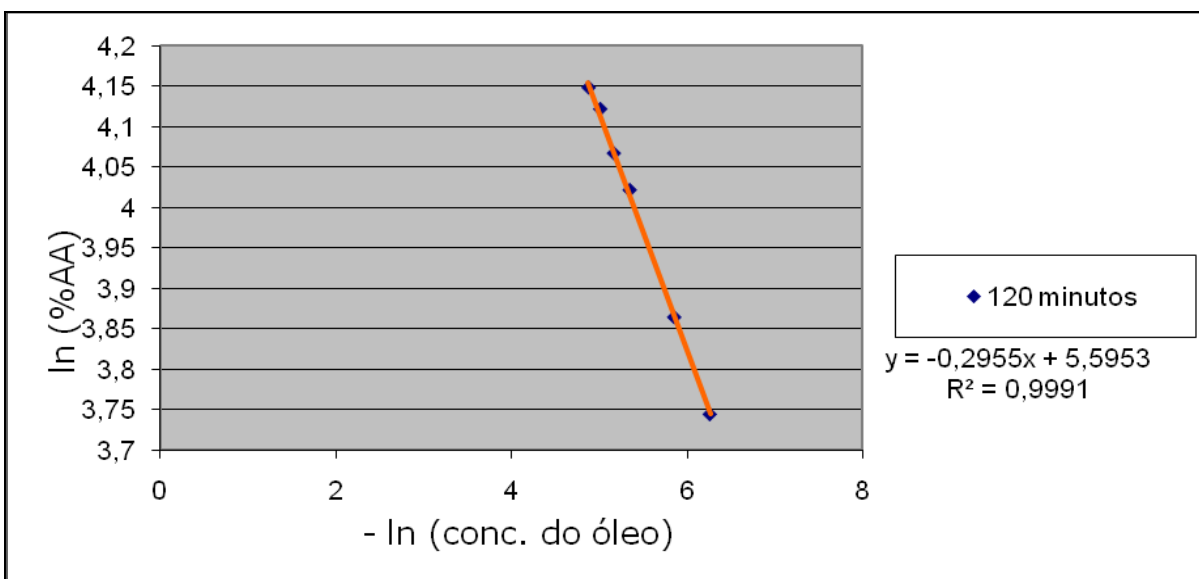
Anexo 07 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 30 minutos para o óleo essencial da partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*



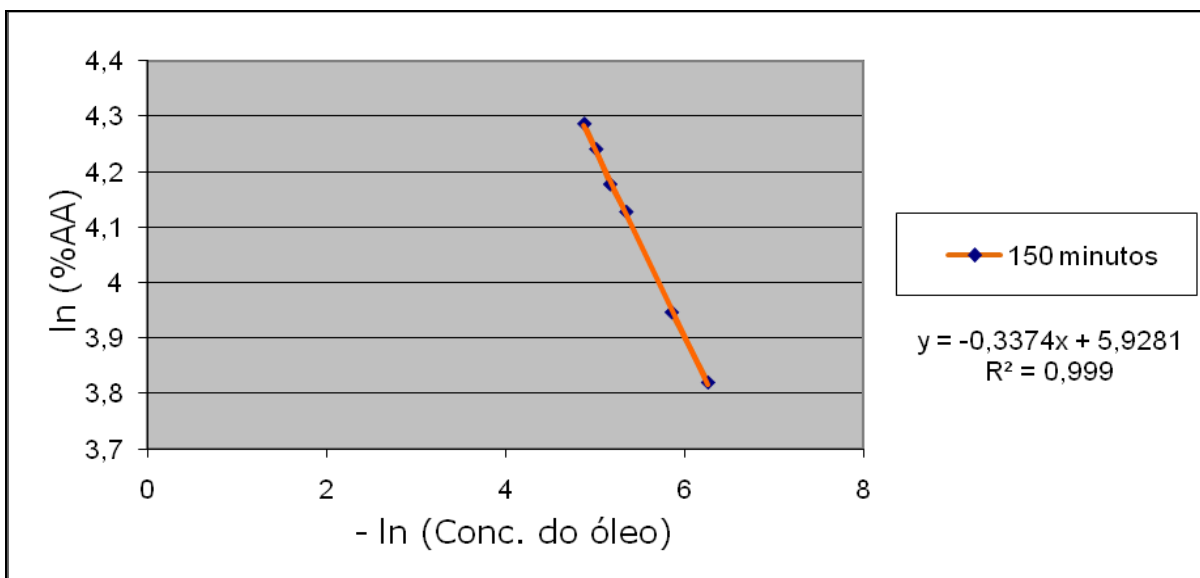
Anexo 08 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 60 minutos para o óleo essencial da partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*



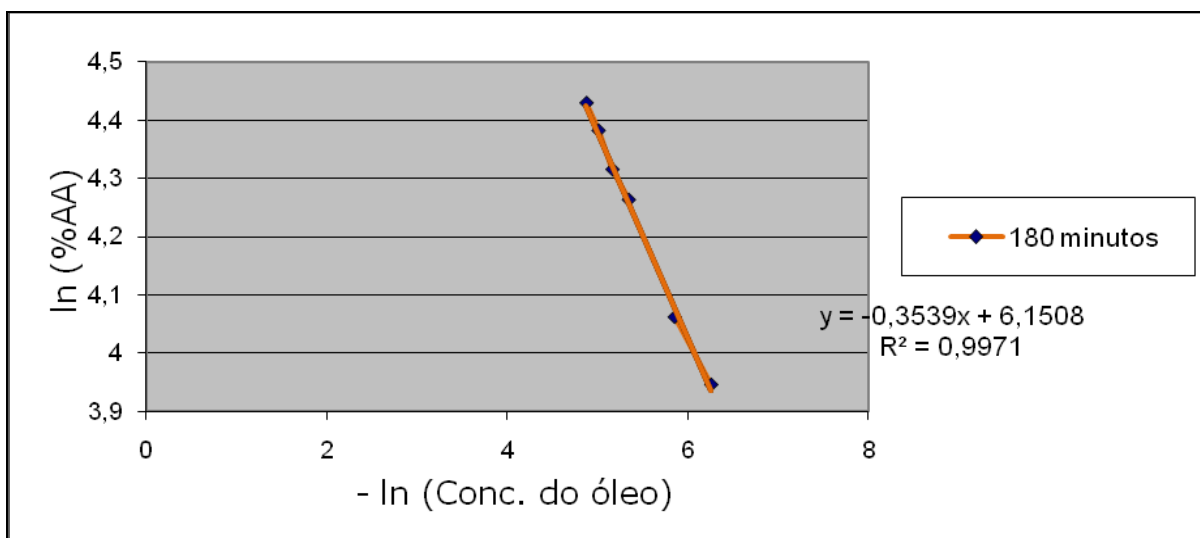
Anexo 09 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 90 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*



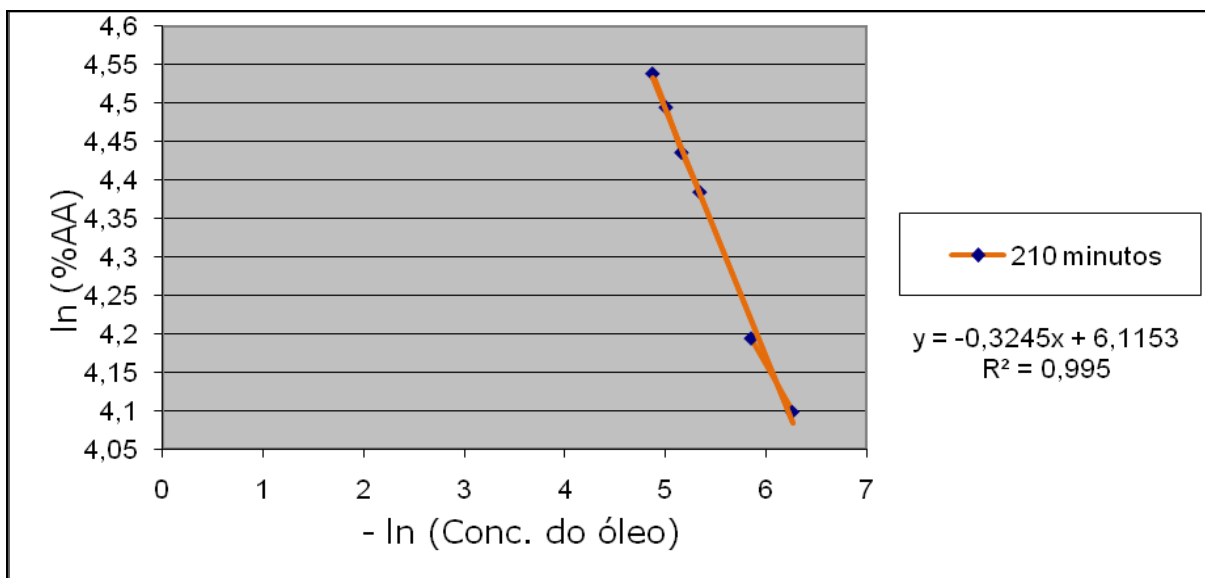
Anexo 10 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 120 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*



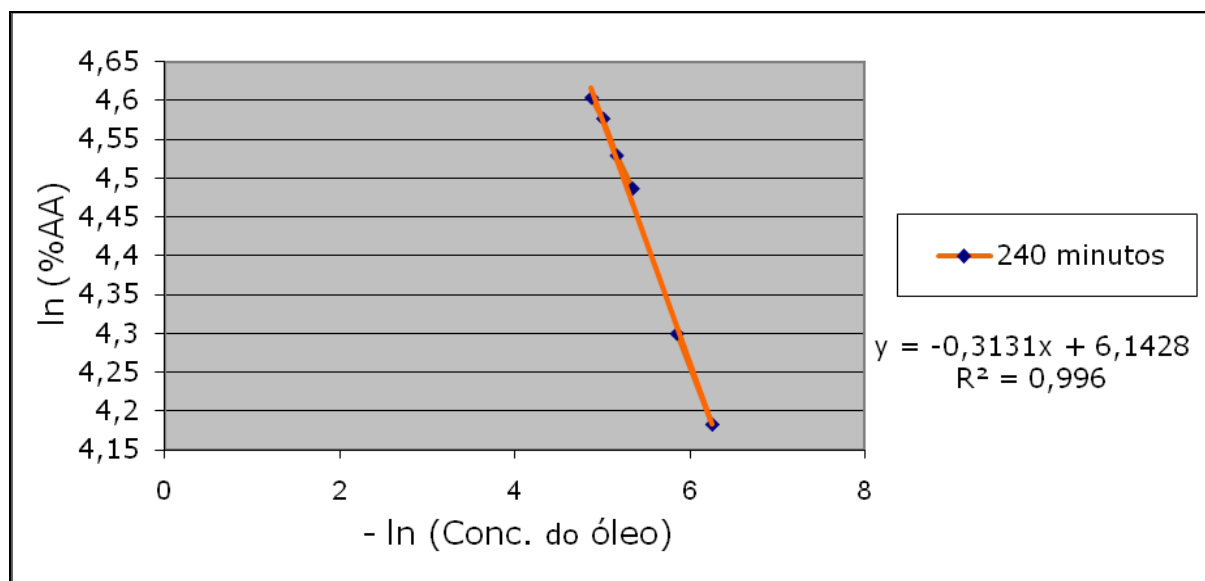
Anexo 11 – Cálculo da LC<sub>50</sub> em 150 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*



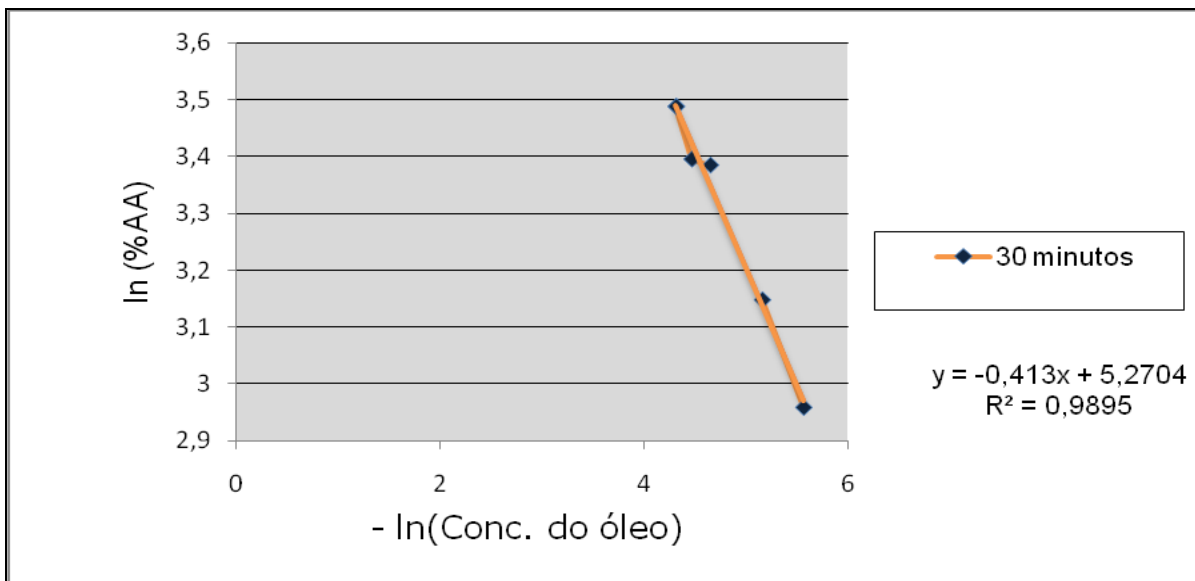
Anexo 12 – Cálculo da CI<sub>50</sub> em 180 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*.



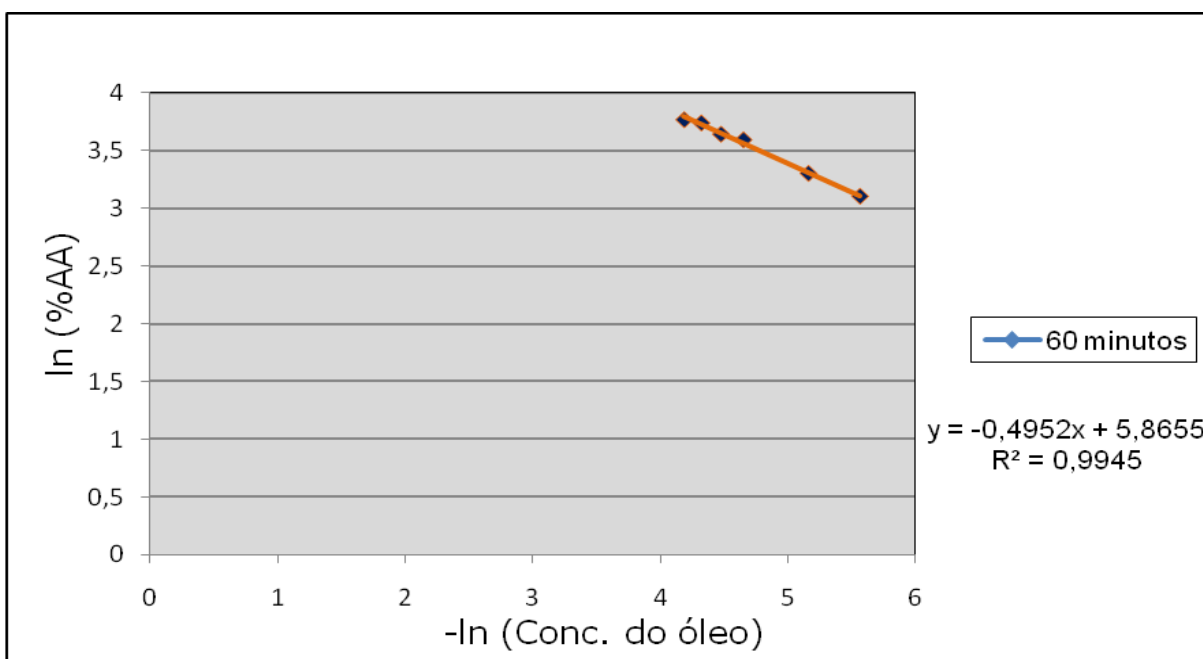
Anexo 13 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 210 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*.



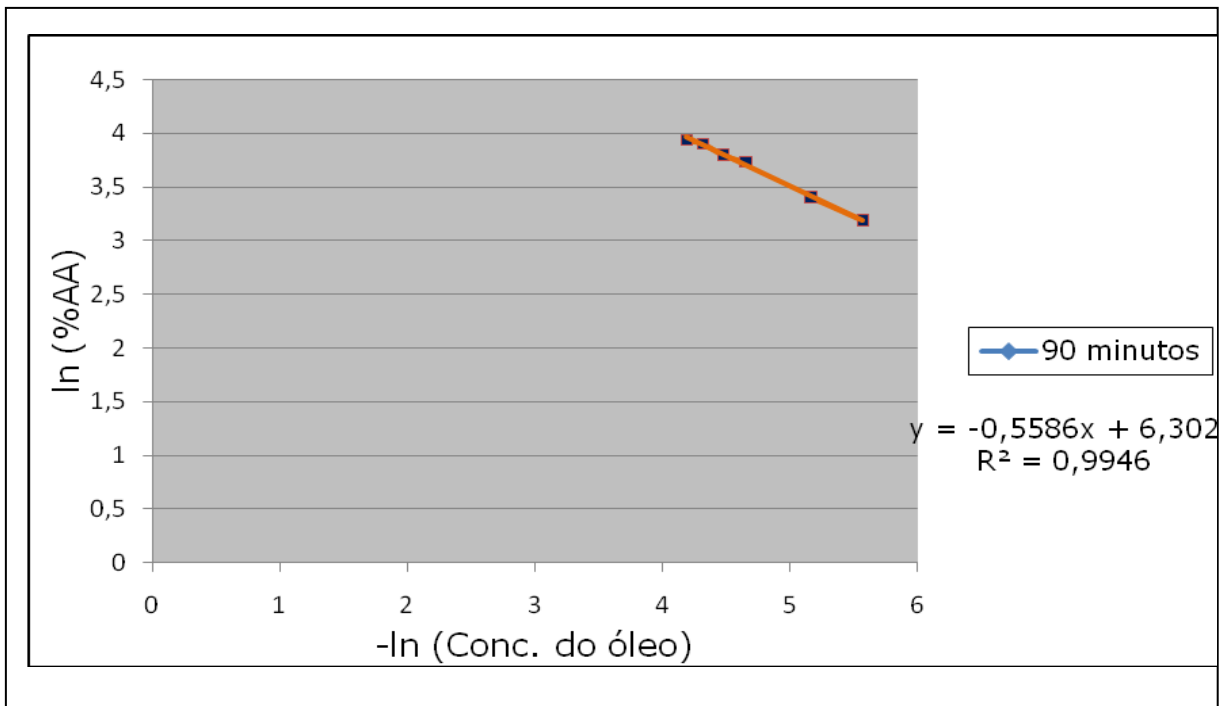
Anexo 14 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 240 minutos para o óleo essencial das partes aéreas secas do *Ocimum basilicum*.



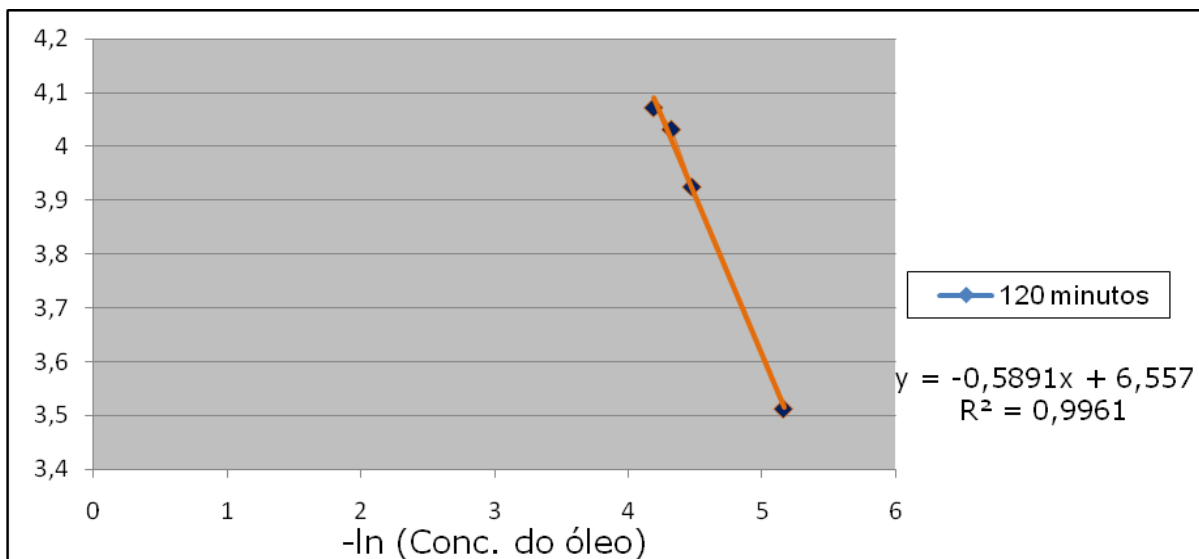
Anexo 15 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 30 minutos para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.



Anexo 16 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 60 minutos para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.

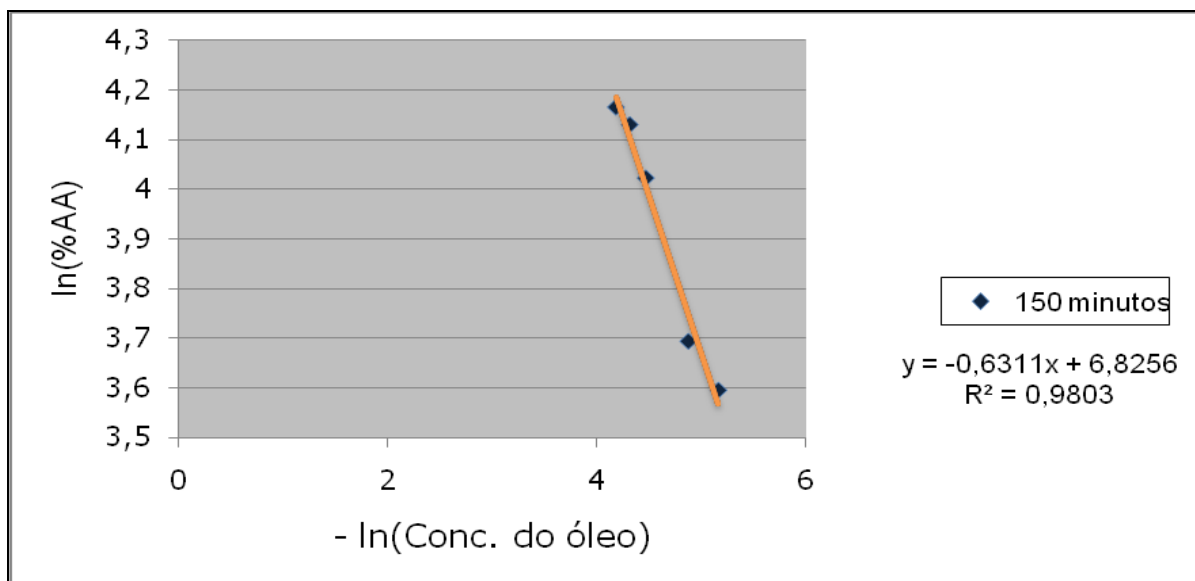


Anexo 17 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 90 minutos para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.



Anexo 18 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 120 minutos para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.



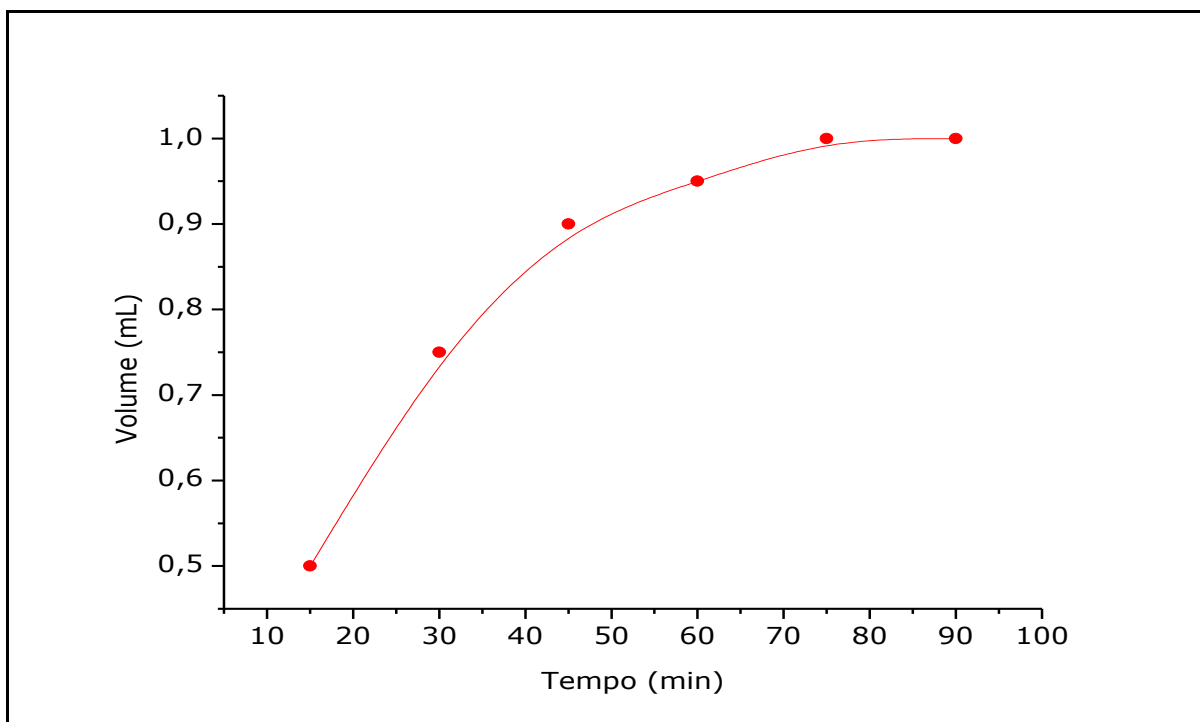


Anexo 19 – Cálculo da  $CI_{50}$  no tempo de 150 minutos para o óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.

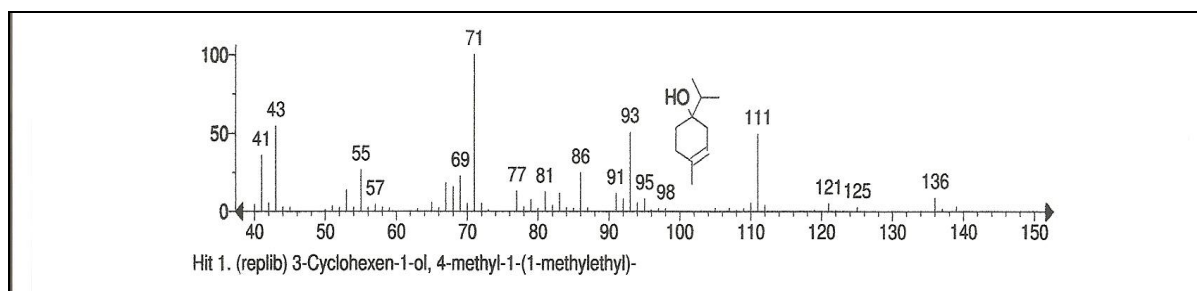
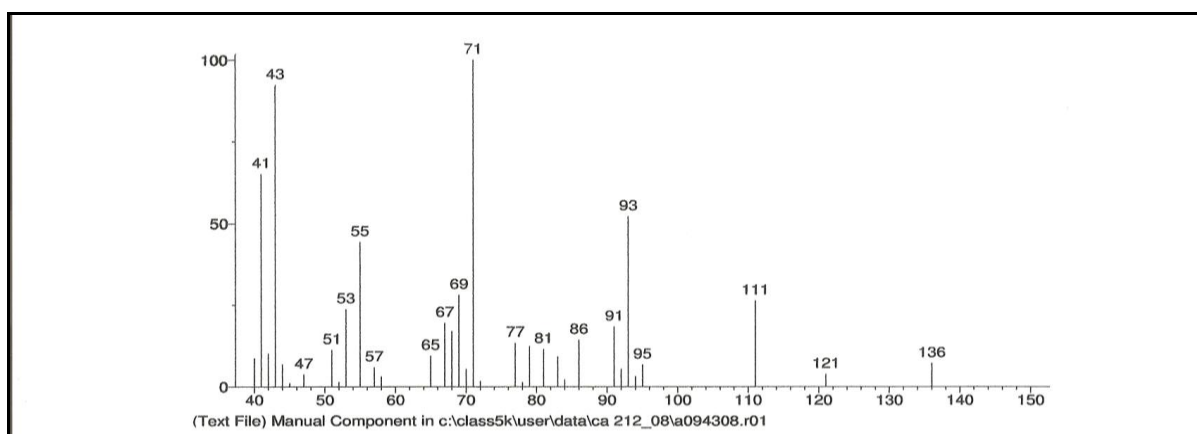


Fonte: O próprio autor, (2009)

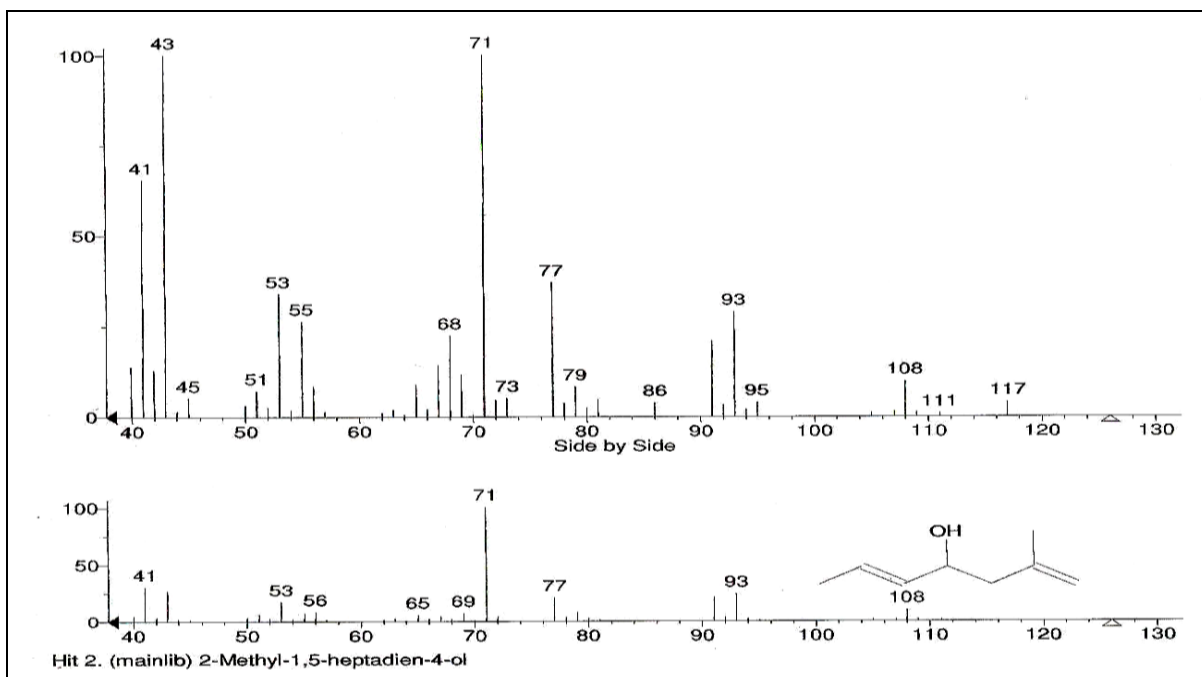
Anexo 20 – Óleo essencial recém – extraído do *Ocimum basilicum*.



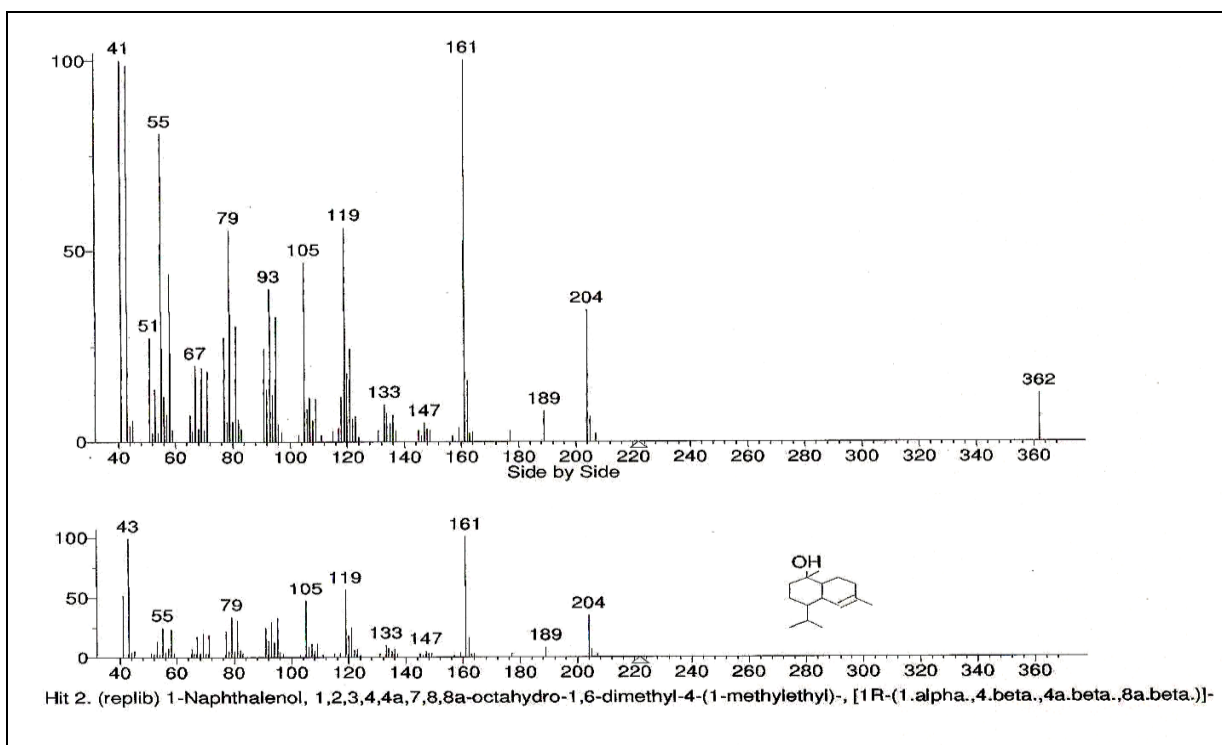
Anexo 21 – Cinética de extração do óleo essencial das partes aéreas frescas do *Ocimum basilicum*.



Anexo 22 – 4-metil-1(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol, proposta de identificação segundo o software AMDIS, para o pico 3 do cromatograma da figura 27A.



Anexo 23 – metil-heptadienol, proposta de identificação segundo o software AMDIS, para o pico 3 do cromatograma da figura 27B.



Anexo 24 – Proposta de identificação do cadinol, segundo o software AMDIS, e as Bibliotecas WILEY139 e NIST107 para o pico 6 do cromatograma da figura 27A e 27B.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)