



## AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE *Ocimum basilicum* CULTIVADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ADUBAÇÃO.

Ana Paula Cazangi Gonçalves<sup>1</sup>; Priscila Aparecida da Silva<sup>2</sup>; Maislian de Oliveira<sup>3</sup>; Lucia Elaine Ranieri Cortez<sup>4</sup>.

**RESUMO:** As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade e estão se tornando cada vez mais importantes em relação à saúde humana. A OMS estima que 65-80% da população que vive em países subdesenvolvidos, depende essencialmente de plantas medicinais como tratamento primário à saúde. A planta aromática *Ocimum basilicum* L., conhecida popularmente como Manjerição, possui propriedades antifúngicas, antibacteriana e antiinflamatória. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de Manjerição tem sido amplamente relatada, devido sua eficiência contra bactérias Gram-positivas. Tem sido utilizado na medicina tradicional no tratamento de dores de cabeça, tosse, diarreia, constipação, distúrbios hepáticos e também como inseticida. Diante do potencial farmacológico do *Ocimum basilicum* e da carência de informações sobre suas propriedades medicinais, busca-se com este trabalho obter melhor conhecimento quanto às atividades moluscicida, leshimânica, ansiolítica, anticonvulsivante e atividade microbiológica. O plantio foi realizado com diferentes adubações: Húmus de minhoca, NPK, além do canteiro controle. As mudas foram produzidas a partir de estacas de plantas sadias e foram cultivadas por cinco meses. Posteriormente as plantas serão medidas e depois cortadas para determinação do teor de matéria seca, fresca e rendimento do óleo essencial. O óleo essencial é extraído das flores e folhas pelo processo de destilação por arraste de vapor com duração de 3 horas. Os resultados obtidos até o momento, mostram que as diferentes adubações não interferiram no rendimento do óleo essencial extraído da planta. Já relacionando o óleo essencial obtido extraído-se das flores e folhas, pode-se observar que, as folhas apresentaram um rendimento médio inferior (0,50%), comparativamente as flores (0,75%). Espera-se com as análises posteriores, uma avaliação mais conclusiva quanto à interferência das condições de cultivo, quanto ao rendimento do óleo essencial e biomassa da planta, bem como, as diferentes atividades farmacológicas.

**PALAVRA-CHAVE:** *Ocimum basilicum*; Óleo essencial; Plantas aromáticas.

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso Farmácia. Departamento de Farmácia Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq-Cesumar (PIBICCesumar). anap\_cg@hotmail.com

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso Farmácia. Departamento de Farmácia Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC/CESUMAR. prix\_chris@hotmail.com

<sup>3</sup> Acadêmico do Curso Farmácia. Departamento de Farmácia Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. maislianma@hotmail.com

<sup>4</sup> Docente do CESUMAR. Departamento de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. luciaelaine@cesumar.br

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamentos, na prevenção, no tratamento e na cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais ocorre desde a antiguidade (KOROLKOVAS, 1996). Apesar dos grandes avanços da indústria farmacêutica, o interesse em terapias alternativas tem aumentado, especialmente aquelas que empregam drogas vegetais. A Organização Mundial da Saúde estima que 65-80% da população que vive em países em desenvolvimento, depende essencialmente de plantas medicinais como tratamento primário à saúde (CALIXTO, 2000). Além disso, aproximadamente 120 medicamentos utilizados na medicina são provenientes de plantas, enquanto que muitos outros fármacos são obtidos por semi-síntese de produtos vegetais ou por síntese baseada em moléculas vegetais precursoras. Segundo Farnsworth (1996), cerca de 75% da população mundial utilizam as plantas medicinais, na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável; deste total, pelo menos 30% deu-se por prescrição médica. Considera-se que 85% dos medicamentos são originados dos vegetais e aproximadamente 2/3 das plantas medicinais utilizadas pela indústria farmacêutica são obtidas por extrativismo nos países tropicais.

O gênero *Ocimum L.* compreende aproximadamente 50 espécies que se distribuem amplamente no mundo, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais. Originária da Ásia e Norte da África, mas com uma grande diversidade de espécies desse gênero também encontrada no Brasil. Os óleos essenciais de várias plantas do gênero *Ocimum* são empregados na indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (VIEIRA; SIMON, 2000). *Ocimum basilicum L.*, é uma planta aromática conhecida popularmente como manjeriço. Pertencente a família Lamiaceae, o *Ocimum basilicum* é uma planta perene, herbácea (0,50 a 0,80 m), ramosa, semi-ereta, que possui haste reta com muitas folhas verde-brilhante, oval-lanceoladas largas e flores brancas agrupadas em espiga. Adapta-se melhor aos solos argilo-arenosos ricos e úmidos, necessitando de iluminação plena. Seu plantio é feito diretamente no campo por sementes, estacas ou divisão de touceiras com espaçamento 0,4 x 0,7 m. (CORRÉA, BATISTA, QUINTAS, 2003).

São utilizadas as folhas e sumidades floridas. As folhas são colhidas pouco antes da floração, uma vez que nesse momento encontra-se a maior concentração do óleo essencial. Seu rendimento por destilação por arraste a vapor está em torno de 1,0% (ALONSO, 1999). A composição química do óleo essencial de *Ocimum basilicum* tem sido objeto de intensa investigação. Segundo ALONSO et al. (1999), o óleo essencial é composto por eugenol, estragol, linalol, lineol, alcanfor, cineol, cujos principais constituintes são linalol (40,5 a 48,2%) e metil-cavicol (estragol) (28,9 a 31,6%) (CHARLES; SIMON, 1990). Encontra-se ainda nesta planta flavonóides, taninos, saponinas entre outras (ALONSO, 1999).

Possui propriedades antifúngicas, antibacteriana, antiinflamatória. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de Manjeriço tem sido amplamente relatada, (WANNISSORN et al., 2005). Prasad et al. (1986) e Farag et al. (1989) ressaltam ainda que o óleo essencial obtido de *O. basilicum* e outras espécies de *Ocimum* são mais eficientes contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*) que contra bactérias Gram-negativas (*Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*). *Ocimum basilicum L.*, têm sido utilizadas na medicina tradicional no tratamento de dores de cabeça, tosses, diarreia, constipação, e distúrbios hepáticos e também com repelente de insetos (VIEIRA; SIMON, 2000).

Considerando a importância farmacológica de *Ocimum basilicum*, é necessário que se desenvolvam estudos direcionados os seus aspectos de cultivo, principalmente no que se refere à adubação, ao horário e época de colheita, procurando estabelecer as condições adequadas para uma melhor produção da planta e conseqüentemente seu teor de óleo essencial. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o rendimento do

óleo essencial, assim como as características físico-químicas e a análise da atividade microbiana, antifúngica, leshimânica, moluscicida, ansiolítica e anticonvulsivante, frente a diferenças quanto às condições de adubação.

## MATERIAL E MÉTODO

### 1 - Plantio das mudas de *Ocimum basilicum* :

Foram coletadas amostras de solo de canteiros com 9m<sup>2</sup> de área. Com bases nessas análises de solo foram determinadas as necessidades de calagem e adubação. A adubação foi feita com Húmus de minhoca e adubo mineral (NPK), quinze dias antes do plantio das mudas. As mudas de Manjeriço foram produzidas a partir de estacas cortadas de plantas sadias. As estacas foram colocadas em bandeja de plástico, contendo substrato comercial, e permaneceram no interior de estufa com irrigação diária, durante 70 dias, para enraizamento. Após esse período as mudas foram transferidas para local definitivo (canteiros), onde foram plantadas no espaçamento 0,4 X 0,7 m. foram empregados três tratamentos: com adubo orgânico húmus de minhoca e NPK além do tratamento controle. Após quatro meses as plantas foram medidas com régua graduada e depois serão cortadas a 10 cm de altura do solo para determinação do teor de matérias seca, fresca e rendimento do óleo essencial. Foram realizados tratamentos culturais (capinas, controle de pragas e doenças) conforme a necessidade da cultura.

### 2 - Métodos utilizados para extração do óleo essencial de *Ocimum basilicum*:

O óleo essencial foi extraído pelo processo de destilação por arraste de vapor. Após a extração será calculada a porcentagem de rendimento. Os dados coletados serão analisados através do programa de computador SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) da Universidade Federal de Viçosa. Serão analisados parâmetros físicos e químicos do óleo como a densidade, e análise cromatográfica por CCD.

### 3 - Métodos para avaliação da atividade moluscicida:

Será realizado com o óleo essencial de *Ocimum basilicum*. Para cada concentração será utilizados três caramujos *Biomphalaria glabrata* de tamanho uniforme. As amostras serão diluídas em água filtrada do aquário, sem cloro, com o auxílio de 100 µL de DMSO nas concentrações de 100; 50; 25; 10; 5,0; 2,5; 1,2; 0,6 e 0,3 ppm em temperatura ambiente. Cada caramujo ficará separadamente, em contato com 50 ml dessa solução. Será realizada uma prova em branco apenas com o DMSO e como controle positivo a niclosamida. Serão realizadas leituras em 6 e 24h e após esse tempo, serão observados os batimentos cardíacos por meio de uma lupa para verificar a mortalidade deles.

### 4 - Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana:

Os seguintes microorganismos serão utilizados: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Também serão utilizadas amostras de *S. aureus* penicilina-sensível e resistente, isoladas no Laboratório de Microbiologia. Culturas destas bactérias crescerão em caldo nutriente a 37 °C e mantidas em ágar inclinado a 45 °C.

### 5 - Ensaio antibacteriano

Os ensaios antibacterianos serão realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), segundo normas descritas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (Nccls) (1997). Os testes serão realizados em placas de 96 furos (ELISA), onde diluições seriadas em duplicata das amostras e antibióticos de referência serão preparadas usando caldo de Müeller-Hinton (CMH) para o crescimento respectivo de bactérias. Os óleos essenciais serão transferidos para as placas de microdiluição depois de dissolvidas em DMSO e caldo seletivo de crescimento bacteriano numa concentração inicial de 1000 µg/mL. Os inóculos bacterianos serão preparados nestes meios e a concentração

ajustada frente ao tubo 0,5 McFarland de turbidez padrão (108 unidades formadoras de colônia [UFC]/mL) e respectivamente diluídos 1:10 e 1:100 no caldo, para os procedimentos de microdiluição. Porções de 5 µL de cada suspensão bacteriana serão transferidas para todos os poços da placa de microdiluição os quais continham 100 µL da amostra ou do antibiótico de referência (controle). As placas serão incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após crescimento e leitura dos resultados em cada poço da placa serão adicionados 10 µL de um revelador de crescimento bacteriano - o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC). A concentração mínima inibitória (CMI), nestes ensaios, será considerada a menor concentração da amostra que impede visivelmente o crescimento microbiano. A concentração mínima bactericida (CMB) será determinada pela subcultura de 10 µL de cada poço negativo e do controle de crescimento positivo. A CMB será definida como a menor concentração que forneceu uma subcultura negativa ou apresentará somente uma colônia de crescimento.

#### 6 - Bioautografia

Serão utilizadas cromatofolhas de Silicagel GF254 (MERCK)- 20X20 cm com 0,2 mm de espessura. Serão aplicados 20µg/mL de amostras de óleo essencial e nistatina (N) 5µg/mL. Os cromatogramas serão desenvolvidos com a fase móvel A: Hexano: AcOEt: (90:10). As placas cromatográficas serão borrifadas com uma suspensão de esporos *Aspergillus niger*. Essa suspensão será preparada com 5mL de uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* a 10<sup>6</sup> esporos por mL adicionadas em 25mL de um meio de cultura glicose-sal mineral, adicionada de 0,0325g de penicilina. As placas serão mantidas em caixa de plástico lacrado a 28°C durante 70 horas. As zonas de inibição indicarão a ausência de fungos.

#### 7 - Métodos para avaliação da atividade anticonvulsivante:

Teste para convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol: uma hora após o tratamento com as diferentes preparações, os camundongos são injetados com pentilenotetrazol (PTZ, 80mg/kg, i.p.), e colocados em gaiolas de vidro para as observações. O tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração, a incidência e a severidade das convulsões são observadas e registradas até 30 minutos após a injeção de PTZ (Swinyard et al., 1952). A severidade das convulsões é avaliada pela escala de reatividade convulsiva proposta por Czuczwar & Frey (1986): (0) nenhum comportamento convulsivo, (2) crises crônicas sem perda do reflexo de endireitamento, (3) crises crônicas com perda do reflexo postural, (4) extensão tônica das patas posteriores e (5) extensão tônica com morte. Drogas que impedem essas convulsões ou aumentam a latência / diminuem a duração das mesmas correlacionam-se positivamente com drogas empregadas no tratamento das epilepsias do tipo crise de ausência em humanos. Para estes experimentos serão utilizados camundongos de ambos os sexos pesando entre 35 e 45 g (n=8, por grupo). Os animais serão divididos em três grupos diferentes: salina 0,9% (Grupo 1 – Controle), Diazepam 1mg/kg i.p. (Grupo 2), óleo essencial de *Ocimum basilicum* nas concentrações 100, 500, 1000 e 2000mg/kg (Grupo 3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo dos canteiros por estacas apresentou um desenvolvimento rápido. A aplicação de diferentes adubações interferiu no desenvolvimento da planta, pois, os canteiros adubados com húmus de minhoca e NPK apresentaram um desenvolvimento superior ao canteiro controle. Na extração do óleo essencial utilizou-se o processo de destilação por arraste de vapor. As extrações foram realizadas utilizando 100g de planta para 1 litro de água com duração de 3 horas para cada canteiro. Considerando as diferentes adubações, os valores obtidos em extrações até o momento se mostraram irrelevantes em relação ao rendimento do óleo essencial; Já relacionando as diferenças

dos valores obtidos da extração de flores e folhas, pode-se observar que as flores possuem um rendimento superior ao das folhas. Os valores obtidos das extrações realizadas oscilaram entre 0,4 e 0,5% para as folhas e 0,6 e 0,75% para as flores. Como citado anteriormente, neste trabalho também será realizado o ensaio moluscicida, avaliação da atividade antimicrobiana, bioautografia e atividade anticonvulsivante, não realizadas até o momento devido a intercorrências relacionadas ao projeto. Espero obter registros positivos sobre as propriedades farmacológicas da planta em questão. Espero também que a utilização de diferentes adubos orgânicos no cultivo do Manjeriço possa responder favoravelmente com um aumento do rendimento do óleo essencial e, que este, possa ser mais bem elucidado quanto suas características e, possivelmente, possa ser empregado em formulações farmacêuticas.

## CONCLUSÃO

Os canteiros adubados com húmus de minhoca e NPK apresentaram um melhor desenvolvimento, porém isto não interferiu no rendimento do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. Já relacionando as diferenças dos valores obtidos da extração de flores e folhas, pode-se observar que as flores possuem um rendimento superior ao das folhas. Os valores obtidos das extrações realizadas oscilaram entre 0,4 e 0,5% para as folhas e 0,6 e 0,75% para as flores.

## REFERÊNCIAS

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**. Buenos Aires: ISIS, 1999.

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

CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum* spp.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, n.3, p.458-462, 1990.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 6ª ed. Petrópolis: Vozes, 2003.

FARNSWORTH, N.R. Foreword. In: **Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health**. Editores: BALICK, M.J., ELISABETSKY, E., LAIRD, S.A. New York: Columbia University Press. p.9-10, 1996.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Rev.Bras. Farmacognosia**, São Paulo, v. 1, p. 1-7, 1996.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Econom. Bot.**, v.54, n.2, p.207-216, 2000.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233-236, 2005.