



---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE  
NANOEMULSÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum campechianum*  
Mill (ALFAVACA)**

FRANSCRISTHIANY SILVA SOUZA

São Luís - MA  
2023

FRANSCRISTHIANY SILVA SOUZA

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE  
NANOEMULSÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum campechianum*  
*Mill* (ALFAVACA)**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva

São Luís – MA  
MARÇO/2023

SOUZA, Franscrithiany Silva. **Perfil químico e potencial farmacológico de nanoemulsões do óleo essencial de *Ocimum campechianum* Mill (alfavaca)**. 2023. 130 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

## RESUMO

A espécie *Ocimum campechianum* (OC) é uma planta aromática rica em óleos essenciais (OEs) com comprovado efeito farmacológico. A sua aplicação de forma direta é limitada, devido às características inerentes aos OEs, como degradação, volatilidade e baixa solubilidade, sendo necessário aplicar tecnologias que preservem suas propriedades físicas e farmacológicas. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil químico, toxicidade e propriedades físico-químicas do óleo essencial de *Ocimum campechianum* (OEOC), além de produzir, caracterizar e avaliar o efeito antimicrobiano e antioxidante de suas nanoemulsões (NEs) óleo em água (O/A). A espécie vegetal foi coletada na zona rural da cidade de São Luís - MA (Brasil). O OE e voláteis das folhas de OC foram extraídos pelas técnicas de hidrodestilação (HD) e headspace estático (HS), respectivamente, e analisados por cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM e HS-CG/EM). As propriedades físico-químicas e toxicidade do OEOC foram determinadas. As NEs foram preparadas utilizando método de baixa energia de emulsificação por inversão de fases, com cada formulação composta por OEOC, tensoativo não iônico Tween 80 (T80) e água (H<sub>2</sub>O). Um planejamento fatorial (DCCR 2<sup>2</sup>) baseado em metodologia de superfície de resposta (MSR) foi empregado para otimizar as concentrações dos componentes, resultando em onze NEs. As NEs mais estáveis (NE4-OEOC e NE5-OEOC) foram selecionadas e avaliadas quanto à estabilidade por centrifugação, temperatura (4°C e 25°C), teste macroscópico e caracterização físico-química, incluindo o tamanho da gota, potencial zeta, índice de polidispersividade (PDI), pH, turbidez e morfologia por microscopia de força atômica (AFM). O OEOC e as NEs foram investigados quanto ao efeito antioxidante (método DPPH) e antimicrobiano (métodos de disco difusão e microdiluição em caldo) contra fungos (*Aspergillus Niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*) e bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp*). O perfil químico do OEOC revelou trinta e seis compostos e a fração volátil das folhas frescas vinte e quatro, sendo o eugenol (48,62% e 21,48%) e β-cariofileno (17,26% e 21,30%) os principais, respectivamente. O OEOC apresentou rendimento de 1,40%, aroma intenso de cravo, cor levemente amarelada e baixa toxicidade frente a *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> = 955 mg. L<sup>-1</sup>). As NEs selecionadas, NE4-OEOC e NE5-OEOC, mostraram estabilidade ao longo do tempo sem alterações significativas, evidenciadas nos testes macroscópicos, de centrifugação, temperatura (4°C e 25°C), morfologia esférica das gotas, além da caracterização físico-química com resultados iniciais de potencial zeta (-15,30 ± 0,40 mV e -6,86 ± 0,84 mV), tamanho de gota (115,97 ± 0,69 nm e 30,81 ± 5,56 nm), PDI (0,28 ± 0,00 e 0,15 ± 0,04) com características de distribuição de partículas monodispersas (< 0,3), pH (6,10 ± 0,01 e 5,61 ± 0,01) e turbidez (0,56 ± 0,00 a 0,15 ± 0,00), respectivamente. O OE nanoemulsionado, em ambas NEs, apresentou alta atividade antioxidante. Quanto à atividade antimicrobiana, revelou efeito bactericida frente às bactérias investigadas, exceto a formulação NE5-OEOC, com menor concentração de óleo essencial (1,98%), não inibiu a *Streptococcus mutans*; além de efeito fungicida contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Os resultados obtidos foram satisfatórios e sugerem que as nanoemulsões do óleo essencial de *Ocimum campechianum* têm potencial aplicação nas áreas farmacêutica, agrícola, cosmética e alimentícia como bioprodutos antimicrobianos e antioxidantes.

**Palavras-Chave:** Óleo essencial; *Ocimum campechianum*; Nanoemulsão; Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; CG/EM.

SOUZA, Franscristhiany Silva. **Chemical profile and pharmacological potential of nanoemulsions of *Ocimum campechianum* Mill (basil) essential oil.** 2023. 130 p. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luís, 2023.

## ABSTRACT

*Ocimum campechianum* (OC) is an aromatic plant rich in essential oils (EOs) with proven pharmacological effects. Its direct application is limited, due to the characteristics inherent to EOs, such as degradation, volatility, and low solubility, making it necessary to apply technologies that preserve their physical and pharmacological properties. This study aimed to evaluate the chemical profile, toxicity, and physicochemical properties of *Ocimum campechianum* essential oil (OEOC), in addition to producing, characterizing, and evaluating the antimicrobial and antioxidant effect of its oil-in-water nanoemulsions (NEs) (O/ A). The plant species was collected in the rural area of the city of São Luís - MA (Brazil). The EO and volatiles from the OC leaves were extracted by hydrodistillation (HD) and static headspace (HS) techniques, respectively, and analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS and HS-GC/MS). The physicochemical properties and toxicity of OEOC were determined. NEs were prepared using a low-energy phase inversion emulsification method, with each formulation composed of OEOC, non-ionic surfactant Tween 80 (T80), and water (H<sub>2</sub>O). A factorial design (DCCR 2<sup>2</sup>) based on response surface methodology (MSR) was used to optimize the concentrations of the components, resulting in eleven NEs. The most stable NEs (NE4-OEOC and NE5-OEOC) were selected and evaluated for stability by centrifugation, temperature (4°C and 25°C), macroscopic test and physicochemical characterization, including droplet size, zeta potential, polydispersity index (PDI), pH, turbidity and morphology by atomic force microscopy (AFM). OEOC and NEs were investigated for their antioxidant (DPPH method) and antimicrobial (disk diffusion and broth microdilution methods) effects against fungi (*Aspergillus Niger* and *Colletotrichum gloeosporioides*) and bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella sp.*). The chemical profile of the OEOC revealed thirty-six compounds and the volatile fraction of fresh leaves twenty-four, being eugenol (48.62% and 21.48%) and β-caryophyllene (17.26% and 21.30%) the main ones, respectively. The OEOC presented a yield of 1.40%, intense clove aroma, slightly yellowish color and low toxicity against *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> = 955 mg. L<sup>-1</sup>). The selected NEs, NE4-OEOC and NE5-OEOC, showed stability over time without significant changes, evidenced in macroscopic tests, centrifugation, temperature (4°C and 25°C), spherical morphology of the drops, in addition to physical-chemical characterization with results initial zeta potential (-15.30 ± 0.40 mV and -6.86 ± 0.84 mV), droplet size (115.97 ± 0.69 nm and 30.81 ± 5.56 nm), PDI (0.28 ± 0.00 and 0.15 ± 0.04) with distribution characteristics of monodisperse particles (< 0.3), pH (6.10 ± 0.01 and 5.61 ± 0.01) and turbidity (0.56 ± 0.00 to 0.15 ± 0.00), respectively. The nanoemulsified EO, in both NEs, showed high antioxidant activity. As for antimicrobial activity, it revealed a bactericidal effect against the bacteria investigated, except for the NE5-OEOC formulation with a lower concentration of essential oil (1.98%), which did not inhibit *Streptococcus mutans*; in addition to fungicidal effect against *Colletotrichum gloeosporioides*. The results obtained were satisfactory and suggest that nanoemulsions of *Ocimum campechianum* essential oil have potential application in the pharmaceutical, agricultural, cosmetic and food areas as antimicrobial and antioxidant bioproducts.

**Keywords:** Essential oil; *Ocimum campechianum*; Nanoemulsion; Antimicrobial activity; Antioxidant activity; GC/MS.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS.....	23
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	24
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	25
<b>2.3.1 Características Gerais</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.2 Mercado de óleos essenciais</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.3 Técnicas de extração de óleos essenciais e voláteis</b> .....	<b>28</b>
2.3.3.1 Destilação por arraste a vapor e hidrodestilação .....	28
2.3.3.2 Extração Headspace (fração volátil).....	29
<b>2.3.4 Identificação dos constituintes químicos por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)</b> .....	<b>31</b>
2.3.4.1 Cromatografia gasosa.....	31
2.3.4.2 Headspace acoplado a cromatografia gasosa e espectrometria de massa (HS-CG/EM).....	33
<b>2.3.5 Composição dos óleos essenciais</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.6 Toxicidade dos óleos essenciais</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3.7 Potencial farmacológico dos óleos essenciais</b> .....	<b>38</b>
2.4 A ESPÉCIE <i>Ocimum campechianum</i> Mill.....	41
<b>2.4.1 Composição Química do óleo essencial de <i>O. campechianum</i> Mill</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4.2 Potencial farmacológico do óleo essencial de <i>O. campechianum</i> Mill</b> .....	<b>45</b>
2.5 NANOTECNOLOGIA E ENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	47
<b>2.5.1 Nanoemulsões: aspectos gerais</b> .....	<b>48</b>
<b>2.5.2 Vantagens e aplicações das nanoemulsões de óleos essenciais</b> .....	<b>54</b>
<b>2.5.3 Diagrama de fases e planejamento experimental</b> .....	<b>55</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	57
<b>3.1.1 Material vegetal, reagentes, meios de cultura e antimicrobianos:</b> .....	<b>57</b>
<b>3.1.2 Equipamentos e acessórios</b> .....	<b>58</b>
3.2 MÉTODOS.....	58
<b>3.2.1 Local de coleta e identificação do material vegetal</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.2 Extração dos compostos voláteis das folhas de <i>O. campechianum</i></b> .....	<b>60</b>
3.2.2.1 Método de hidrodestilação .....	60
3.2.2.2 Método headspace estático e condições analíticas de extração dos voláteis.....	61
<b>3.2.3 Identificação dos constituintes químicos por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2.4 Caracterização físico-química do óleo essencial de <i>O. campechianum</i></b> .....	<b>63</b>
3.2.4.1 Densidade .....	63

3.2.4.2	Índice de refração .....	63
3.2.4.3	Solubilidade em etanol (70%) .....	63
3.2.4.4	Cor e aparência .....	63
<b>3.2.5</b>	<b>Ensaio de toxicidade do óleo essencial frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Quantificação de compostos fenólicos do óleo essencial de <i>O. campechianum</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Método de preparação de nanoemulsões de OEOC .....</b>	<b>64</b>
3.2.7.1	Teste preliminar para seleção do tensoativo.....	65
3.2.7.2	Obtenção de nanoemulsões aplicando um planejamento fatorial .....	66
3.2.7.3	Diagrama de fases ternário .....	67
<b>3.2.8</b>	<b>Estabilidade e caracterização física das nanoemulsões .....</b>	<b>67</b>
3.2.8.1	Avaliação macroscópica.....	67
3.2.8.2	Centrifugação .....	67
3.2.8.3	Teste de estabilidade térmica .....	67
3.2.8.4	Determinação do tamanho da partícula e índice de polidispersão (PDI) .....	68
3.2.8.5	Determinação do potencial zeta .....	68
3.2.8.6	Determinação do pH.....	68
3.2.8.7	Determinação da turbidez.....	69
3.2.8.8	Análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) .....	69
<b>3.2.9</b>	<b>Efeito farmacológico <i>in vitro</i> do OE e NE de <i>O. campechianum</i> .....</b>	<b>69</b>
3.2.9.1	Atividade antioxidante .....	69
3.2.9.2	Atividade antimicrobiana .....	71
3.2.9.2.1	<i>Método de Difusão em Disco (MDD)</i> .....	72
3.2.9.2.2	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração fungicida mínima (CFM)</i> .....	72
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
4.1	RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	75
4.2	AVALIAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS POR HEADSPACE.....	76
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE <i>OCIMUM CAMPECHIANUM</i> POR CG/EM E HS-CG/EM .....	78
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DO ÓLEO ESSENCIAL.....	85
4.5	OBTENÇÃO DAS NANOEMULSÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>OCIMUM CAMPECHIANUM</i> .....	86
<b>4.5.1</b>	<b>Ensaio preliminar para seleção do tensoativo .....</b>	<b>86</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Otimização da composição das nanoemulsões aplicando um planejamento fatorial.....</b>	<b>88</b>
4.5.2.1	Construção de diagrama de fases ternário .....	93
4.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES SELECIONADAS .....	94
<b>4.6.1</b>	<b>Testes macroscópico, de centrifugação e térmico.....</b>	<b>95</b>

<b>4.6.2 Avaliação do tamanho médio das gotículas, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta, pH e turbidez .....</b>	<b>96</b>
<b>4.6.3 Análise morfológica por microscopia de força atômica – AFM .....</b>	<b>98</b>
<b>4.7 TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL FRENTE a <i>Artemia salina</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO FARMACOLÓGICO DO OEOC E SUAS NES.....</b>	<b>102</b>
<b>4.8.1 Atividade antioxidante - Método DPPH .....</b>	<b>102</b>
<b>4.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....</b>	<b>104</b>
4.8.2.1 Microdiluição em disco (MDD) .....	104
4.8.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	106
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>127</b>