

**JOSIANE PADILHA DE PAULA**

**ESTUDO DA AÇÃO REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Ocimum selloi* BENTH CONTRA o *Anopheles braziliensis* CHAGAS**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten**

**PONTA GROSSA**

**2002**

Este trabalho é dedicado à minha irmã **Aurora** *in memoriam*.

## AGRADECIMENTOS

*“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”.*(Albert Einstein)

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten**, pela confiança em mim depositada, por abrir as portas que possibilitaram a melhoria do trabalho e acima de tudo pelo rigor científico em conduzir a realização desse trabalho.

À minha mãe **Anita** porque além do estímulo no dia-a-dia, desempenhou um papel imprescindível na realização do trabalho, reunindo e dessecando as plantas.

À amiga **Jeanine Margraf** que esteve presente em todos os momentos da realização do trabalho, ajudando na seleção da planta, nos muitos testes realizados para validação do método e também como voluntária para o teste de repelência.

Ao amigo **M.Sc. Paulo Vítor Farago** que também foi uma presença decisiva na realização do trabalho, ajudando em todas as etapas, dando importantes informações, dedicando horas nos testes preliminares e sofrendo com as picadas no teste final.

À pesquisadora **M.Sc. Maria Regina Gomes Carneiro** por ter dedicado tanto tempo me orientando na execução de testes que tanto engrandeceram o trabalho. Pela amizade que demonstrou em tão pouco tempo de convívio.

À pesquisadora **Rosangela Ribeiro de Carvalho** pela ajuda no teste de toxicidade aguda.

À coordenadora **Prof.ª Drª Célia Maria Da Lozzo Lopes** que esteve sempre ao nosso lado durante todo o curso do mestrado, e também no período de execução do trabalho, nos apoiando e não deixando que desanimássemos em nem um momento.

À professora **Prof.ª Drª Jocélia Jansen** por ter insistido no tema para o trabalho e pelo incentivo.

À **Prof.ª M.Sc Rosi Zaroni da Silva** por ter surgido nos momentos de dificuldade e apontado os caminhos para resolver os contratempos.

À **Prof.ª M.Sc Dionezine Navarro** que colaborou em muito na realização da cromatografia gasosa.

À **Prof.ª M.Sc Neiva Regina Borges Doroso** que de forma voluntariosa contribuiu na determinação do mosquito.

À **Prof.ª Drª Tiemi Miabikuro** pela contribuição na aplicação do teste estatístico.

Aos amigos e sócios **Marcia Viviane Venâncio** e **Eduardo Pietruchinski** que sempre me incentivaram e aceitaram a minha ausência para que o curso de mestrado e este trabalho pudessem ser realizado.

Ao amigo **Padre Paulo Antônio de Araújo** que nos levou ao local de realização do trabalho.

Àqueles que com muita presteza e paciência foram voluntários para o teste de repelência:

**Ângela Peniche, Solange Grobe, Estela Mara Nogueira da Rosa, Valcir Lima Santos, Dener Winderson Weber e Mauro Martins.**

À técnica do laboratório de farmacognosia, **Zeli Correa Pontes**, pela ajuda no início da extração do óleo essencial.

À pesquisadora **Dra Isabella Fernandes Delgado** pela sensibilidade com que nos acolheu no laboratório da Fiocruz durante o período de qualificação.

Às amigas bioquímicas **Ludmila Hilgenberg, Danielle Bilobran e Mackelly Simionatto**, que me substituíram no LAPAC.

Às secretárias da pós-graduação **Cléia Terezinha Michelis Nascimento e Terezinha Oliveira Melo.**

Ao **Departamento de Ciências Farmacêuticas** pela liberação e incentivo a realização deste curso de pós-graduação.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa.**

À **Fundação Oswaldo Cruz.**

À minha família **Joseli, Helena, Barbara, Christiano e Rubens**, que embora não tenham participado diretamente deste trabalho nunca estiveram ausentes.

E acima de tudo agradeço a **Deus** que me concedeu capacidade física, emocional e intelectual para realizar este trabalho, além de iluminar meu caminho em todos os momentos.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
ABSTRACT .....	ix
RESUMO .....	x
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MOSQUITOS .....	2
I.2 – REPELENTE DE INSETOS .....	6
I.3 – ÓLEOS ESSENCIAIS.....	8
I.4 – ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum selloi</i> .....	11
I.5 - TESTE DE MUTAGENICIDADE DE AMES.....	14
<b>II – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....</b>	<b>17</b>
<b>III - OBJETIVO DO TRABALHO.....</b>	<b>19</b>
<b>IV - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
IV. 1 - OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	20
IV. 2 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum selloi</i> .....	20
IV. 3 - ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	21
IV. 3.1 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA $_{20}d^{20}$ (F. BRAS. IV, 1988).....	21
IV. 3.2 - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO $^{20}n_D$ (F. BRAS. IV, 1988) .....	22
IV. 3.3 - DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EM ÁLCOOL (Ph. Helv. VII, 1990).....	22
IV. 4 – DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	22
IV. 4.2 - CROMATOGRAFIA CAPILAR DE ALTA RESOLUÇÃO ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS (GC/MS-MSD), DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	23
IV. 5 – INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE PARA PELE HUMANA: TESTE DE IRRITAÇÃO PRIMÁRIA.....	24
IV. 6 – AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA NÃO CLÍNICA .....	25
IV. 7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DE MOSQUITOS .....	29
<b>V - RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
V.1 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>O. selloi</i> .....	31
V.2 - ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	31
V.3 - DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	32
V.4 - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA NÃO-CLÍNICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	41
V.5- AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE: TESTE DE IRRITAÇÃO PRIMÁRIA EM PELE HUMANA .....	50
V.6- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE .....	51
<b>VI - DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
VI. 1 – DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. selloi</i> .....	53
VI. 2- ESTUDOS DE TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE .....	56
VI. 2- TESTE DE TOXICIDADE AGUDA .....	57
VI. 3- ESTUDO DA AÇÃO REPELENTE .....	58
VI. 4- CONCLUSÕES .....	59
<b>VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>VIII – ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL <i>O. SELLOI</i> .....	31
TABELA 2: VALORES DE RF DOS PADRÕES DISPONÍVEIS. ....	33
TABELA 3: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> , DETERMINADA POR GC/MS-MSD. ....	33
TABELA 4: TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> PARA A CEPA TA98 DE <i>S. TYPHIMURIUM</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SISTEMA EXTRÍNSECO DE ATIVAÇÃO METABÓLICA . ....	42
TABELA 5: POTENCIAL MUTAGÊNICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> AVALIADO EM ENSAIOS COM <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SISTEMA EXTRÍNSECO DE ATIVAÇÃO METABÓLICA . ....	44
TABELA 6: TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> . MORTALIDADE, LATÊNCIA PARA A MORTE, E QUADRO CLÍNICO APRESENTADO POR CAMUNDONGOS – MACHOS E FÊMEAS – TRATADOS POR ENTUBAÇÃO GÁSTRICA COM UMA ÚNICA DOSE DO ÓLEO ESSENCIAL DILUÍDO EM ÓLEO DE MILHO . ....	46
TABELA 7: ALTERAÇÕES DE PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS TRATADOS POR ENTUBAÇÃO GÁSTRICA COM UMA ÚNICA DOSE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> .....	48
TABELA 8: GANHO DE PESO CORPORAL EM RELAÇÃO AO DIA 0 DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS TRATADOS POR ENTUBAÇÃO GÁSTRICA COM UMA ÚNICA DOSE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> . ....	49
TABELA 9: PESO DOS ORGÃOS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS TRATADOS POR ENTUBAÇÃO GÁSTRICA COM UMA ÚNICA DOSE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> DILUÍDO EM ÓLEO DE MILHO . ....	50
TABELA 10: TESTE DE IRRITAÇÃO PRIMÁRIA EM PELE HUMANA . ....	51
TABELA 11: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DE SOLUÇÃO ETANÓLICA DO ÓLEO DE <i>O.SELLOI</i> A CONTRA O MOSQUITO <i>ANOPHELES BRASILIENSIS</i> . ....	52

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÊMEA DO GÊNERO <i>ANOPHELES</i> .....	3
FIGURA 2 - MACHO DO GÊNERO <i>ANOPHELES</i> , EM DESTAQUE AS ANTENAS PLUMOSAS.....	4
FIGURA 3 - FORMAÇÃO CABEÇA-CAUDA DOS COMPOSTOS MONO- E SESQUITERPENÓIDES .....	9
FIGURA 4 - FORMAÇÃO CABEÇA-CAUDA DOS COMPOSTOS FENILPROPANÓIDES.....	10
FIGURA 5 - <i>OCIMUM SELLOI</i> BENTH, SUMIDADES FLORIDAS .....	12
FIGURA 6 - FOLHAS DE <i>O.SELLOI</i> , DESTACANDO A FILOTAXIA.....	13
FIGURA 7 - INFLORESCÊNCIA DO <i>O. SELLOI</i> .....	13
FIGURA 8 - PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. SELLOI</i> E PADRÕES. .	32
FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSA DO ESTRAGOL .....	36
FIGURA 11- ESPECTRO DE MASSA DO CIS-ANETOL.....	37
FIGURA 12– ESPECTRO DE MASSA DO TRANS-ANETOL.....	38
FIGURA 13 – ESPECTRO DE MASSA DO COMPONENTE NÚMERO 4.....	39
FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPONENTE NÚMERO 5.....	39
FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSA DO COMPONENTE NÚMERO 6.....	40
FIGURA 16 – ESPECTRO DE MASSA DO COMPONENTE NÚMERO 7.....	40



## ABSTRACT

*Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae), also known as “alfavaca”, is an herbal plant native to Brazil. The essential oil obtained from its leaves has been used as a flavoring additive in foods, dental and oral products, and as an ingredient of fragrances. In the Brazilian traditional medicine *O. selloi* has been widely employed as an anti-inflammatory and anti-spasmodic remedy and, also, to treat diarrhea. The main objective of the present study was to evaluate the mosquito repellent activity and skin irritant potential of *O. selloi* oil in humans. Furthermore, data were also provided on the toxicological profile (acute oral toxicity to mice and mutagenicity in the Ames’ test), and on the physicochemical properties as well as on the chemical constituents of the essential oil of *O. selloi* grown in Ponta Grossa, Paraná state. The essential oil was obtained by hydro-distillation of *O. selloi* leaves. Chemical constituents were determined by Thin Layer Chromatography (TLC) and GC-MS/MSD. The main chemical constituents of the volatile oil analyzed by GC-MS/MSD were estragole (55,38%) and *trans*-anethole (34,23%). The *O. selloi* oil proved to be acutely toxic and lethal to mice (females more susceptible than males) at doses equal to or higher than 1500 mg/kg body wt. No mutagenicity was found in *in vitro* assays with *Salmonella thyphimurium* tester strains TA97a, TA98 and TA100, without and with addition of S9 mixture. No skin irritancy was noted in the forearms of 30 volunteers exposed to *O. selloi* oil for 4 hours. In a field study in which six volunteers (each individual is his own control) were exposed to *Anopheles brasiliensis* for 30 minutes, *O. selloi* (10% w/v solution in ethanol) drastically reduced the frequency of bites as compared to ethanol alone (reduction of 88%,  $P=0,01$ ) thereby proving to be an effective mosquito repellent.

**Key words:** *Ocimum selloi*, repellent, *Anopheles brasiliensis*, estragole, anethole.

## RESUMO

O *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae), também conhecida como “alfavaca”, é uma planta herbácea que ocorre no Brasil. O óleo essencial obtido das suas folhas tem sido usado como aditivo aromatizante em alimentos, produtos odontológicos e como ingrediente de fragrâncias. Na medicina popular brasileira, o *O. selloi* tem sido amplamente empregado como remédio antiinflamatório e antiespasmódico e, também, para tratar diarreia. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade repelente de mosquitos e o potencial de irritação dérmica do óleo de *O. selloi* em voluntários. Além disso, foram obtidos também dados sobre o perfil toxicológico (toxicidade aguda oral data e mutagenicidade no teste de Ames), e sobre as propriedades físico-químicas e constituintes químicos do óleo essencial do *O. selloi* coletado em Ponta Grossa, estado do Paraná. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação de folhas de *O. selloi*. Os constituintes químicos foram determinados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e GC-MS/MSD. Os principais constituintes do óleo volátil analisado por GC-MS/MSD foram o estragol (55,38%) e o *trans*-anetol (34,23%). O óleo de *O. selloi* foi agudamente tóxico e letal para camundongos (fêmeas mais susceptíveis que machos) em doses iguais ou superiores a 1500 mg/kg de peso corporal. Não foi observada atividade mutagênica em ensaios *in vitro* com as linhagens de *Salmonella thyphimurium* TA97a, TA98 e TA100, sem e com adição de mistura S9. Não foi constatada irritação dérmica no antebraço de 30 voluntários expostos ao *O. selloi* por 4 horas. No estudo de campo em que seis voluntários (cada indivíduo é seu próprio controle) foram expostos *Anopheles brasiliensis* por 30 minutos, o *O. selloi* (solução 10% p/v em etanol) reduziu drasticamente a frequência de picadas em relação ao etanol (redução de 88%,  $P=0,01$ ) demonstrando que é um repelente eficaz.

**Palavras-chave:** *Ocimum selloi*, repelente, *Anopheles brasiliensis*, estragol, anetol.

## I – INTRODUÇÃO

As plantas têm sido fonte profícua de fármacos e, em menor escala, de inseticidas. Os princípios ativos responsáveis por essas atividades são, via de regra, moléculas originárias do metabolismo secundário que desempenham funções importantes na interação do vegetal com ambiente, tais como protegê-lo de doenças causadas por microrganismos (*e.g.* fungos e bactérias), repelir insetos e outros predadores, e atrair espécies úteis (*e.g.* insetos polinizadores) (Verpoorte, 1998).

Neste contexto, não surpreende que um grande número de espécies vegetais encontre uso popular como inseticida e repelente de mosquitos. O uso tradicional não garante que determinada espécie seja realmente efetiva e segura, mas o conhecimento etnobotânico constitui certamente um excelente ponto de partida para uma triagem de atividade inseticida e/ou repelente. A triagem de produtos naturais tem recebido a atenção de pesquisadores em todo o mundo, mas parece ser particularmente importante - no âmbito da Saúde Pública - para os países em desenvolvimento. Como muitas doenças transmitidas por insetos (*e.g.* malária, dengue, febre amarela, leishmaniose, doença de Chagas, *etc*) são endêmicas em países do Terceiro Mundo, a busca de inseticidas e repelentes de origem botânica tem sido impulsionada pela necessidade de descobrir novos produtos que sejam eficazes, seguros e mais baratos que os atuais.

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae) compreende 160 espécies que se distribuem amplamente no mundo, nas regiões tropicais e subtropicais. Uma grande diversidade de espécies desse gênero é encontrada no Brasil. Os óleos essenciais de várias espécies do gênero *Ocimum* são empregados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (Martins, Casali, Barbosa & Carazza, 1997).

A propriedade repelente de óleos essenciais de várias plantas, incluindo algumas espécies de *Ocimum*, tem sido investigada nos últimos anos. Entre as espécies desse gênero

que já foram estudadas quanto à atividade repelente, encontramos o *O. americanum* e o *O. suave*. Em relação ao *O. selloi* não encontramos na literatura consultada qualquer estudo que tivesse investigado a sua possível atividade repelente. Os dados existentes sobre essa espécie são de um modo geral escassos, havendo apenas informações originárias de estudos fitoquímicos do seu óleo essencial.

## **I.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MOSQUITOS**

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem díptera que possuem, na forma adulta, um par de asas funcionais e um par de asas vestigiais. A ordem díptera é uma das maiores entre os insetos, com mais de 2500 espécies encontradas em quase todas as regiões do mundo (Flore, 2000), exceto na Antártica (Fradin, 1998). As zonas tropicais são as que apresentam a maior quantidade e variedade de mosquitos incluindo espécies com diferentes hábitos alimentares, *i.e.* de nectarígenos à hematófagos. Os mosquitos pertencem a vários gêneros, quatro dos quais (*Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Lutzomyia*) se destacam por apresentar grande importância médica.

Todos os mosquitos têm quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto, sendo que os estágios larval e pupal ocorrem na água. A postura dos ovos pode ser dividida em três categorias em função das características do processo de oviposição. Os mosquitos do gênero *Anopheles* colocam seus ovos de forma isolada diretamente na água onde flutuam na superfície líquida. As fêmeas do gênero *Culex* põem os ovos em conjunto, formando jangadas, na superfície líquida. Os do gênero *Aedes* depositam ovos fora do meio líquido, mas de forma a permitir que a larva alcance facilmente a água. Este último gênero - de importância na transmissão da febre amarela urbana e da dengue - possui dispositivos que conferem resistência à dessecação, permitindo que os ovos permaneçam viáveis por longo

período de tempo, antes de alcançarem o meio líquido. No meio líquido, os ovos transformam-se em larvas. As larvas formadas se alimentam de material orgânico ou de microrganismos presentes na água. Esse estágio dura, em condições normais, de oito a dez dias. Após esse estágio, as larvas se transformam em pupas e, dentro de dois a três dias, sofrem uma metamorfose para mosquito adulto (Forattini, 1962).

No calor dos meses de verão, a larva rapidamente se transforma em pupa, que emerge como mosquito adulto uma semana mais tarde. Os mosquitos adultos acasalam e posteriormente as fêmeas hematófagas (Figura 1) procuram alimento (sangue) para obter a proteína necessária ao desenvolvimento dos ovos (Sutherland & Crans, 2001). O período de incubação dos ovos é variável entre as espécies e depende da temperatura e, em menor escala, de outros fatores externos. A incubação dos ovos do *Culex* dura de um dia a um dia e meio, à temperatura de 23° C. O *Anopheles* apresenta um período de incubação de dois dias, enquanto no caso do *Aedes* a incubação dura cinco dias.



**Figura 1** - Fêmea do gênero *Anopheles*

Fonte: (<http://www.howstuffworks.com>)

No inverno, a maioria das espécies de mosquito sobrevive no estágio de ovo, esperando a primavera, quando as águas aquecem e os ovos eclodem. Apenas algumas espécies importantes passam o inverno na fase adulta (Sutherland & Crans, 2001).

Os machos diferem das fêmeas por possuírem antenas plumosas (Figura 2) e por não apresentarem a capacidade de picar a pele (Flore, 2000). O macho, portanto não se alimenta de sangue, mas do néctar das plantas e vive por muito pouco tempo após o acasalamento (Sutherland & Crans, 2001). As fêmeas conseguem ingerir, em um único repasto, uma quantidade de sangue equivalente a uma vez e meia a duas vezes o seu próprio peso (Forattini, 1962).



**Figura 2** - Macho do gênero *Anopheles*, em destaque as antenas plumosas

Fonte: <http://www.ulb.ac.Br/science/biodic/imdiptere002.html>

O gênero *Anopheles* é de grande importância médica por pertencerem a ele vários mosquitos transmissores da malária humana. Aproximadamente 24 das cerca de 400 espécies do gênero *Anopheles* são consideradas como potenciais vetores da malária (<http://www.bioscis.ohio-state.edu/~parasite/anopheles.html>).

Os mosquitos e outros insetos transmissores de doenças localizam os indivíduos a serem picados, as plantas e os locais de oviposição detectando sinais químicos e físicos por meio de receptores sensoriais presentes em suas antenas.

A escolha do sítio de oviposição parece ser, até certo ponto, espécie-específica. Existem indicações de que produtos do metabolismo de bactérias e fungos sejam os agentes responsáveis pela atração dos mosquitos pelos sítios de oviposição. Os ovos colocados por fêmeas da espécie *Culex quinquefasciatus*, por exemplo, produzem um ferormônio capaz de atrair outras fêmeas grávidas da mesma espécie.

Também é de vital importância a localização da planta e do alimento, pois tanto a nutrição da larva, quanto à alimentação do macho adulto com o néctar são necessárias para estabelecer e manter a reserva nutricional adequada.

Alguns componentes atrativos já foram identificados. O ácido láctico é um produto metabólico comum a todos os animais, incluindo o homem. A detecção do ácido láctico é claramente importante para o mosquito fêmea que o utiliza para localizar o alimento (sangue). Merece destaque o fato de que mosquitos *A. aegypti* de ambos os sexos detectam e são atraídos pelo ácido láctico, porque essa espécie acasala sempre nas proximidades do indivíduo a ser picado (Davis & Bowen, 1994).

Testes realizados com a amônia mostraram que existe um sinergismo entre a amônia e o ácido láctico. Quando essas substâncias foram testadas isoladamente foi observada uma clara preferência do mosquito pelo ácido láctico, enquanto a combinação da amônia e do ácido láctico apresentou-se significativamente mais atrativa (Geier *et al.*, 1999) do que as duas substâncias isoladamente.

O dióxido de carbono também atua como um guia do mosquito em direção ao indivíduo a ser picado. Esta orientação é o resultado de quimiotaxia e anemotaxia optomotora. Desta forma, o dióxido de carbono age como um atraente de mosquitos, porém menos poderoso que outros fatores encontrados no indivíduo. O gás carbônico tem um efeito

importante quando combinado a outros fatores presentes no indivíduo a ser picado, aumentando a resposta às correntes de convecção, aos fatores visuais próximos ao alvo e à resposta ao odor à distância (Gilles, 1980).

Sabe-se também que a temperatura e a umidade estão fortemente relacionadas à atração dos mosquitos, pois o ar quente e úmido atrai mosquitos de forma mais eficiente do que o ar quente e seco.

Outro fator de orientação dos mosquitos no ambiente é a luz. A reação do mosquito à luz varia conforme a espécie, de forma que a luz pode guiar o culicídeo para o seu abrigo ou estimular suas atividades, como a hematofagia. Assim, de um modo geral, os mosquitos com hábito diurno tendem a picar em ambientes iluminados e aqueles que apresentam hábito noturno picam mais facilmente em ambientes escuros (Forattini, 1962).

Os mosquitos têm, portanto muitas ferramentas que permitem selecionar os locais para oviposição, os alimentos e o indivíduo a ser picado, garantindo a sua sobrevivência e tornando-o um eficiente transmissor de doenças para o homem e outras espécies (Davis & Bowen, 1994).

As doenças transmitidas por mosquitos, como a febre amarela e a malária, têm assombrado civilizações por milhares de anos (Sutherland & Crans, 2001). Estima-se que, no mundo todo, os mosquitos transmitem doenças para mais de 700.000.000 de pessoas a cada ano (Fradin, 1998).

## **I.2 – REPELENTE DE INSETOS**

Historicamente, entre as estratégias voltadas para reduzir a incidência de doenças transmitidas por mosquito, tem se destacado o controle do *habitat* (por meios químicos e biológicos) e o uso de repelentes para a proteção individual (Fradin, 1998).



Os repelentes de mosquitos podem ser aplicados diretamente sobre a pele ou em roupas e são comercializados em várias formas e apresentações tais como aerossóis, cremes, loções, bronzeadores, pós, entre outras.

Considera-se que o repelente ideal deve apresentar as seguintes características: 1) tempo de ação prolongado; 2) grau de volatilidade ótimo, *i.e.* volatilidade suficiente para manter a concentração alta no ar próximo a pele, sem, contudo permitir que a substância repelente se dissipe rapidamente; 3) efetividade contra uma ampla variedade de mosquitos; 4) não ser tóxico ou irritante à pele após aplicação tópica ou aplicação nas roupas; 5) odor agradável ou ser inodoro; 6) não promover alterações nas roupas (Brown & Herbert, 1997).

Até o momento, infelizmente, não há repelentes que atendam plenamente a todos estes requisitos (Debboun *et al.*, 1999).

Os repelentes conhecidos não compartilham um modo de ação único e, surpreendentemente, muito pouco se sabe a respeito da ação dos repelentes sobre os seus alvos, os mosquitos (Fradin, 1998). Aparentemente, os repelentes conhecidos não camuflam os fatores atrativos que emanam da pele, mas fazem com que os mosquitos retornem quando se aproximam a uma distância inferior a quatro centímetros da pele (Brown & Herbert, 1997).

O repelente mais estudado até agora é o DEET (N, N-dietil metilbenzamida ou N,N, dietil *m*-toluamida). Dogan *et al.* (1999) mostraram que o DEET não atua exatamente como um repelente, mas como um inibidor da atração causada pelo ácido láctico.

Muitos estudos têm sido feitos para identificar novas substâncias que possam ser utilizadas como agentes repelentes, já que existem controvérsias no que diz respeito à segurança do uso do DEET. Embora muitos autores defendam a utilização do DEET, outros o consideram alvo de críticas em virtude da ocorrência de casos de encefalite associados ao seu uso.

Partindo do conhecimento de que as plantas repelem naturalmente os mosquitos, como foi inicialmente observado com o piretro, obtido do crisântemo, uma grande variedade de vegetais tem sido testada com relação ao seu potencial repelente (Fradin, 1998). A triagem de produtos repelentes de origem botânica tendo sido feita a partir de extratos da planta inteira ou de partes específicas desta, como folhas, frutos, flores, raiz e casca (Sukumar, *et al.*, 1991).

Por conterem substâncias que repelem insetos, as plantas podem ser vistas como fontes promissoras de repelentes a serem usados na prevenção de doenças transmitidas por mosquitos.

### **I-3 - ÓLEOS ESSENCIAIS**

Os óleos essenciais das plantas são misturas complexas de constituintes voláteis que conferem aromas e sabores característicos. À temperatura ambiente, os óleos essenciais (ou voláteis) apresentam-se como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que os diferencia dos óleos fixos. De uma maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (Simões *et al.*, 1999).

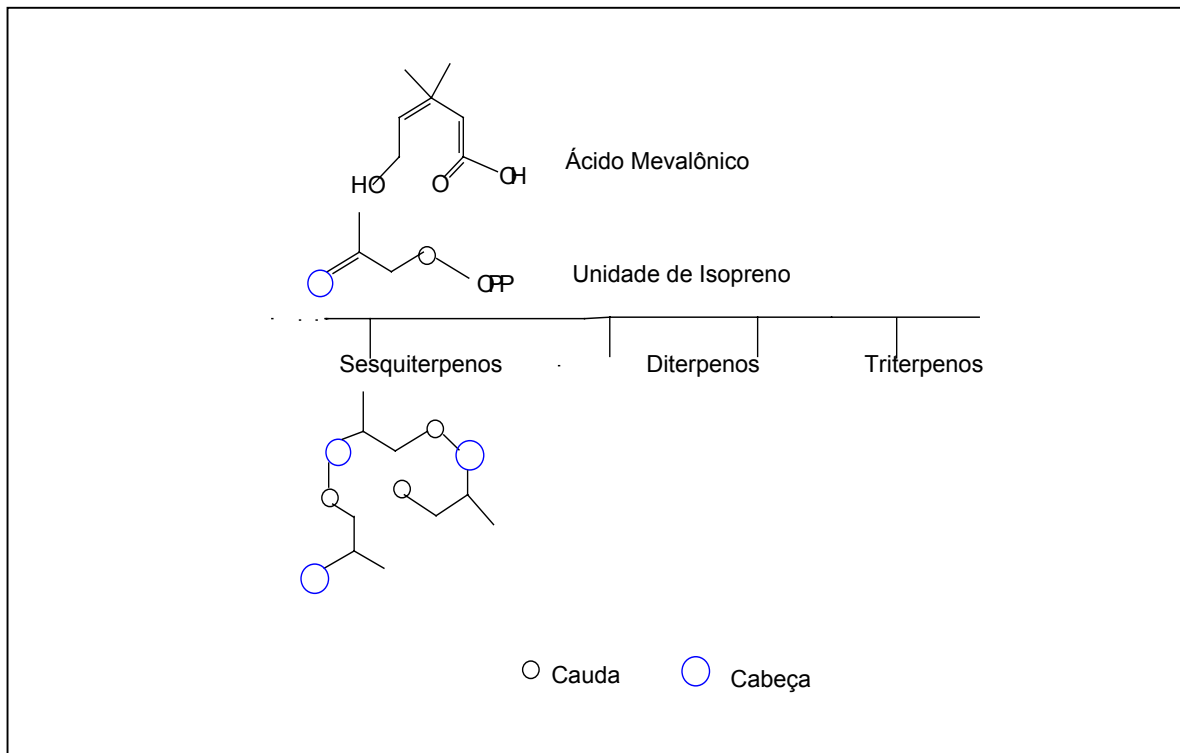
Os óleos essenciais são, na maioria dos casos, incolores ou ligeiramente amarelados. Alguns óleos, entretanto, tem outras cores, como é o caso do óleo volátil da camomila, que é azulado em decorrência de seu alto teor de azuleno.

Os óleos essenciais são freqüentemente obtidos por arraste de vapor produzido pelo processo de ebulição da água contendo o material botânico intacto ou grosseiramente pulverizado. O material volátil é arrastado pelo vapor d'água e posteriormente separado por decantação (Bruneton, 1991).

A composição química dos óleos essenciais varia muito, incluindo terpenos (monoterpenos e outros terpenos), hidrocarbonetos, ou com funções álcool, cetona, aldeído,

éter, óxido, éster e outras. É comum encontrarmos óleos voláteis contendo mais de 200 constituintes, sendo um predominante e os demais aparecendo como elementos-traço. Esses componentes, mesmo representando apenas traços, têm importância fundamental no aroma. É importante destacar que plantas de uma mesma espécie, quando cultivadas em diferentes partes do mundo, apresentam óleos essenciais via de regra com a mesma composição qualitativa, porém diferindo nas proporções dos seus constituintes, o que certamente terá efeito sobre seu aroma (Robbers, *et al.*, 1996).

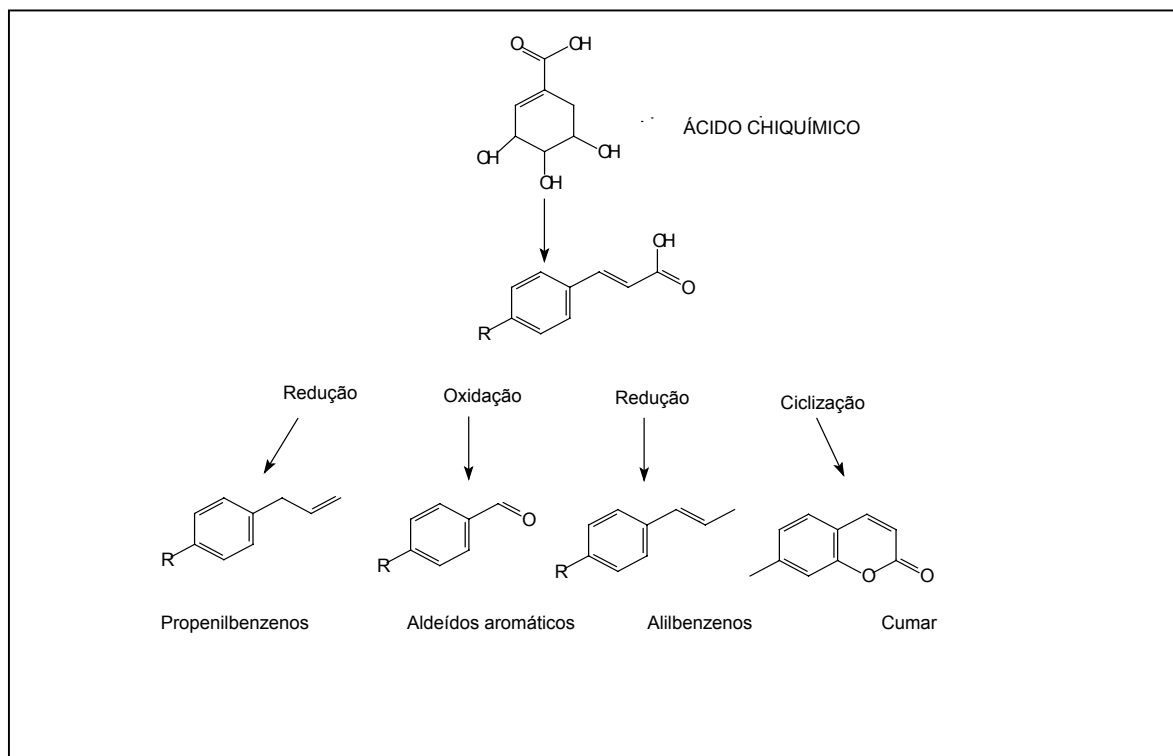
Muitos óleos essenciais são constituídos de uma variedade de compostos terpenóides, sintetizados a partir da unidade isoprênica ( $C_5H_8$ ) ou hemiterpeno, que por sua vez origina-se do ácido mevalônico. Através da condensação de unidades pentacarbonadas ocorre a formação de outros compostos terpênicos: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ); sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ); diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ); triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ); tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) (Figura 3).



**Figura 3** - Formação cabeça-cauda dos compostos mono- e sesquiterpenóides

Fonte: Simões, et al. 1999

Além dos terpenóides, os óleos essenciais contêm também os fenilpropanóides. Fenilpropanóides são compostos formados a partir do ácido chiquímico que origina os ácidos *p*-cumárico e cinâmico. Estas duas unidades básicas sofrem reações de redução formando os compostos propenilbenzeno e alilbenzeno; reações de oxidação produzindo aldeídos aromáticos; e reações de ciclização gerando as cumarinas (Figura 4) (Simões *et al.*, 1999).



**Figura 4** - Formação cabeça-cauda dos compostos fenilpropanóides

Fonte: Simões, *et al.* 1999.

Até o momento, foram identificados mais de 1000 compostos monoterpênicos de ocorrência natural. Eles se caracterizam por sua volatilidade e odor acre intenso. Os monoterpênicos podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos.

Entre os principais representantes dos monoterpênicos podemos citar a cânfora, o cineol ou eucaliptol, o mentol, o terpineol, o terpineno, o citral, o citronelal, o pineno e o timol; entre os sesquiterpênicos, o azuleno e o alfa-bisabolol; como exemplo de diterpenóide, destacam-se os gincólídeos e o taxol; entre os triterpenóides, o limonóide, que tem ação antipicada; e,

finalmente, entre os tetraterpenóides ou carotenóides, que são responsáveis em muitos casos pelas cores amarelas, laranja e vermelha encontradas na natureza, merece destaque o beta caroteno (Robbers, Speedie & Tyler, 1996).

#### **I.4 – ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum selloi***

O *Ocimum selloi* (Figura 5) é uma espécie herbácea, perene, de até 1,20 m de altura, que floresce durante o ano todo. O *O. selloi* apresenta caule quadrangular característico, folhas pecioladas, opostas, ovada, com margem serrilhada, ápice acuminado e base atenuada, medindo até 5 cm de comprimento por até 2,5 cm de largura (Figura 6). A inflorescência é uma espiga terminal com flores roxas (Figura 7). Esta planta pertence à família das Lamiaceae, de importância fitoquímica reconhecida devido à variedade dos óleos essenciais encontrados em suas espécies (Mohry, 1973). O *O. selloi* é conhecido popularmente como alfavaca (Mohry, 1973), anis-do-campo, erva-doce-silvestre, alfavaca-do-mato, hortelã-brava (Marquesini, 1995) e o seu cultivo é fácil e rápido podendo a propagação ser obtida por estaquia.

A quantidade e a qualidade do óleo essencial encontrado na planta depende da época do ano em que foi realizada a coleta, bem como da espécie em questão. Algumas espécies de *Ocimum* apresentam como componentes principais o linalol, o estragol e o eugenol, e como componentes secundários o *o*-cimeno, o cineol, o linalol, o cinamato de metila, e outros (Alonso, 1998).



**Figura 5** - *Ocimum selloi* Benth, sumidades floridas

Estudos etnobotânicos realizados com o *O. selloi* revelaram que esta planta é utilizada na medicina popular com várias finalidades. Por via oral, é usada como digestivo, e para tratar gastrite, vômitos, tosse, bronquite, e outras condições. O *O. selloi* é empregado também topicamente para aliviar dores nas pernas (Paneesa, 1997). Além do uso medicinal, algumas espécies do gênero *Ocimum* são utilizadas também como tempero no Brasil (Teske & Trentini, 1995).





**Figura 6:** Folhas de *O. selloi*, destacando a filotaxia



**Figura 7 -** Inflorescência do *O. selloi*

Diversos trabalhos têm evidenciado que espécies do gênero *Ocimum* são usadas contra mosquitos, e para proteger cereais armazenados contra insetos (Cutis *et al.*, 1991; Singh & Upadhyay, 1993).

Não encontramos na revisão da literatura (base de dados MEDLINE e TOXLINE), estudos toxicológicos não clínicos (*e.g.* toxicidade de dose única e de doses repetidas, mutagenicidade, toxicologia reprodutiva), bem como dados sobre o potencial de irritação primária referentes ao óleo de *O. selloi*. Portanto, apesar do emprego popular desta espécie, e de outras do mesmo gênero, com várias finalidades, não há informações que permitam avaliar até que ponto estes usos são seguros.

## **I.5 - TESTE DE MUTAGENICIDADE DE AMES**

Os estudos preditivos do potencial mutagênico de produtos naturais têm tido um extraordinário desenvolvimento nos últimos 30 anos. Neste contexto, um dos ensaios mais empregados é o teste de Ames (*Salmonella*/microsoma). O teste de mutagenicidade proposto por Ames utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* e integra, via de regra, a primeira etapa da avaliação do risco mutagênico decorrente da exposição a xenobióticos. Esse ensaio objetiva avaliar o potencial de uma substância química, e / ou seus metabólitos, interagir com o DNA e induzir mutações gênicas. Em princípio, substâncias que provocam alterações no genoma de organismos procariotos podem também ocasioná-las no genoma humano, porque a estrutura primária do DNA é a mesma em todos os organismos vivos.

O teste é realizado em uma ou mais cepas de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de um sistema extrínseco de metabolização de xenobióticos (*e.g.* fração microsomal hepática). Nos mamíferos os xenobióticos sofrem várias reações de biotransformação, geralmente tornando moléculas originalmente lipofílicas em metabólitos mais hidrossolúveis e, portanto mais facilmente elimináveis do organismo (processo de desintoxicação).



Paradoxalmente a biotransformação pode tornar moléculas originalmente pouco reativas em moléculas altamente reativas e tóxicas. Isto ocorre quando a biotransformação converte compostos quimicamente inertes em metabólitos eletrofilicos, capazes de interagir com sítios nucleofílicos do DNA ou outras macromoléculas (ativação metabólica). As bactérias não apresentam a maioria das enzimas envolvidas nos processos de ativação metabólica que ocorrem nos mamíferos. Portanto, para que esses ensaios em procariotos sejam preditivos, isto é, possam detectar substâncias potencialmente mutagênicas para o homem, é importante que um sistema extrínseco de ativação metabólica seja adicionado ao meio de incubação (Gomes-Carneiro, 1997).

O ensaio baseia-se na indução de mutações reversas em cepas de *S. typhimurium* incapazes de sintetizar histidina (auxotróficas para histidina ou his<sup>-</sup>), que voltam ao estado prototrófico selvagem ou his<sup>+</sup> (sintetizam o aminoácido). Essas cepas detectam mutações de ponto (ocasionadas pela substituição de 1 par de bases) ou de 'deslocamento do quadro de leitura' ('*frameshift*', i.e. mutações decorrentes da adição ou deleção de um ou mais pares de bases). Cada cepa contém um tipo de mutação em um dos vários genes que comandam a síntese de histidina, e não podem crescer quando este aminoácido não está presente no meio. Quando a substância testada e / ou seus metabólitos interagem com o DNA bacteriano, o efeito da mutação pré-existente (em relação à cepa selvagem) é revertido, ou seja, ocorre uma mutação que permite que a bactéria recupere a capacidade de sintetizar histidina (Maron, & Ames, 1983; Gomes-Carneiro, 1997).

As diferentes mutações do *operon* histidina revertidas por compostos mutagênicos são:

**Cepa TA98** - detecta substâncias que causam mutações do tipo *frameshift*, revertendo a mutação pré-existente *hisD3052* no gene *hisD*, que por sua vez codifica a síntese da enzima histidinol desidrogenase que participa da biossíntese da histidina. Detecta mutágenos do tipo *frameshift*, restaurando a leitura correta da fita do *DNA* envolvida na síntese de histidina;

**Cepa TA100** - possui a mutação *hisG46* no gene *hisG* que codifica a primeira enzima da biossíntese da histidina. Essa mutação é revertida pela substituição do par de bases intermediário da trinca GGG/CCC, que codifica o aminoácido prolina, pelo par de bases A/T, restituindo a trinca original GAG/CTC que codifica a leucina.

Além dessas mutações, ambas as linhagens exibem características genóticas adicionais que aumentam, em muito, a sensibilidade do ensaio em detectar mutágenos, como a mutação *rfa*, mutação *uvrB* e plasmídeo pKM101. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica, aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana à moléculas grandes. A mutação *uvrB* é uma deleção do gene que codifica uma das enzimas envolvidas no sistema de reparo do DNA por excisão. Por razões técnicas esta deleção estendeu-se até o gene que codifica a biotina, sendo as bactérias *uvrB* biotina-dependentes (Maron & Ames, 1983). O plasmídeo pKM101, introduzido nas cepas de *S. typhimurium* além de carrear um gene que confere resistência à ampicilina, aumenta também a susceptibilidade à mutagênese (Gomes-Carneiro, 1997).

## II – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Repelentes de mosquitos são produtos de interesse para o conforto de indivíduos que vivem ou entram em áreas com alta densidade destes insetos e, principalmente, por questões sanitárias. Os repelentes podem ajudar a prevenir reações alérgicas, em indivíduos com hipersensibilidade a picada de mosquitos, e são produtos úteis na prevenção de várias doenças transmitidas por mosquitos (*e.g.* malária, dengue, febre amarela, encefalites e outras). Do ponto de vista da Saúde Pública, pode-se dizer que os repelentes, assim como os mosquiteiros, são armas complementares aos inseticidas e a outros meios de combate focal e aéreo aos mosquitos, às vacinas contra as doenças, e aos tratamentos farmacológicos profiláticos e curativos. No caso de doenças em relação às quais não há vacinas, como a malária e a dengue, os repelentes tornam-se particularmente úteis para a proteção individual durante epidemias (dengue) ou quando o indivíduo tem que penetrar em áreas endêmicas (malária).

Os repelentes atualmente disponíveis não são inteiramente satisfatórios em termos de segurança, efetividade e, também, por causa do custo relativamente elevado. Neste sentido tem havido grande interesse em encontrar produtos naturais com atividade repelente que sejam eficazes, seguros e mais baratos do que os existentes e que possam, portanto, tornar-se disponíveis para populações de baixo poder aquisitivo.

Como já comentamos, os óleos essenciais de plantas podem ser vistos como fontes potenciais de substâncias tanto que atraem, quanto que repelem insetos. Estudos realizados com óleos essenciais têm identificado, além de atividades terapêuticas de interesse, atividades repelentes para várias espécies de mosquitos (Fatope *et al.*, 1995). Portanto, a busca de óleos essenciais com ação repelente parece justificar-se plenamente.

Embora haja relatos do uso de outras espécies do gênero *Ocimum* para repelir insetos, o óleo do *O. selloi*, planta abundante na região de Ponta Grossa, Paraná, tem sido muito pouco estudado. A própria constituição química do óleo de *O. selloi* que cresce na região é ainda

desconhecida. Na busca bibliográfica que realizamos, foram obtidas poucas referências (e.g. Amaral & Casali, 2000; Vieira & Simon, 2000) o que justifica uma pesquisa mais aprofundada com relação aos metabólitos secundários, e especialmente, ao óleo essencial de *O. selloi*. Além disso, verificamos que os estudos toxicológicos não clínicos (toxicidade de dose única e de doses repetidas, mutagenicidade, toxicologia reprodutiva, etc), bem como os dados sobre a irritação primária referentes ao óleo de *O. selloi* são escassos ou inexistentes. Dessa forma, não sabemos se o *O. selloi* representa algum risco à saúde. Vale a pena ressaltar que, independentemente de vir a ser usado como repelente, o *O. selloi* já é empregado para vários fins, inclusive como condimento. Assim sendo, a realização desses estudos fitoquímicos e toxicológicos com o *O. selloi* certamente contribuirá também para verificar se estes outros usos da planta são seguros.

Outro ponto importante a se levar em conta na pesquisa de produtos naturais é a necessidade da conservação dos ecossistemas tropicais, e a preocupação com os aspectos econômicos e sociais, tais como a conservação da diversidade existente para uso futuro (especialmente na indústria farmacêutica) e a exploração dos recursos florestais múltiplos de uma maneira auto-sustentável (Simões *et al.*, 1999).

### III - OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, em relação aos seguintes aspectos:

- a) Caracterização do óleo essencial quanto às suas propriedades físico-químicas, incluindo densidade relativa, índice de refração e solubilidade em álcool;
- b) Identificação e quantificação dos seus principais constituintes;
- c) Investigação preliminar da segurança do eventual uso do *O. selloi* como repelente, incluindo ensaios toxicológicos não-clínicos básicos tais como estudo toxicidade aguda e da mutagenicidade *in vitro*;
- d) Verificação do potencial irritante do óleo de *O. selloi* para pele humana;
- e) Avaliação da ação repelente de mosquitos do óleo de *O. selloi* frente ao *Anopheles brasiliensis*.

## **IV - MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV. 1 - OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO**

A coleta do material botânico foi realizada no centro do bairro de Uvaranas, perímetro urbano do Município de Ponta Grossa, Estado do Paraná, Brasil.

As folhas de *Ocimum selloi* foram coletadas entre os meses de outubro de 2001 e março de 2002, de acordo com os critérios preconizados por Fidalgo & Bononi (1986). A classificação botânica foi realizada pela professora Dr<sup>a</sup>. Rosemeri Segecin Moro, e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUEPG), registradas com o número 10718.

As folhas de *O. selloi* foram coletadas e selecionadas visualmente. Foram excluídas partes contendo contaminantes (orgânicos e inorgânicos) e/ou atacadas por insetos ou fungos. As folhas foram dessecadas à temperatura ambiente e posteriormente fragmentadas com o auxílio de um triturador em hélice. O material vegetal fragmentado e dessecado foi armazenado em recipientes herméticos, acondicionado à temperatura ambiente, com umidade entre 40 e 50% e ao abrigo da luz.

### **IV. 2 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum selloi***

A extração do óleo essencial foi realizada através de hidrodestilação (arraste a vapor), durante um período de seis horas, utilizando o aparelho de Clevenger para essências menos densas do que a água (USP XXII, 1990). Após esta etapa, a quantidade de óleo volátil obtida

foi medida em tubo graduado. Procedeu-se então ao cálculo da porcentagem de óleo essencial existente nas folhas coletadas, através da fórmula:

$$\% \text{ de óleo essencial} = \frac{\text{Volume de óleo essencial obtido (mL)}}{\text{Massa de material dessecado (g)}} \times 100$$

### IV. 3 - ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi*

As propriedades físicas, o índice de refração (F. BRAS. IV, 1988), a densidade relativa (F. BRAS. IV, 1988) e a solubilidade em álcool (Ph. Helv. VII, 1993) foram determinadas em triplicata.

#### IV. 3.1 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA $_{20}d^{20}$ (F. BRAS. IV, 1988)

A densidade relativa do óleo essencial de *O. selloi* foi determinada através do método do picnômetro, por comparação das massas de igual volume de amostra e de água recém destilada e a 20°C.

Após a determinação da massa de um tubo capilar limpo e seco, este foi preenchido com água destilada a 20°C e sua massa foi novamente aferida. O valor da massa de água foi obtido pela diferença entre a massa do capilar contendo água destilada a 20°C e a massa do capilar vazio.

O tubo capilar foi então esvaziado e seco com o auxílio de solventes voláteis. A amostra foi colocada no tubo capilar, a temperatura foi ajustada para 20°C, e a massa foi medida. A massa da amostra correspondeu à diferença da massa do capilar contendo o óleo essencial e da massa do capilar vazio.

O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, a 20°C, forneceu o valor da densidade relativa ( $_{20}d^{20}$ ).

#### **IV. 3.2 - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO $^{20}n_D$ (F. BRAS. IV, 1988)**

O índice de refração do óleo essencial de *O. selloi* foi obtido em refratômetro de Abbé, em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm (raia D) e à temperatura de 20°C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração foi de 1,3330 a 20°C e 1,3325 a 25°C.

#### **IV. 3.3 - DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EM ÁLCOOL (Ph. Helv. VII, 1990)**

A solubilidade do óleo essencial em álcool etílico 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v) e álcool etílico absoluto foi determinada. Em bureta de 25 mL cada diluente foi gotejado sobre 0,1 mL do óleo essencial de *O. selloi*, até a solubilização total da amostra. O volume de solvente gasto na bureta (em décimos de mL) foi registrado, e a relação de solubilidade foi estabelecida.

#### **IV. 4 – DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi***



#### IV. 4.1 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DO ÓLEO ESSENCIAL DE

##### *O. selloi*

O óleo essencial obtido das folhas da espécie em estudo foi submetido à cromatografia, de acordo com o seguinte sistema:

- a) Placas: cromatoplasas de sílica gel G60 (Merck<sup>®</sup>), com 20x20 cm e espessura de 300µm;
- b) Ativação: por aquecimento a 100°C por 1 hora;
- c) Cuba: de vidro, saturada;
- d) Desenvolvimento: simples, ascendente;
- e) Percurso: 10,0 cm;
- f) Fase móvel: tolueno + acetato de etila (93:7) (WAGNER *et al.*, 1983);
- g) Revelador: vanilina sulfúrica e aquecimento a 120°C, durante 5 a 10 minutos;
- h) Amostra: óleo essencial a 10% em n-hexano;
- i) Volume da amostra: 1 µL;
- j) Padrões: anetol, cariofileno, eugenol, mirceno, diluídos a 10% em n-hexano;
- k) Volume dos padrões: 1 µL.

#### IV. 4.2 - CROMATOGRAFIA CAPILAR DE ALTA RESOLUÇÃO ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS (GC/MS-MSD), DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O.*

##### *selloi*

O óleo essencial obtido das folhas de *O.selloi* foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa. Para a separação e identificação dos componentes químicos do óleo, foi utilizado o GC/MS-MSD *Shimadzu*, cromatógrafo modelo QP 2000 A, com coluna

CBP1 de 25m de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 $\mu$ m de espessura da fase estacionária. O hélio foi utilizado como gás inerte. Na primeira etapa, foram injetados 0,4  $\mu$ L das amostras de óleo essencial de *Ocimum selloi*, na razão de Split 1:100, com temperatura inicial de 36°C e temperatura final de 180°C. A isoterma inicial foi de 4 minutos, com rampa de aquecimento de 4°C/min. Numa segunda etapa utilizamos, como temperatura inicial, 190°C, e como temperatura final, 310°C. A isoterma final foi de 5°C, com taxa de aquecimento de 10°C/minuto. A temperatura de injetor foi de 250°C.

A confirmação dos compostos detectados por GC/MS-MSD foi realizada através da análise da rota de fragmentação das amostras com os padrões de fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos.

#### **IV. 5 – INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE PARA PELE HUMANA:**

##### **TESTE DE IRRITAÇÃO PRIMÁRIA**

O óleo essencial de *O. selloi* foi testado em 30 voluntários saudáveis, selecionados de acordo com os seguintes critérios: idade entre 18 e 50 anos, ausência de doenças dermatológicas (Patil, Patrick & Maibach, 1996). Todos os voluntários foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos do trabalho e riscos potenciais, e assinaram o termo de consentimento pós-informação que se encontra em anexo.

Neste teste, um papel celulose embebido com óleo de *O. selloi* não diluído foi aplicado na parte anterior do antebraço de cada voluntário (32  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>), e posteriormente coberto com bioadesivo cirúrgico. A duração da exposição ao óleo foi de 4 horas. Decorrido esse tempo, o “*patch*” foi retirado. O local da aplicação foi então lavado suavemente com água e examinado a intervalos de 24, 48 e 72 horas. Utilizamos como controle positivo uma solução de lauril

sulfato de sódio a 20%, testada nas mesmas condições do ensaio com a amostra do óleo. (Basketter, 1997; Walker, 1997).

Os graus de irritação cutânea observados foram estabelecidos, clinicamente, com base na seguinte classificação: (0) para ausência de reação; (+) reação fracamente positiva ou discreto eritema; (++) reação moderadamente positiva; (+++) reação fortemente positiva, forte eritema, geralmente associado a edema.

#### **IV. 6 – AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA NÃO CLÍNICA**

A avaliação não clínica da toxicidade do óleo essencial de *O. selloi* constou da investigação da toxicidade oral aguda em camundongos e da terminação do potencial mutagênico em procariotos (*i.e.* teste de Ames).

##### **IV. 6.1 - TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA EM CAMUNDONGOS**

Os efeitos adversos resultantes de uma única dose do óleo de *O. selloi*, administrada por via oral, foram avaliados em camundongos *Swiss Webster* adultos, machos e fêmeas, originários do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ).

O óleo de *O. selloi*, diluído em óleo de milho, foi administrado por entubação gástrica a camundongos machos, nas doses de 2000 mg/kg, 1500 mg/kg e 1250 mg/kg, e a fêmeas, nas doses de 5000 mg/kg, 2500 mg/kg, 2000 mg/kg, 1500 mg/kg e 1250 mg/kg. Em todos os casos, o volume administrado foi 10 mL/kg de peso corporal. Dois grupos controle foram avaliados, um grupo controle tratado por entubação gástrica apenas com o veículo (óleo de milho) e um outro grupo que não recebeu qualquer tratamento (controle não tratado).

Todos os animais foram pesados antes do tratamento (dia 0) e 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 7 dias, 9 dias, 11 dias e 14 dias após a administração do óleo essencial de *O. selloi* ou do veículo. As gaiolas foram inspecionadas quanto aos sinais clínicos e ocorrência de mortes, várias vezes ao dia durante as primeiras 96 horas pós-tratamento e, depois, diariamente até completar o período de 14 dias de observação. Todos os animais encontrados mortos foram necropsiados. Os sobreviventes até o fim do período de observação (14 dias) foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> e, em seguida, necropsiados. As vísceras foram examinadas macroscopicamente e fígado, baço, pulmões, coração, rim direito e rim esquerdo, foram removidos e pesados.

#### **IV. 6.2 - ESTUDO DE MUTAGENICIDADE**

O potencial mutagênico do óleo essencial de *O. selloi* foi avaliado pelo teste de Ames, utilizando as cepas TA100, TA98 e TA97a de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica, pelo método de incorporação em placa, de acordo com Gomes-Carneiro (1997) e Gomes-Carneiro *et al* (1998).

##### **IV. 6.2.1 - PREPARO DAS CULTURAS DE *Salmonella Typhimurium* CRESCIDAS DURANTE A NOITE**

Para a preparação das culturas bacterianas utilizadas nos ensaios de mutagenicidade, cada cepa mantida em nitrogênio líquido foi descongelada em banho de gelo. A cultura descongelada (200µL) foi então transferida para um *erlenmeyer* contendo 20 mL de meio *Oxoid Nutrient Broth n° 2* líquido. A cultura foi colocada para crescer em Banho-Maria a 37°C, com agitação de 90 movimentos/minuto e protegida da luz, durante 14-16 horas, tempo de

crescimento necessário para obtenção de uma concentração bacteriana de  $1-2 \times 10^9$  células/mL (Gomes-Carneiro, 1997; Gomes-Carneiro *et al*, 1998).

#### **IV. 6.2.2 - TESTE DE MUTAGENICIDADE COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi*.**

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados como se segue:

Adicionamos a tubos 13x100mm contendo 2mL de agar de superfície enriquecido com solução de histidina 0,5mM/biotina0,5mM, mantidos a 45°C: 100µL da cultura bacteriana crescida durante a noite (item IV.5.2.1) + 100µL de diferentes doses do óleo essencial de *O. selloi*, ou de seu diluente (etanol absoluto = controle negativo), ou de controles positivos apropriados + 500 µL de tampão sódio-fosfato 0,2M ou mistura S9. O conteúdo do tubo foi homogeneizado em agitador do tipo Vortex e, em seguida, vertido em placas de Petri contendo meio mínimo glicosado. Para garantirmos a distribuição uniforme do ágar de superfície sobre as placas, estas foram submetidas a movimentos manuais de rotação, dentro de um intervalo de tempo inferior a 20 segundos, após o que as placas permaneceram em repouso até a completa solidificação do agar. Cada determinação foi feita em triplicata.

As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, e a contagem do número de colônias revertentes foi realizada (em contador manual marca *PHOENIX*, mod. EC 589).

#### **IV. 6.2.3 - DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DO INTERVALO DE DOSES DO ÓLEO DE *O. selloi* TESTADO**

A toxicidade do óleo de *O. selloi* para as cepas de *S. typhimurium* foi determinada em estudos preliminares realizados com a linhagem TA98 (com e sem ativação metabólica). A toxicidade foi evidenciada pelo aparecimento do tapete bacteriano de fundo constituído por

colônias his<sup>-</sup> e ou pela redução do número de colônias nas placas tratadas em relação ao controle negativo, durante a execução dos testes de mutagenicidade propriamente ditos (item IV.5.2.3).

O tapete de fundo aparece quando ocorre morte bacteriana em grande escala, tornando a histidina residual mais disponível, o que permite que bactérias auxotróficas sobreviventes sofram um maior número de divisões celulares e tornem-se visíveis como pequenas colônias.

#### **IV. 6.2.4 - SISTEMA DE ATIVAÇÃO METABÓLICA**

O sistema de ativação metabólica (mistura S9) foi preparado da seguinte maneira: 7 mL de água destilada, 10,5 mL de tampão sódio-fosfato 0,2M (pH 7,4), 0,84 mL de  $\beta$ -NADP 0,1M, ), 0,105 mL de glicose-6-fosfato 1M, 0,420 mL de solução de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M/KCl 1,65M, e 2,1 mL de fração S9 liofilizada. A fração S9 utilizada era uma preparação comercial liofilizada produzida pela MOLTOX<sup>®</sup> (Molecular Toxicology Incorporated, Annapolis, USA), obtida a partir do fígado de ratos Sprague Dawley tratados (induzidos) com Aroclor-1254. A fração liofilizada foi mantida a -20° até o momento do seu uso. Para o preparo da mistura S9, a fração era reconstituída com 2,1mL de água, conforme instruções do fabricante (Gomes-Carneiro *et al*, 1998).

#### **IV. 6.2.5 - MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS**

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas foram preparadas de acordo com Maron & Ames, 1983, Gomes-Carneiro, 1997 e Gomes-Carneiro *et al*, 1998. A relação dos meios e substâncias utilizados está descrita a seguir.

Ácido cítrico monohidratado PA, Merck Art 21549

Álcool etílico PA, *Vetec Química Fina*, cod 107.

2-aminoantraceno, *Merck*, Art 1381

Azida sódica, *Aldrich Chemical Co. Inc*, 19,993-1

Bacto Agar, *DIFCO*, 214010

D-(+)-biotina, *Merck*, Art 24514

Cloreto de magnésio hexahidratado PA, *Merck*, Art 5833

Cloreto de sódio PA, *Merck*, Art 6404

Cloreto de potássio PA, *Reagen*, 10064

Dimetilsulfóxido (DMSO), *Merck*; Art 2950

Fosfato de potássio dibásico, *Merck*, Art 5101

Fosfato de sódio e amônio tetrahidratado, *Aldrich Chemical Co. Inc*, 24,350-7

Fosfato de sódio monobásico monohidratado, *Isofar*, ref. 313

Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), *Reagen*

D-(+)-glicose anidra PA, *Vetec*, cod 221

$\beta$ -D-glicose-6-fosfato monossódica, *Aldrich Chem.*, 28,597-B

L-histidina.HCl monohidratada, *Sigma Chemical*, H-8125

Meio oxoid *Nutrient Broth* n.º 2, marca *Oxoid*; code CM67

$\beta$ -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato ( $\beta$ -NADP), *Sigma Chemical*, N-3886

2-nitrofluoreno, *Aldrich Chemical Co. Inc*, N,67549

Sulfato de magnésio PA ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), *General Chemical Division*, c.1924

#### IV. 7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DE MOSQUITOS

A atividade repelente do óleo de *O. selloi* foi avaliada em seis voluntários expostos ao mosquito *Anopheles (NYSSORHYNCHUS) braziliensis* (CHAGAS, 1907), por um período de

30 minutos. O teste foi realizado em campo, nas proximidades do Rio Tibagi, município de Ponta Grossa, Paraná, no dia 29 de março de 2002, entre as dezenove horas e trinta minutos e vinte horas e trinta minutos, horário em que se observou a maior concentração de mosquitos. Todos os voluntários receberam e assinaram o termo de esclarecimento e livre consentimento que se encontra em anexo.

O volume de 100  $\mu$ L de uma solução alcoólica do óleo essencial de *Ocimum selloi* a 10% foi aplicado em uma área de aproximadamente 50 cm<sup>2</sup> da face cubital do antebraço. O restante do antebraço foi coberto com luvas de algodão para proteção contra as picadas. O controle negativo havia sido realizado anteriormente no mesmo antebraço, com a aplicação de forma análoga de 100  $\mu$ L de etanol. Como controle positivo foi utilizado o repelente Autan Bayer<sup>®</sup> aplicado no rosto.

A região do antebraço em que foi aplicado o etanol foi exposta primeiramente às picadas do mosquito, por um período de trinta minutos. Contou-se então o número total de picadas durante este período. Posteriormente foi aplicada a solução de óleo essencial de *O. selloi* a 10%. No período seguinte de trinta minutos observamos o número de mosquitos que picaram o local e registramos o resultado.

A identificação dos mosquitos foi realizada pela entomologista Professora M.Sc. Neiva Regina Borges Doroso, do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa e pelo Professor Dr. Enio Luz, da Universidade Federal do Paraná.

A comparação estatística entre o tratamento com *O. selloi* a 10% e o controle (tratamento apenas com etanol) foi realizada pelo teste *t* de *Student* para amostras pareadas ( $P \leq 0,05$ ).



## V - RESULTADOS

### V.1 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL A PARTIR DAS FOLHAS DE *O. selloi*

Durante o processo de destilação observamos que o óleo essencial de *O. selloi* apresenta densidade menor do que a da água, cor amarela clara e pronunciado aroma. Após 6 horas de hidrodestilação, obtivemos 1,34 mL de óleo essencial a partir de 100 g das folhas de *O. selloi*, devidamente dessecadas e fragmentadas.

### V.2 - ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi*

Os resultados obtidos a partir da análise físico-química do óleo essencial das folhas de *O. selloi* estão indicados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Análise físico-química do óleo essencial obtido das folhas de *O. selloi*.**

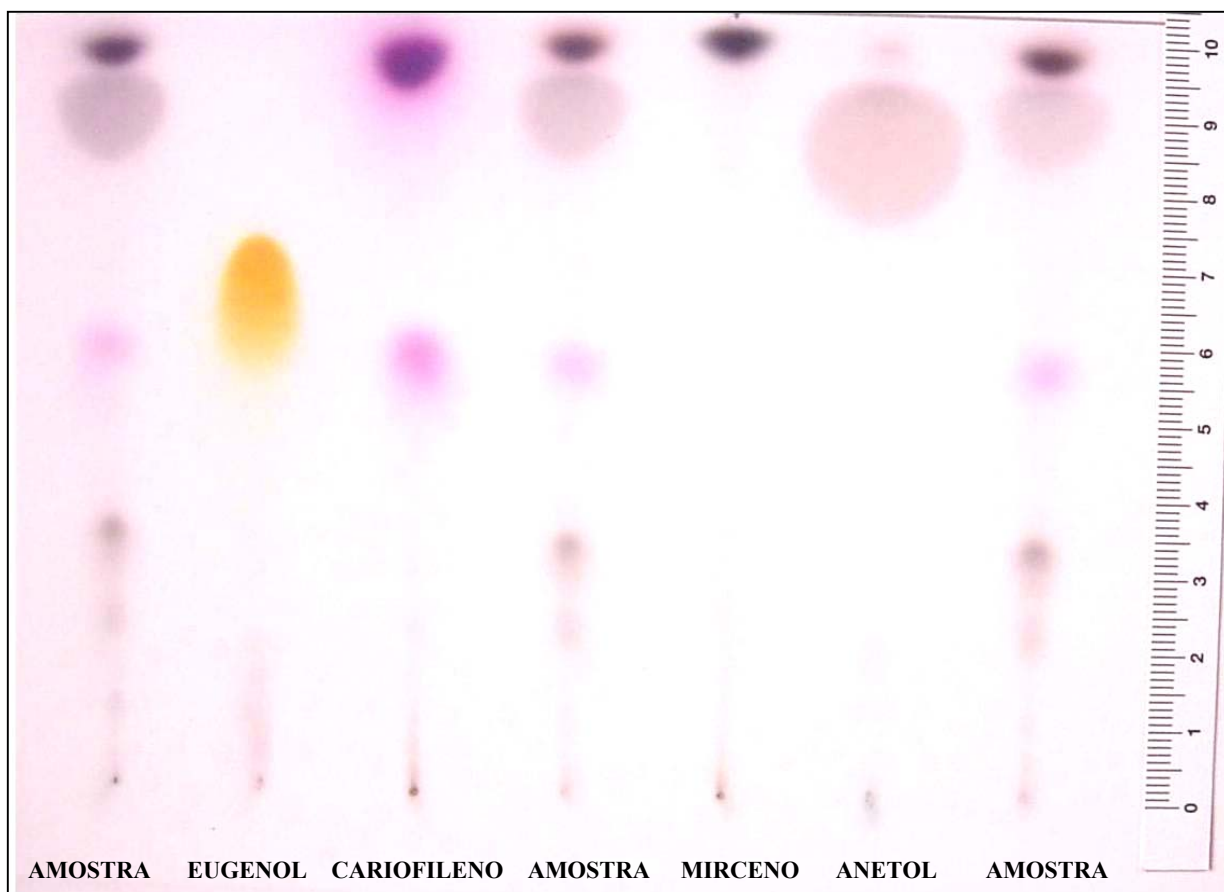
Propriedades físico-químicas	
Densidade relativa ( ${}_{20}d^{20}$ )	0,951 g/cm <sup>3</sup>
Índice de refração ( ${}^{20}n_D$ )	1,5294
Solubilidade em álcool etílico 60% (v/v)	1:40
Solubilidade em álcool etílico 70% (v/v)	1:15
Solubilidade em álcool etílico 80% (v/v)	1:5
Solubilidade em álcool etílico 90% (v/v)	1:2
Solubilidade em álcool etílico absoluto	1:1 (Solúvel)

### V.3 - DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO

#### ESSENCIAL DE *O. selloi*

#### V.3.1 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DO ÓLEO OBTIDO DAS FOLHAS DE *O. selloi*.

A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico do óleo essencial de *O. selloi* frente a padrões apropriados, disponíveis no laboratório de Farmacognosia da UEPG.



**Figura 8** -Perfil cromatográfico (CCD) do óleo essencial de *O. selloi* e dos padrões, utilizando o tolueno-acetato de etila (93:7), como fase móvel e a vanilina sulfúrica, como revelador.

Os valores de Rf dos padrões estão indicados na Tabela 2.

**Tabela 2– Valores de Rf dos padrões disponíveis.**

<b>Padrão</b>	<b>RF</b>
Eugenol	0,62
Cariofileno	0,93
Mirceno	0,97
Anetol	0,84

**V.3.2 - CROMATOGRAFIA CAPILAR DE ALTA RESOLUÇÃO ACOPLADA AO ESPECTROMETRO DE MASSA (GC/MS-MSD) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi***

A Tabela 3 expressa a composição percentual do óleo essencial das folhas de *Ocimum selloi* obtida por GC/MS-MSD. Para cada substância é apresentando o tempo de retenção em minutos e a área percentual em relação ao demais constituintes do óleo injetado.

**Tabela 3 - Composição percentual do óleo essencial obtido das folhas de *Ocimum selloi*, determinada por GC/MS-MSD.**

<b>Pico</b>	<b>Substância</b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área (% v/v)</b>
01	Estragol	18,09	55,38
02	<i>cis</i> -anetol	20,09	3,94
03	<i>trans</i> -anetol	21,48	34,23
04	M/e: (204) <sub>0,46</sub>	24,53	0,46
05	cariofileno	25,83	2,12
06	M/e: (204) <sub>1,90</sub>	27,86	1,90
07	M/e: (204) <sub>1,97</sub>	28,30	1,97

A Figura 9 representa o cromatograma do óleo essencial de *O. selloi* obtido por GC. As Figuras 10, 11 e 12 mostram os espectros de massas dos principais compostos presentes na amostra, comparados aos respectivos padrões, enquanto as Figuras 13, 14, 15 e 16 dizem respeito aos componentes minoritários do óleo.

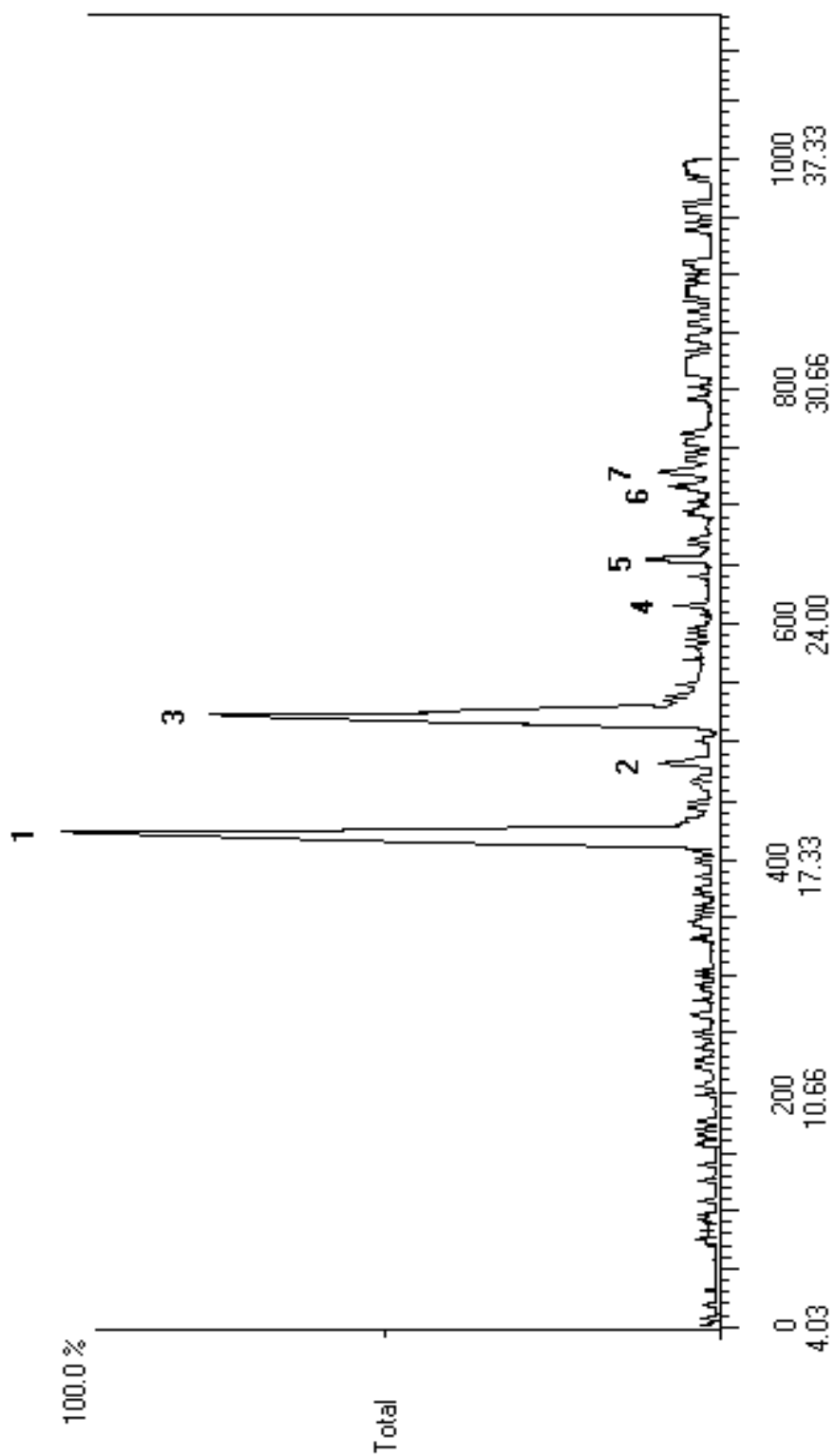
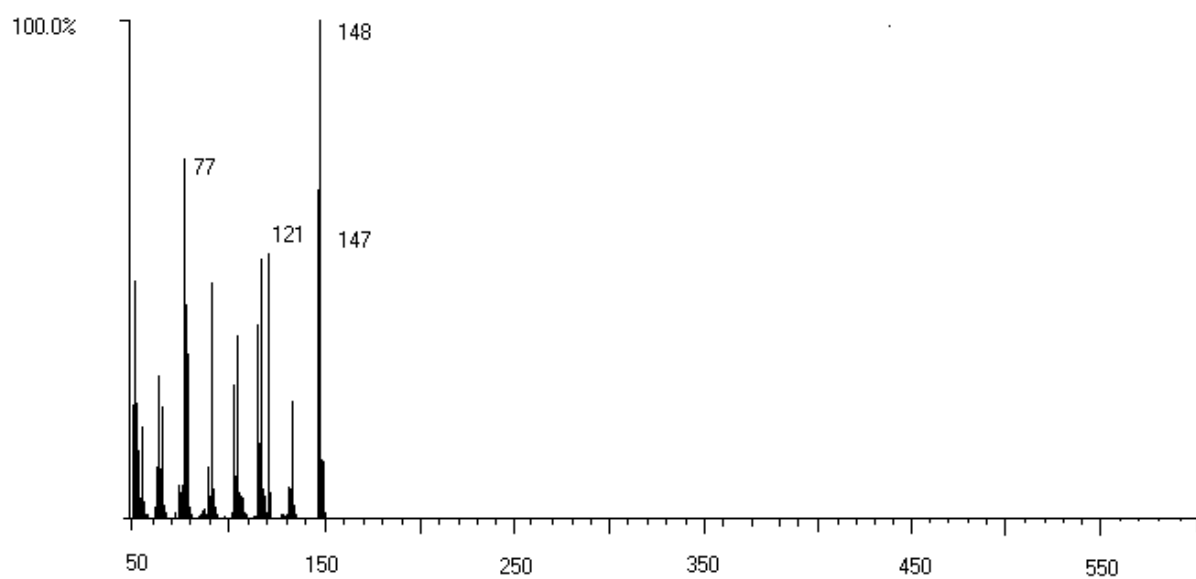
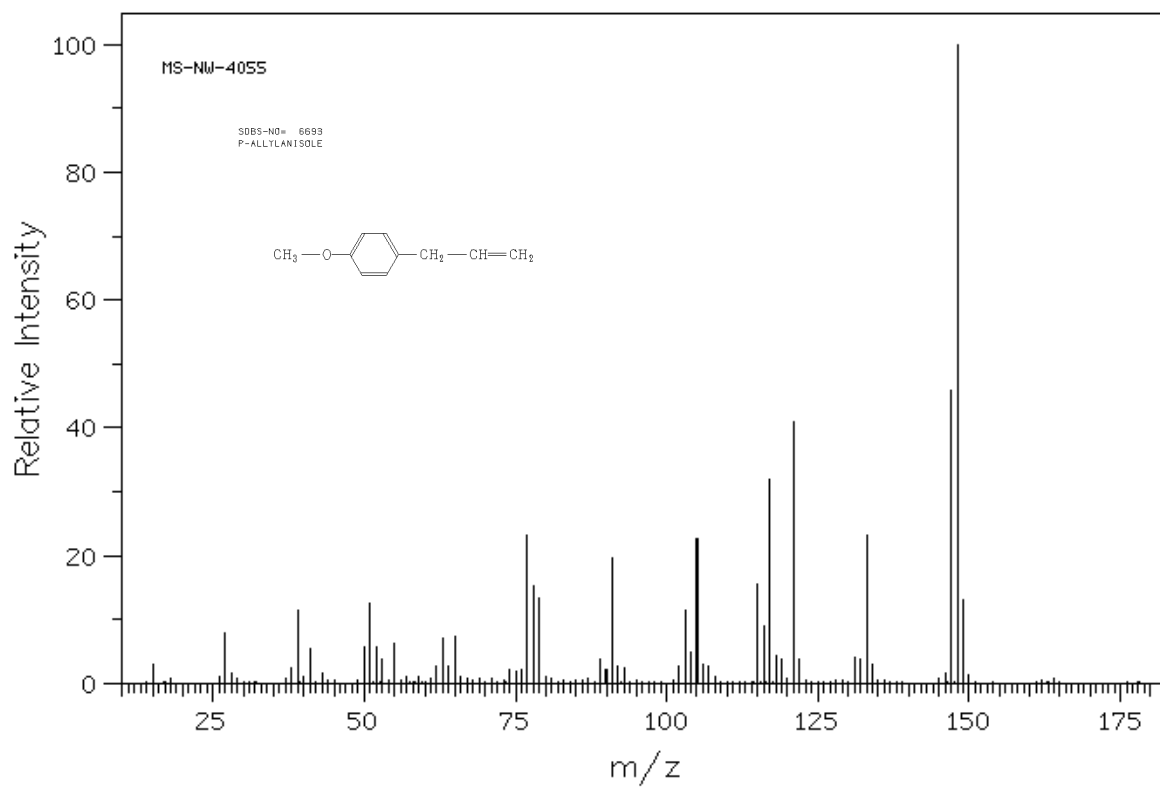
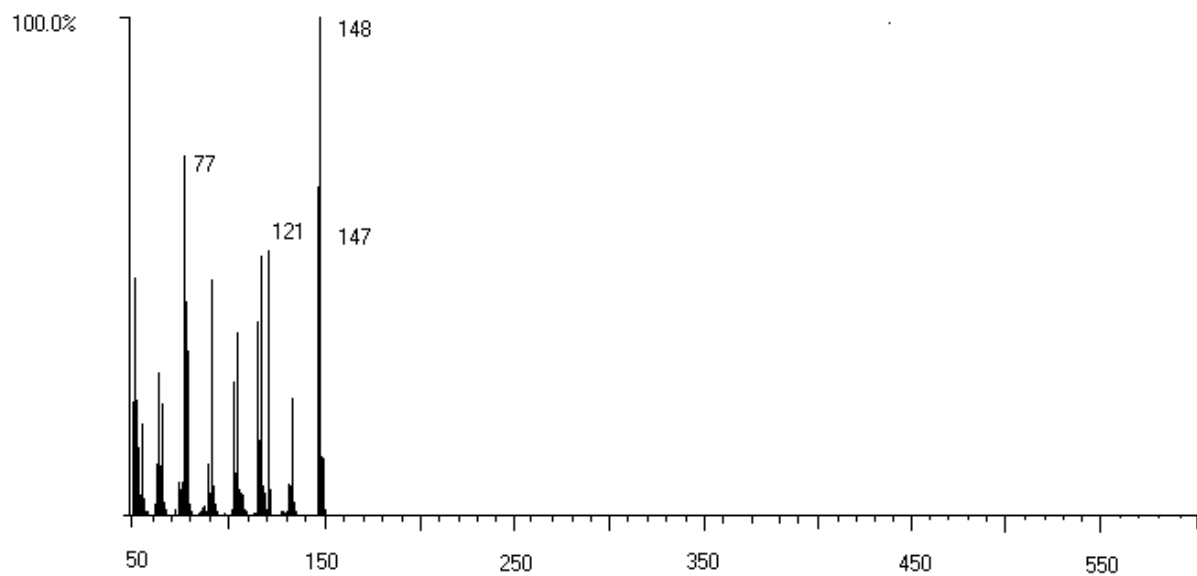
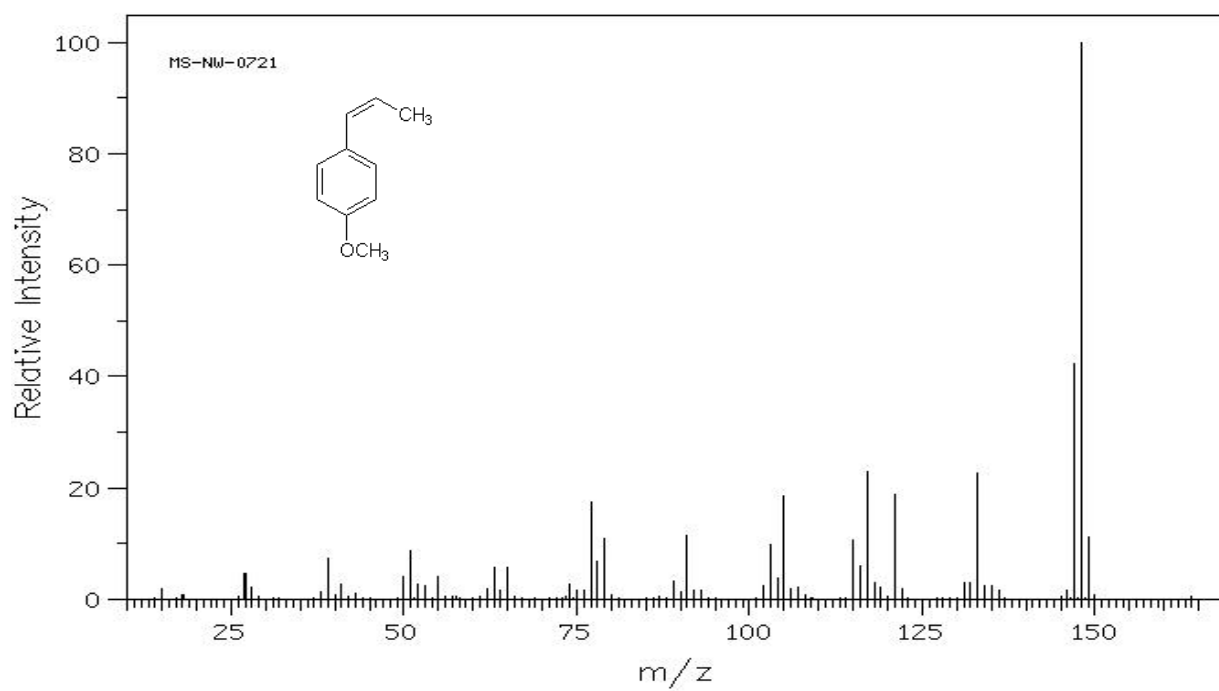


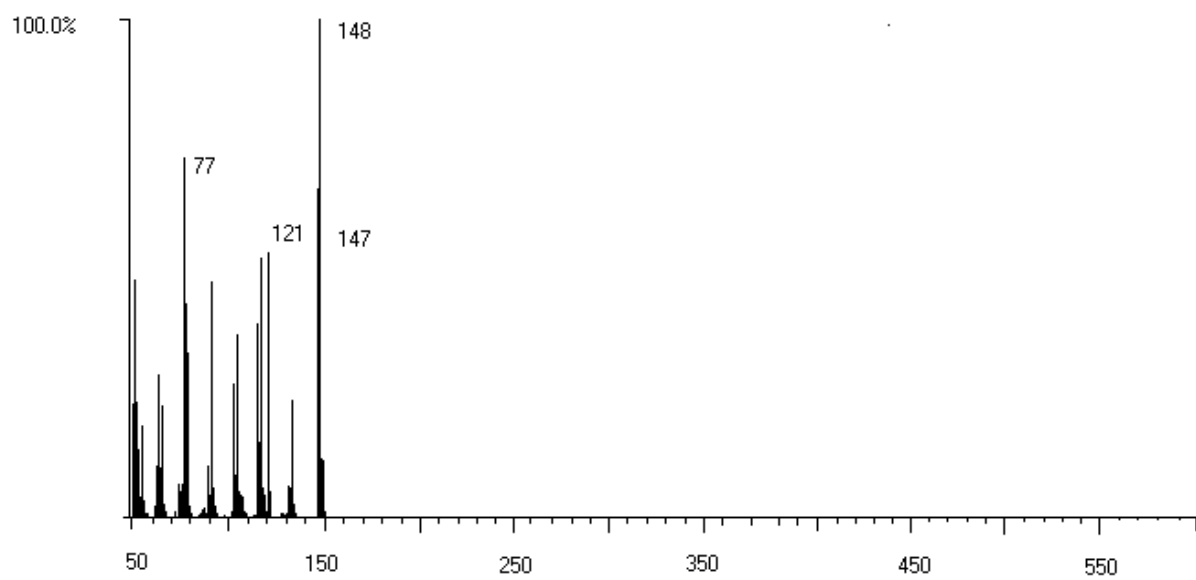
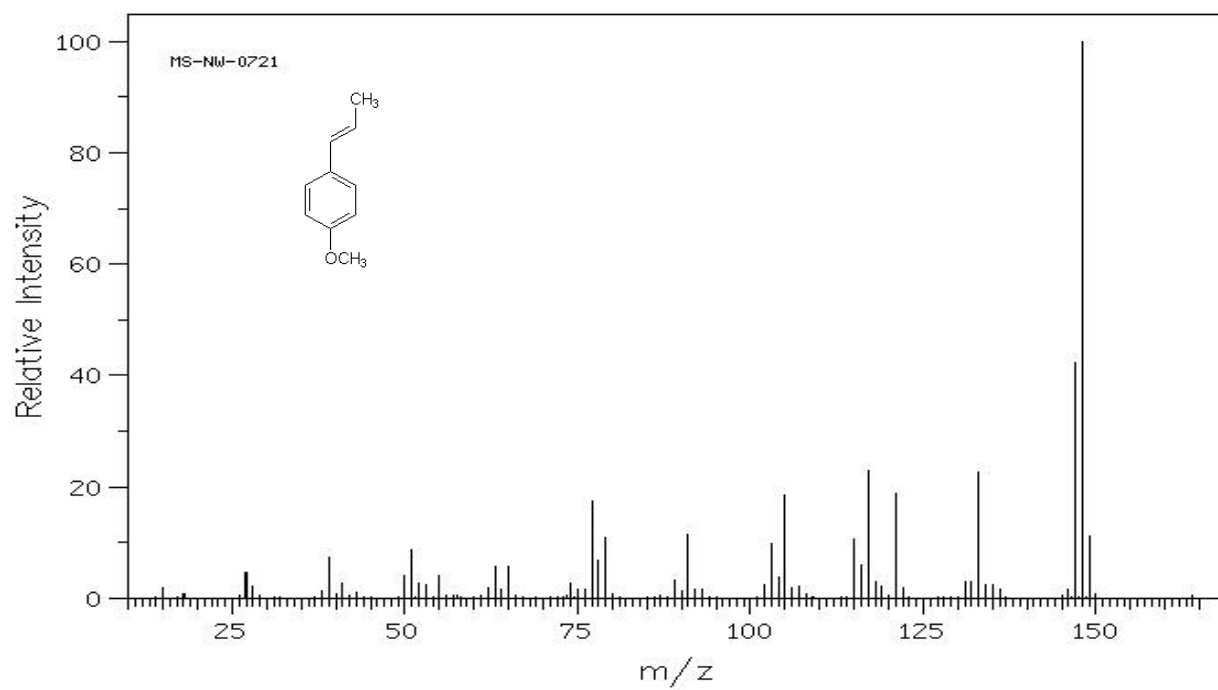
Figura 9 – Cromatograma (CG) do óleo essencial das folhas de *O. selloi*. Cada pico representa um componente da amostra.

**A****B**

**Figura 9** – Espectro de massa do estragol; amostra (A), padrão (B).

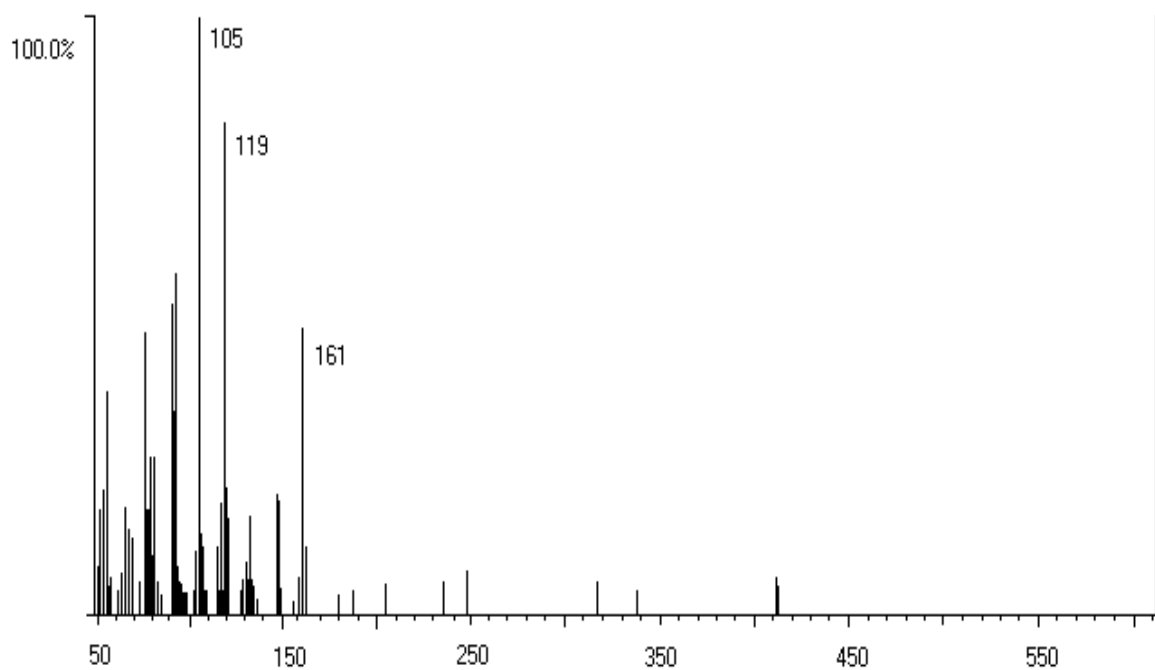
**A****B**

**Figura 10**– Espectro de massa do cis-anetol; amostra (A), padrão (B).

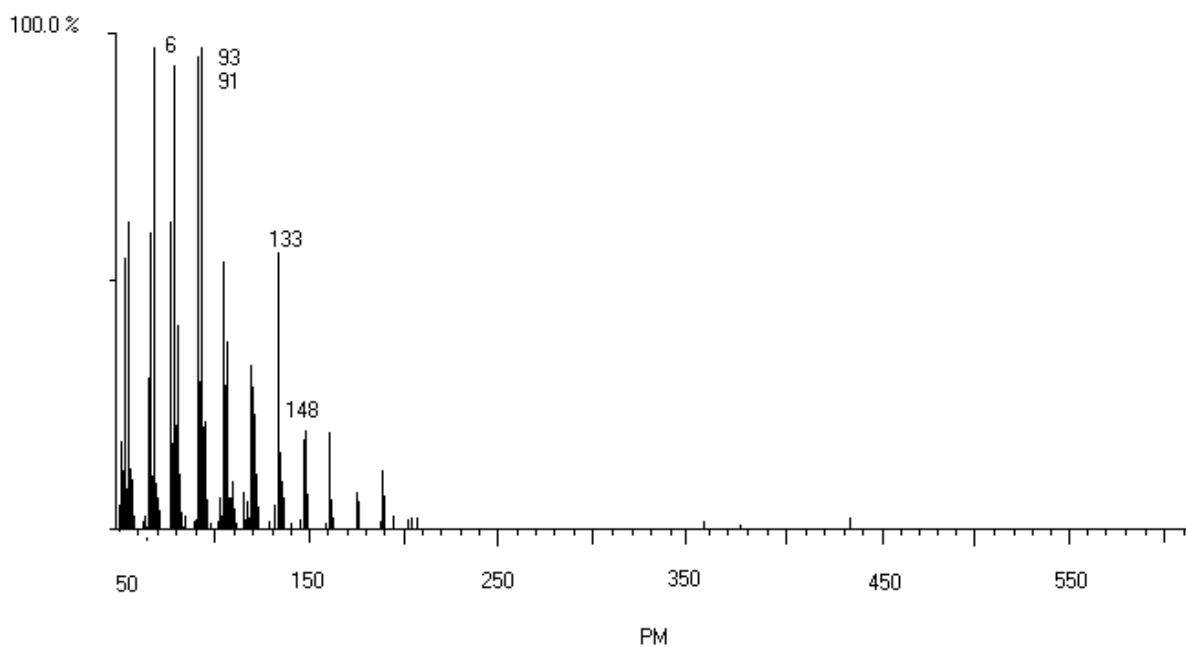
**A****B**

**Figura 11**– Espectro de massa do trans-anetol; amostra (A), padrão (B).

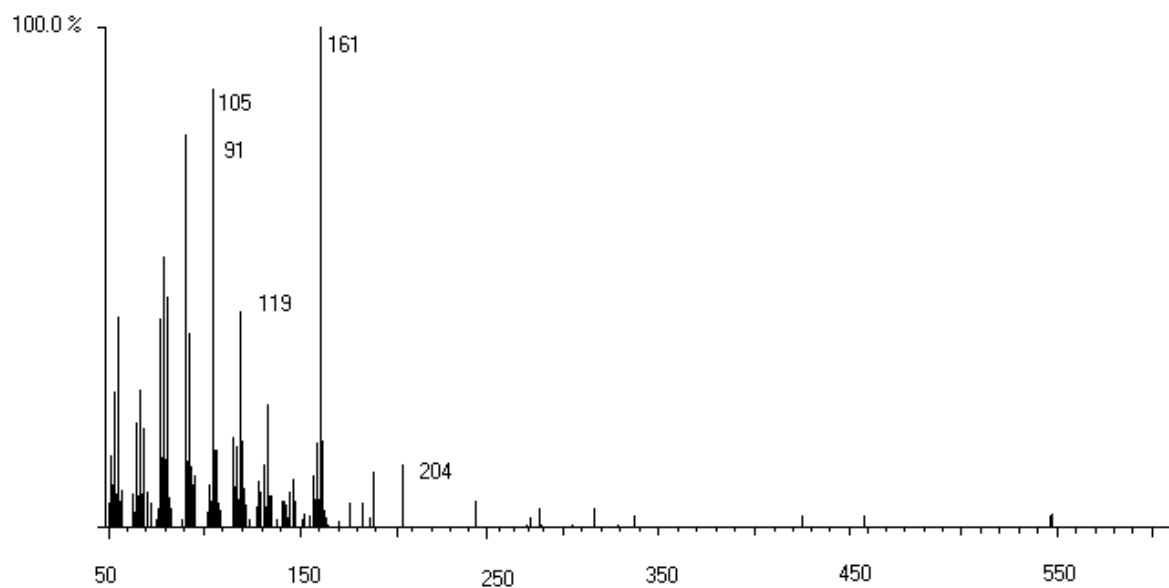




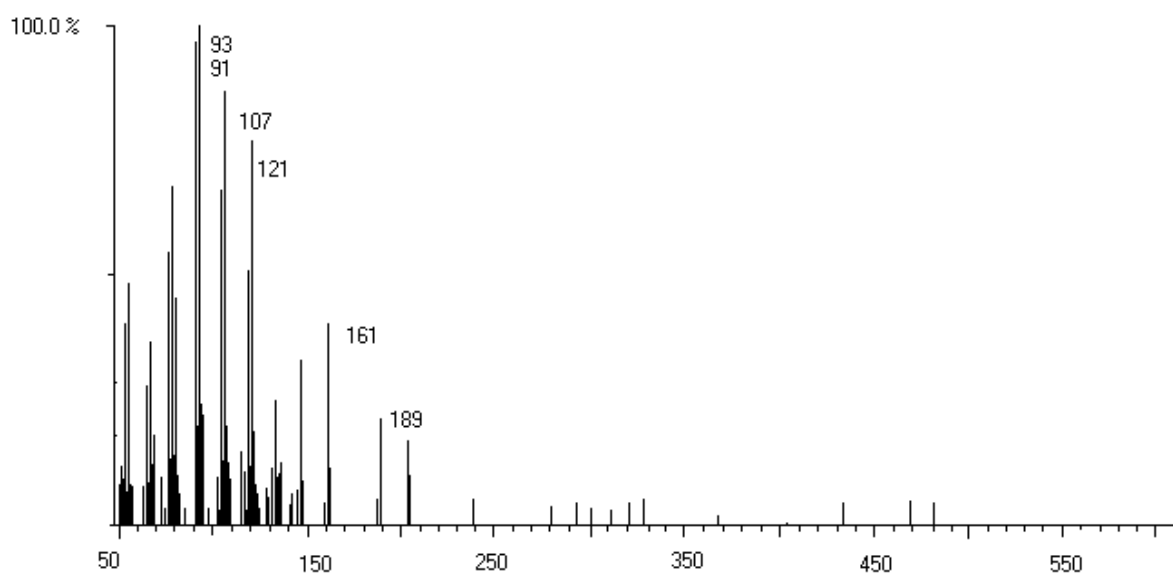
**Figura 12** – Espectro de massa do componente número 4.



**Figura 13** - Espectro de massa do componente número 5.



**Figura 14** – Espectro de massa do componente número 6.



**Figura 15** – Espectro de massa do componente número 7.

## V.4 - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA NÃO-CLÍNICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. selloi*

### V.4.1 - ESTUDO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL MUTAGÊNICO AVALIADOS EM ENSAIOS COM *Salmonella typhimurium*.

A tabela 4 mostra os dados do teste de toxicidade do óleo essencial de *O. selloi* realizado com a cepa TA 98 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de sistema extrínseco de ativação metabólica (mistura S9).

Nas duas situações, com e sem adição de mistura S9, foram testadas doses que variaram de 50 a 5000 µg / placa. Nas doses de 5000 µg/placa, 4000 µg/placa e 3000 µg/placa o número de revertentes por placa foi igual a zero, mas não detectamos a presença de tapete bacteriano de fundo. Na ausência de mistura S9, nas doses de 1000 µg / placa e 2000 µg / placa, registramos o aparecimento (média ± D.P.) de  $3 \pm 5$  e  $3 \pm 4$  colônias revertentes, respectivamente, além de tapete bacteriano do tipo III em uma das placas tratadas com a última dose. Já na presença da mistura S9 observamos, com as doses de 1000 µg / placa e 2000 µg / placa, tapete do tipo III em duas placas tratadas, e uma contagem de  $2 \pm 2$  revertentes na dose superior. Não foram observados sinais relevantes de toxicidade (diminuição expressiva do número médio de revertentes com relação ao controle negativo e / ou tapete de fundo) nas doses de 50 a 500 µg / placa. A dose de 500 µg / placa correspondeu à maior dose testada em que o número de colônias revertentes foi apenas ligeiramente inferior ao número obtido nas placas controles, isto é,  $24 \pm 6$  revertentes na ausência e  $24 \pm 2$  na presença da mistura S9. Por outro lado, a dose 1000 µg de óleo / placa foi a menor dose que causou toxicidade. Esses resultados indicam que a dose limite a partir da qual o óleo é tóxico

para a *S. typhimurium*, tanto na ausência, quanto na presença de mistura S9, deve estar situada entre as doses de 500 µg/placa e 1000 µg/placa.

**Tabela 4:** Toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* para a cepa TA98 de *S. typhimurium* na ausência e na presença de sistema extrínseco de ativação metabólica (mistura S9).

Presença de Ativação Metabólica (Mistura S9)							
- S9				+ S9			
DOSE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA	TIPO DE TAPETE	REVERTENTES (MÉDIA ± D.P.)	DOSE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA	TIPO DE TAPETE	REVERTENTES (MÉDIA ± D.P.)
5000	0	NO	0	5000	0	NO	0
	0	NO			0	NO	
	0	NO			0	NO	
4000	0	NO	0	4000	0	NO	0
	0	NO			0	NO	
	0	NO			0	NO	
3000	0	NO	0	3000	0	NO	0
	0	NO			0	NO	
	0	NO			0	NO	
2000	8	NO	3 ± 4	2000	0	III	2 ± 2
	1	NO			2	NO	
	0	III			3	III	
1000	0	NO	3 ± 5	1000	0	III	0
	9	NO			0	III	
	0	NO			-	-	
500	22	NO	24 ± 6	500	25	NO	24 ± 2
	31	NO			22	NO	
	20	NO			-	-	
100	30	NO	34 ± 3	100	48	NO	41 ± 10
	36	NO			46	NO	
	35	NO			30	NO	
50	37	NO	34 ± 5	50	49	NO	40 ± 8
	36	NO			38	NO	
	28	NO			34	NO	
0	31	NO	31 ± 1	0	32	NO	35 ± 2
	30	NO			36	NO	
	32	NO			36	NO	
CP	133	NO	120 ± 12	CP	453	NO	450 ± 5
	115	NO			446	NO	
	111	NO			-	-	

A toxicidade foi avaliada por morte bacteriana, evidenciada pela diminuição do número de revertentes nas placas tratadas, quando comparado ao número encontrado nas placas da dose 0, e / ou pela presença de tapete constituído por colônias his<sup>-</sup>, caracterizando 3 tipos de toxicidade: I) colônias revertentes normais e um grande número de colônias his<sup>-</sup> muito pequenas e de difícil visualização; II) revertentes normais e colônias his<sup>-</sup> mais individualizadas do que em I; III) revertentes normais e colônias his<sup>-</sup> maiores do que em I e II. NO: não observado. Dose 0 (controle negativo): 100µl etanol PA. CP (controle positivo): TA98/-S9, 2-NF (1µg/placa) e TA98/+S9, 2-AA (0,5µg/placa).

A tabela 5 mostra os dados dos testes de mutagenicidade realizados com as linhagens TA100, TA98 e TA97a, na presença e na ausência de mistura S9.

Nos ensaios de mutagenicidade realizados na ausência da mistura S9, o óleo essencial foi testado nas doses de 5 a 500µg/placa, enquanto que nos testes realizados com a mistura, as doses variaram de 25 a 700µg/placa.

O óleo, quando testado sem a mistura S9, foi tóxico na faixa de doses de 300 a 500 µg / placa para a cepa TA100, e na dose de 500 µg / placa para a linhagem TA98, o que está de acordo com os dados apresentados na tabela 4. Por outro lado, na presença da mistura S9, o óleo foi tóxico nas doses de 600 a 700 µg/placa. Neste caso, é provável que a metabolização de constituintes do óleo na presença da fração S9 tenha reduzido a sua toxicidade para a bactéria, o que poderia explicar a diferença entre as maiores doses testadas nas duas situações (*i.e.* com e sem a mistura S9).

Para que uma substância seja considerada positiva no ensaio de incorporação em placa, ela deve induzir um aumento do número de revertentes, com relação aos valores observados nos controles negativos, estatisticamente significativo e dose-dependente, em uma ou mais cepas, na presença e / ou ausência da mistura S9. Um aumento maior ou igual ao dobro do número de revertentes espontâneos, associado a um claro efeito dose relacionado, indica uma resposta positiva no teste de mutagenicidade (WHO, 1985).

Podemos observar, nos experimentos realizados, que, nas linhagens TA100, TA98 e TA97a de *S. typhimurium*, e em ambas as situações (com ou sem mistura S9), os resultados mostraram que não houve aumento do número de revertentes nas placas tratadas, quando comparado ao respectivo controle negativo (dose 0). Os resultados obtidos sugerem, portanto, que o óleo de *O. selloi* não é mutagênico para nenhuma das três cepas testadas.

**Tabela 5:** Potencial mutagênico do óleo essencial de *Ocimum selloi* avaliado em ensaios com *Salmonella typhimurium* na ausência e na presença de sistema extrínseco de ativação metabólica (mistura S9).

DOSE ( $\mu\text{g/placa}$ )	Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>					
	TA100		TA98		TA97a	
	- S 9	+ S 9	- S 9	+ S 9	- S 9	+ S 9
700	-	96 $\pm$ 12*	-	36 $\pm$ 13*	-	98 $\pm$ 34
600	-	102 $\pm$ 11	-	36 $\pm$ 14*	-	104 $\pm$ 31
500	43 $\pm$ 13*	136 $\pm$ 23	29 $\pm$ 8*	50 $\pm$ 8	77 $\pm$ 10*	122 $\pm$ 12
400	103 $\pm$ 13	-	34 $\pm$ 12	-	84 $\pm$ 8	121 $\pm$ 27
300	86 $\pm$ 16	127 $\pm$ 16	28 $\pm$ 4	55 $\pm$ 11	102 $\pm$ 20	177 $\pm$ 20
200	124 $\pm$ 29	137 $\pm$ 17	47 $\pm$ 14	51 $\pm$ 7	116 $\pm$ 10	219 $\pm$ 26
100	184 $\pm$ 14	180 $\pm$ 15	35 $\pm$ 8	35	135 $\pm$ 16	187 $\pm$ 7
50	178 $\pm$ 9	154 $\pm$ 9	43 $\pm$ 8	40 $\pm$ 8	151 $\pm$ 19	216 $\pm$ 7
25	199 $\pm$ 11	172 $\pm$ 8	44 $\pm$ 8	44 $\pm$ 1	133 $\pm$ 5	184 $\pm$ 12
10	193 $\pm$ 36	-	-	-	128 $\pm$ 19	-
5	188 $\pm$ 4	-	-	-	-	-
0	182 $\pm$ 16	207 $\pm$ 15	45 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	117 $\pm$ 24	180 $\pm$ 4
CP	1008 $\pm$ 11	713 $\pm$ 64	416 $\pm$ 40	592 $\pm$ 112	769 $\pm$ 53	802 $\pm$ 109

Média  $\pm$  D.P.: média  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas; Dose 0 - controle negativo: 100 $\mu\text{l}$  etanol P.A; CP-Control positivo: TA 100/-S9, A.S. (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA 100/+S9, 2AA (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA98/-S9, 2-NF (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA 98/+S9, 2AA (0,5 $\mu\text{g/placa}$ ); TA97a/-S9, 4-NQNO (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA97a/+S9, 2-AF (10 $\mu\text{g/placa}$ ); \*: toxicidade.

#### V.4.2 – TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade oral aguda do óleo de *O. selloi* foi investigada em camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas. Todas as cinco fêmeas que receberam, por entubação gástrica, 5000 mg/kg, 2000 mg/kg e 1500 mg/kg de óleo essencial, e quatro das cinco que receberam 2500 mg/kg, morreram menos de 48 horas após o tratamento (Tabela 6). A morte foi precedida de sinais clínicos tais como hipoatividade, incoordenação motora (ataxia), hiperpnéia e cianose de extremidades, que apareceram a partir de 15 minutos após o tratamento e prolongaram-se até a morte (Tabela 6). Por outro lado, todas as cinco fêmeas tratadas com 1250 mg/kg sobreviveram, sem exibir alterações dignas de registro, até o final do período de observação (14 dias) (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a maior dose não-letal do óleo de *O. selloi*, após uma única administração por via oral a camundongos

fêmeas, foi 1250 mg/kg, ocorrendo alta mortalidade a partir da dose de 1500 mg/kg (Tabela 6). Os camundongos machos pareceram ser mais resistentes do que as fêmeas em termos da toxicidade oral aguda do óleo de *O. selloi*. Apenas um camundongo macho - dos cinco tratados com 1500 mg/kg - morreu, mas todos os cinco tratados com 1250 mg/kg e os quatro que receberam 2000 mg/kg sobreviveram até o final do período de observação (14 dias) (Tabela 6). O quadro clínico também foi mais discreto entre os machos expostos ao óleo de *O.selloi*, sendo a hipoatividade e a piloereção transitórias (de 15 minutos a 48 horas pós-tratamento) as principais alterações clínicas notadas entre aqueles que receberam a maior dose (1500 mg/kg).

Os dados relativos às alterações de peso corporal, ou às variações de peso em relação ao peso antes do tratamento ( $\Delta p$ ), dos animais que sobreviveram até o final do período de observação, são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Como pode ser visto nas Tabelas 7 e 8, os camundongos machos tratados com as duas maiores doses (1500 e 2000 mg/kg) perderam mais peso durante os 4 primeiros dias pós-entubação do que o respectivo grupo controle tratado apenas com o veículo (óleo de milho). Ao final do período de observação, entretanto, parece ter ocorrido recuperação de peso corporal nestes dois grupos (Tabela 8). Entre as fêmeas sobreviventes, no entanto, as alterações de peso corporal nos grupos tratados com o óleo de *O.selloi* não diferiram de forma evidente daquelas observadas no grupo que recebeu apenas o veículo (óleo de milho) (Tabelas 7 e 8). A necrópsia dos camundongos que morreram em função do tratamento, e a dos que foram sacrificados ao final de 14 dias de observação, não revelou alterações macroscópicas dignas de registro, exceto em um único caso (macho, sobrevivente, tratado com 2000 mg/kg) em que encontramos uma perfuração no estômago.

**Tabela 6** - Toxicidade aguda do óleo essencial de *Ocimum selloi*. Mortalidade, latência para a morte (L), e quadro clínico apresentado por camundongos – machos e fêmeas – tratados por entubação gástrica com uma única dose do óleo essencial diluído em óleo de milho. Os animais foram observados por 14 dias após o tratamento. M= machos, F= fêmeas, (N) = número de animais mortos com a latência (L) assinalada.

<b>Dose</b> <b>(mg / kg po)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Mortos /</b> <b>Tratados</b>	<b>Latência (L)</b> <b>para morte (N)</b>	<b>Quadro clínico</b>
<b>5000</b>	<b>M</b>	-	-	-
	<b>F</b>	5 / 5	24h >L>1h (4) 24h>L<48h (1)	Após 15 min. até a morte: ataxia, hiperpnéia, hipoatividade, prostração e cianose nas extremidades.
<b>2500</b>	<b>M</b>	-	-	-
	<b>F</b>	4 / 5	24h >L>1h (2) 24h>L<48h (2)	Após 15 min. até a morte: ataxia, hiperpnéia, hipoatividade, prostração e cianose nas extremidades.
<b>2000</b>	<b>M</b>	0 / 4	-	Após 15 min, hipoatividade e piloereção com recuperação após 24 a 48 horas.
	<b>F</b>	5 / 5	24h >L>1h (4) 24h>L<48h (1)	Após 15 min. até a morte: ataxia, hiperpnéia, hipoatividade, prostração, cianose nas extremidades. 2 fêmeas tiveram aparente melhora clínica após 2 horas, mas morreram cerca de 16 horas após o tratamento.
<b>1500</b>	<b>M</b>	1 / 5	48h<L<72h (1)	Após 15 minutos e até 48 h (sobreviventes) ou até a morte: hipoatividade e piloereção.
	<b>F</b>	5 / 5	24h >L>1h (1) 24h>L<48h (4)	Após 15 min. até a morte: piloereção, ataxia, hiperpnéia, hipoatividade, cianose nas extremidades.
<b>1250</b>	<b>M</b>	0 / 5	-	Sem alterações
	<b>F</b>	0 / 5	-	Sem alterações
<b>0</b> (óleo)	<b>M</b>	0 / 5	-	Sem alterações
	<b>F</b>	0 / 5	-	Sem alterações
<b>0</b> (não tratado)	<b>M</b>	0 / 3	-	Sem alterações
	<b>F</b>	0 / 5	-	Sem alterações



A Tabela 9 mostra os pesos do fígado, baço, coração, pulmões, rim esquerdo e rim direito, dos camundongos, machos e fêmeas, sacrificados ao final do período de observação de 14 dias pós-tratamento. Os dados que constam da Tabela 9 indicam que o tratamento de camundongos com uma única dose do óleo essencial de *O. selloi* não alterou de forma evidente o peso dos órgãos examinados.

Em síntese, o estudo da toxicidade oral aguda do óleo de *O. selloi* para camundongos sugere que a máxima dose não tóxica para machos e fêmeas foi 1250 mg / kg de peso corporal. Os resultados também sugeriram que as fêmeas foram mais susceptíveis à toxicidade do óleo de *O. selloi* do que os machos. Todas as 10 fêmeas tratadas com as doses de 1500 mg/kg e 2000 mg/kg morreram, enquanto apenas um dos 9 machos expostos a estas doses morreu.



**Tabela 7:** Alterações de peso corporal (g) de camundongos machos e fêmeas tratados por entubação gástrica com uma única dose do óleo essencial de *Ocimum selloi* (0, 1250, 1500, 2000 e 2500 mg/kg) diluído em óleo de milho. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e referem-se apenas aos animais que sobreviveram até o final do período de observação (14 dias). N = número de animais sobreviventes. Todas as fêmeas que receberam as doses de 1500, 2000 e 5000 mg/kg morreram e apenas uma das 5 que foram tratadas com 2500 mg/kg sobreviveu.

Dose (mg/kg <i>po</i> )	Sexo	N	Dias após o tratamento								
			0	1	2	3	4	7	9	11	14
0 (não-tratado)	M	3	40,1 $\pm$ 7,9	40,1 $\pm$ 7,8	40,4 $\pm$ 6,9	40,4 $\pm$ 7,1	41,1 $\pm$ 6,6	42,6 $\pm$ 5,5	43,6 $\pm$ 5,1	46,0 $\pm$ 3,8	49,0 $\pm$ 7,3
	F	5	37,4 $\pm$ 1,5	36,3 $\pm$ 1,5	36,7 $\pm$ 1,2	36,9 $\pm$ 1,5	36,6 $\pm$ 2,0	37,9 $\pm$ 1,6	38,7 $\pm$ 3,0	39,3 $\pm$ 2,5	39,6 $\pm$ 2,6
0 (óleo de milho)	M	5	48,3 $\pm$ 6,0	48,4 $\pm$ 5,8	48,0 $\pm$ 5,0	48,0 $\pm$ 4,5	48,5 $\pm$ 3,9	48,1 $\pm$ 3,3	48,9 $\pm$ 3,0	49,2 $\pm$ 3,0	48,9 $\pm$ 3,0
	F	5	36,7 $\pm$ 1,8	35,9 $\pm$ 2,0	36,3 $\pm$ 1,9	36,7 $\pm$ 1,7	37,0 $\pm$ 1,8	37,2 $\pm$ 1,9	38,5 $\pm$ 1,3	38,6 $\pm$ 1,5	39,5 $\pm$ 2,0
1250	M	5	40,4 $\pm$ 4,6	39,3 $\pm$ 3,8	38,7 $\pm$ 4,3	40,7 $\pm$ 4,6	40,7 $\pm$ 4,0	41,8 $\pm$ 4,2	41,6 $\pm$ 4,5	42,6 $\pm$ 3,7	42,0 $\pm$ 3,2
	F	5	35,7 $\pm$ 1,8	34,8 $\pm$ 2,0	35,5 $\pm$ 1,7	35,8 $\pm$ 1,6	35,9 $\pm$ 1,7	36,8 $\pm$ 1,5	37,4 $\pm$ 1,5	37,9 $\pm$ 2,4	37,5 $\pm$ 2,9
1500	M	4	41,2 $\pm$ 2,3	37,6 $\pm$ 2,4	36,0 $\pm$ 2,5	34,9 $\pm$ 4,0	34,7 $\pm$ 4,2	36,6 $\pm$ 5,6	38,3 $\pm$ 5,4	39,5 $\pm$ 4,6	40,3 $\pm$ 4,5
2000	M	4	43,6 $\pm$ 3,8	41,0 $\pm$ 3,8	39,4 $\pm$ 3,2	39,7 $\pm$ 3,7	40,5 $\pm$ 4,1	43,3 $\pm$ 3,5	43,9 $\pm$ 2,6	44,9 $\pm$ 3,0	43,8 $\pm$ 3,9
2500	F	1	33,7	33,5	32,2	33,6	33,6	34,7	35,3	34,9	35,7

**Tabela 8:** Ganho de peso corporal em relação ao dia 0 ( $\Delta$  peso) de camundongos machos e fêmeas tratados por entubação gástrica com uma única dose do óleo essencial de *Ocimum selloi* (0, 1250, 1500, 2000 e 2500 mg/kg) diluído em óleo de milho. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e referem-se apenas aos animais que sobreviveram até o final do período de observação (14 dias). N = número de animais sobreviventes. Todas as fêmeas que receberam as doses de 1500, 2000 e 5000 mg/kg morreram e apenas uma das 5 que foram tratadas com 2500 mg/kg sobreviveu.

Dose (mg/kg <i>po</i> )	Sexo	N	$\Delta$ peso (g) durante o período de observação em relação ao peso no dia do tratamento (dia 0) ( $\Delta$ peso = peso no dia <i>x</i> – peso dia 0)							
			d 1-d 0	d 2- d 0	d 3 – d 0	d 4 – d 0	d 7 – d 0	d 9 – d 0	d 11 – d 0	d 14 – d 0
0 (não-tratado)	M	3	0,0 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 3,4	3,4 $\pm$ 4,1	5,9 $\pm$ 7,7	8,9 $\pm$ 13,7
	F	5	-1,1 $\pm$ 1,4	-0,7 $\pm$ 0,8	-0,6 $\pm$ 1,2	-0,8 $\pm$ 1,2	0,5 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 2,3	1,9 $\pm$ 2,1	2,2 $\pm$ 1,9
0 (óleo de milho)	M	5	0,1 $\pm$ 0,9	-0,2 $\pm$ 1,4	0,2 $\pm$ 2,0	0,2 $\pm$ 2,6	-0,2 $\pm$ 3,0	0,6 $\pm$ 3,7	1,0 $\pm$ 3,8	0,6 $\pm$ 4,3
	F	5	-0,8 $\pm$ 0,7	-0,4 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 1,6	1,8 $\pm$ 1,6	2,8 $\pm$ 1,5
1250	M	5	-1,1 $\pm$ 2,6	-1,7 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 1,4	1,3 $\pm$ 1,2	2,2 $\pm$ 1,4	1,6 $\pm$ 2,1
	F	5	-0,9 $\pm$ 1,4	-0,2 $\pm$ 1,3	0,1 $\pm$ 2,0	0,2 $\pm$ 2,1	1,1 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 2,1	2,2 $\pm$ 2,4	1,8 $\pm$ 3,6
1500	M	4	-3,6 $\pm$ 0,4	-5,2 $\pm$ 0,8	-6,3 $\pm$ 2,3	-6,5 $\pm$ 2,4	-4,6 $\pm$ 3,4	-2,9 $\pm$ 3,1	-1,7 $\pm$ 2,4	-0,9 $\pm$ 3,1
2000	M	4	-2,6 $\pm$ 0,8	-4,2 $\pm$ 1,8	-3,9 $\pm$ 1,1	-3,2 $\pm$ 2,4	-0,3 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 2,5	0,1 $\pm$ 3,2
2500	F	1	-0,22	-1,5	0,0	-0,1	1,0	1,6	1,2	2,0

**Tabela 9:** Peso (g) dos órgãos de camundongos machos e fêmeas tratados por entubação gástrica com uma única dose do óleo essencial de *Ocimum selloi* (0, 1250, 1500, 2000 e 2500 mg/kg) diluído em óleo de milho. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão do peso dos órgãos dos animais necropsiados ao final do período de observação (14 dias). N = número de animais necropsiados no dia 14 pós-tratamento. Todas as fêmeas que receberam as doses de 1500, 2000 e 5000 mg/kg morreram antes do dia 14 e apenas uma das 5 que foram tratadas com 2500 mg/kg sobreviveu até o final do período de observação.

Dose (mg/kg po)	Sexo	N	Peso dos órgãos (g)					
			Fígado	Baço	Coração	Pulmões	Rim	
							direito	esquerdo
0 (não tratado)	M	3	1,97 $\pm$ 0,26	0,14 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,13	0,26 $\pm$ 0,10
	F	5	1,87 $\pm$ 0,22	0,23 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01
0 (óleo de milho)	M	5	2,28 $\pm$ 0,33	0,17 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,03
	F	5	1,75 $\pm$ 0,10	0,25 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03
1250	M	5	2,26 $\pm$ 0,28	0,20 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,06
	F	5	1,56 $\pm$ 0,22	0,19 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,18
1500	M	4	2,31 $\pm$ 0,60	0,16 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,07
2000	M	4	2,10 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02
2500	F	1	2,20	0,25	0,18	0,20	0,21	0,20

## V.5- AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE: TESTE DE IRRITAÇÃO

### PRIMÁRIA EM PELE HUMANA

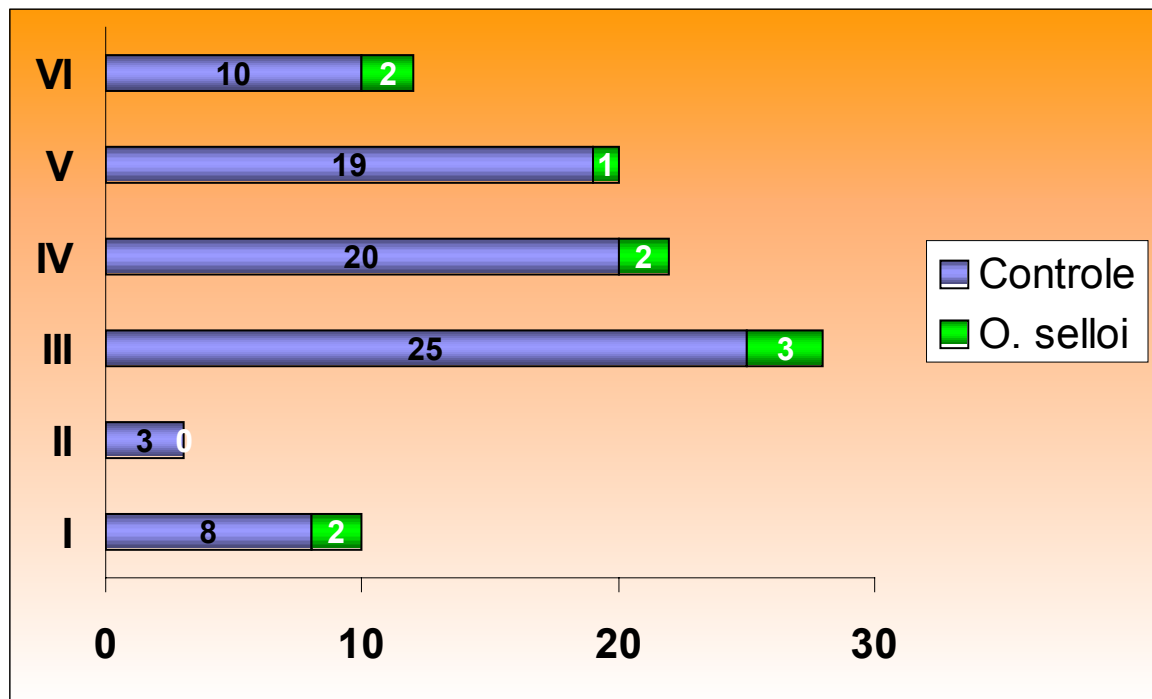
A Tabela 10 mostra o resultado do teste de irritação primária para a pele humana realizado com o óleo de *Ocimum selloi*. Nenhum dos trinta voluntários expostos ao óleo apresentou qualquer alteração indicativa de irritação dérmica, *i.e.* todos tiveram grau 0 de irritação. Por outro lado, dois dos trinta voluntários expostos (6,7%) a solução de lauril sulfato de sódio a 20% p/v (controle positivo) exibiram sinais de irritação, um de irritação leve (grau 1), e outro de irritação severa (grau 4).

**Tabela 10:** Teste de Irritação Primária em pele humana. N = número de voluntários.

Tratamento	Graus de Irritação				
	N	+	++	+++	++++
Óleo de <i>Ocimum selloi</i> 32 µL/cm <sup>2</sup>	30	0	0	0	0
Dodecil Sulfato de Sódio sol. à 20% p/v	30	1	0	0	1

## V.6- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE

O óleo de *Ocimum selloi*, testado no campo contra o mosquito *Anopheles brasiliensis*, mostrou ter ação repelente causando, no intervalo de tempo testado, uma redução média de 88% no número de picadas, em relação ao observado no mesmo voluntário na ausência do óleo.



**Gráfico 1** - Número de picadas registradas antes (controle) e após a aplicação do óleo essencial de *O. selloi* no antebraço de voluntários expostos ao mosquito *Anopheles brasiliensis* por trinta minutos.

Para comparar estatisticamente o número de picadas de mosquitos registrado antes com o número de picadas após a aplicação do óleo, usamos o teste *t* de Student para amostras pareadas (cada indivíduo foi seu próprio controle). O valor encontrado para *t* foi igual 3,930 (5 graus de liberdade) o que corresponde ao valor de  $P = 0,01107$ .

O número médio de picadas caiu de  $14,17 \pm 8,42$ , na ausência de óleo, para  $1,67 \pm 1,03$ , na presença do óleo, *i.e.* uma redução de 88, 23% ou  $12,5 \pm 7,8$  picadas de mosquito em 30 minutos de exposição. Na área tratada com o repelente DEET (face), que foi usado como controle positivo, não foi constatada nenhuma picada de mosquito no intervalo de tempo do teste.

**Tabela 11:** Avaliação da atividade repelente de solução etanólica do óleo de *Ocimum selloi* a 10% v/v contra o mosquito *Anopheles brasiliensis*. Os dados referem-se ao número de picadas de mosquito registradas no antebraço durante o período de 30 minutos, sendo cada indivíduo o seu próprio controle. N = número de voluntários.

Tratamento	N	Média	DP	Valor mínimo	Valor máximo	(%)
Controle (etanol)	6	14,17	8,42	3	25	100,00
Óleo de <i>O. selloi</i> 10% v/v	6	1,67*	1,03	0	3	11,77
Redução	6	12,50	-	-	-	88,23

\*  $P < 0,05$ ; teste *t* de Student pareado.

## VI - DISCUSSÃO

### VI. 1 – DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO

#### ESSENCIAL DE *O. selloi*

Na extração do óleo essencial a partir das folhas de *O. selloi* obtivemos um rendimento de 1,34% em volume por peso (v/p). Este rendimento é muito superior ao rendimento de 0,12% obtido para a extração a partir do material fresco por Morhy (1973). O rendimento da extração que realizamos foi também superior aos rendimentos obtidos por Vieira & Simon (2000), que foram de 0,5% para a planta coletada em São Paulo e de 0,3 % para a planta coletada no Rio de Janeiro. Estes mesmos autores obtiveram ainda um rendimento de 2,3% na extração do óleo essencial de *Ocimum basilicum*. Vale a pena destacar que, entre as espécies coletadas no campo, o *O. basilicum* foi aquela em que se obteve o melhor rendimento na extração do óleo essencial.

Morhy (1973) encontrou um índice de refração ( $^{20}_{n_D}$ ) de 1,5402 para o óleo essencial de *O. selloi* analisado imediatamente após a hidrodestilação. Esse resultado é comparável ao que foi obtido no presente estudo, ou seja: 1,5294.

De acordo com Simões *et al.* (1999) os parâmetros físicos são de fundamental importância para a avaliação da qualidade de um óleo volátil obtido de matéria-prima vegetal ou de um medicamento que o contenha. Além disso, as informações obtidas nas análises físicoquímicas não devem ser consideradas isoladamente e sim em conjunto com a análise por cromatografia gasosa dos constituintes químicos.

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel o tolueno-acetato de etila, na razão de 93:7, e como revelador a vanilina sulfúrica, mostrou um



desempenho adequado para a separação dos constituintes químicos do óleo essencial de *Ocimum selloi*.

A análise cromatográfica em CCD revelou uma mancha cor rósea com Rf de 0,84, semelhante ao padrão de anetol e de acordo com o indicado por Wagner *et al.* (1983).

Por outro lado, a análise por GC/MS-MSD revelou o estragol (55,38%), o *trans*-anetol (34,23%), e o *cis*-anetol (3,94%), como sendo os principais componentes do óleo essencial extraído das folhas de *O. selloi*. Morhy (1973) verificou, através de CG, a presença de metilchavicol (estragol), *cis*- e *trans*-anetol em amostras de *O. selloi* provenientes de São Paulo e cultivadas em Brasília. No presente estudo, portanto, obtivemos resultados semelhantes aos relatados por esse pesquisador.

Martins *et al.* (1997), estudando duas variedades de *Ocimum selloi* Benth., cultivadas na Universidade Federal de Viçosa, encontrou diferenças qualitativas com relação à composição do óleo essencial obtido das folhas e flores dessa espécie. No óleo obtido das folhas, o principal componente identificado foi o estragol (94,95%), enquanto o metil-eugenol foi o constituinte preponderante nas flores (65,49%). Vieira & Simon (2000), estudando duas variedades de *O. selloi* provenientes de Botucatu, São Paulo e Campos, Rio de Janeiro respectivamente, encontraram 38,9% e 30,6% de estragol. Outros componentes importantes detectados por estes pesquisadores nas duas variedades foram, respectivamente, o  $\beta$ -cariofileno (7,3% e 9,5%), o bisaboleno (10% e 6,1%) e o timol (4,3 % e 7,9%).

Amaral & Casali (2000) realizaram um estudo para identificação e caracterização de *O. selloi* por meio de marcadores imunoenzimáticos. Duas populações foram estudadas: uma coletada em Nova Friburgo - Rio de Janeiro, e outra em Tiradentes - Minas Gerais.

Estes autores verificaram que as populações apresentavam isoenzimas com padrões eletroforéticos marcadamente distintos e peculiares. Dessa forma, parecem existir variedades fenotípicas e químicas de *Ocimum selloi* Benth., o que reforça a necessidade da avaliação da constituição química do óleo essencial da planta coletada em Ponta Grossa, Paraná.

Segundo Vincenzi *et al.* (2000) o estragol é amplamente utilizado como aditivo alimentar, sendo considerado como *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*), ou seja, reconhecido como seguro, além de ser aprovado pelo *USFDA* (*United States - Food and Drug Administration*).

Simões *et al.* (1999) afirmam que o anetol ocorre amplamente no reino vegetal, sendo o principal constituinte dos óleos voláteis de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), *Foeniculum vulgare* Miller (funcho) e *Illicium verum* Hook. f. (anis-estrelado).

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Ocimum* mostraram diferenças marcantes entre espécies quanto a composição química dos óleos essenciais. No caso do óleo volátil de *O. suave* Wild, Chogo & Crank (1981) encontraram uma proporção de 71,5% de eugenol. Cimanga *et al.* (2001) observaram que, nos óleos essenciais extraídos das folhas de *O. americanum* L. e de *O. gratissimum* L., o timol constitui o componente principal, correspondendo a 43,4% e 53,2% dos óleos, respectivamente. Vieira & Simon (2000) detectaram diferenças na composição química entre duas variedades de *O. basilicum*, tendo encontrado, em uma das variedades, 46,3% de metil-cinamato, e na outra, 50% de linalol e 40% de metil-chavicol.

Variações entre espécies foram constatadas também por Alonso (1998), que identificou como principais compostos encontrados nos óleos essenciais da família Lamiaceae, o linalol que constitui até 75% do óleo em algumas variedades, o metil chavicol que chega a 87% e o eugenol, que constitui até 20% do óleo.

Conforme Yunes & Calixto (2001), o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* Blume apresenta atividade antifúngica sendo ativo contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*, além de ser ativo também contra as leveduras *Candida albicans*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*.

## VI. 2- ESTUDOS DE TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Os estudos de mutagenicidade realizados no presente trabalho mostraram que o óleo essencial de *O. selloi*, contendo 55,38% de estragol não foi mutagênico para as cepas TA100, TA98 e TA97a. Esses resultados já são um forte indicativo de que essas substâncias não são mutagênicas, pois somente a TA100 e a TA98 já representariam a bateria mínima de linhagens utilizadas no teste de Ames para detectar compostos como mutagênicos ou não-mutagênicos, uma vez que, juntas, detectam os dois tipos genéricos de mutações gênicas (substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura). Neste caso, nenhuma das substâncias analisadas foi capaz de interagir com o DNA bacteriano para causar mutação de ponto (detectável pela cepa TA100) ou do tipo *frameshift* (detectável pelas TA98 e TA97a).

De Vincenzi *et al.* (2000), publicaram uma revisão sobre a toxicidade não-clínica do estragol, principal constituinte químico do óleo essencial de *O. selloi*. Esses autores mencionaram dados controversos, com relação a genotoxicidade do estragol. Alguns trabalhos demonstraram que o estragol não apresentava atividade mutagênica quando avaliado em procariotos (ensaios de mutação reversa em cepas de *Salmonella typhimurium* e em *Escherichia coli* WP2), com ou sem ativação metabólica, ou em ensaios de reparo do DNA realizados em *Bacillus subtilis* sem a adição de fração S9. Entretanto, outras publicações citadas por De Vincenzi *et al.* (2000) relataram que o estragol e os seus metabólitos 1-hidroxiestragol e 1-acetoxiestragol produziram, no teste de Ames, resultados positivos com as cepas de *S. typhimurium* TA1535 e TA100, com ou sem ativação metabólica, e negativos com a linhagem TA98. O estragol também foi mutagênico para a TA1537.

Os resultados claramente negativos – no teste de Ames - apresentados neste trabalho, sugerem que o óleo de *O. selloi* e o seu principal constituinte estragol não são mutagênicos.

Esse dado é coerente com grande parte da literatura sobre a genotoxicidade do estragol, mas conflitante com alguns outros estudos citados por Vincenzi *et al.* (2000).

Por outro lado, é interessante registrar que a formação, em células hepáticas, de adutos de DNA com metabólitos do estragol (1-hidroxiestragol, 1-hidroxi-2',3'-dihidroestragol e acetoxiestragol) foi demonstrada, *in vivo* e *in vitro* (Vincenzi *et al.*, 2000). Além disso, a administração oral, subcutânea ou intraperitoneal do estragol e do 1-hidroxiestragol, a camundongos CD-1 e B6C3F1, induziu o aparecimento de tumores, principalmente hepatomas (Vincenzi *et al.*, 2000). Assim, em que pese o fato dos nossos resultados apontarem para a conclusão que o óleo de *O. selloi* (e o estragol) não são mutagênicos *in vitro*, é recomendável o aprofundamento da investigação do potencial genotóxico com a realização de ensaios *in vivo* em roedores.

## VI. 2- TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

O estudo da toxicidade oral aguda do óleo volátil de *O. selloi* em camundongos indica que este não causou efeitos adversos evidentes em doses até 1250 mg/kg. Em doses iguais ou superiores a 1500 mg/kg, no entanto, o óleo matou a quase totalidade das fêmeas expostas. Os machos, por outro lado, pareceram ser mais resistentes e apenas sinais clínicos de menor intensidade e transitórios e uma única morte (entre 9 tratados) ocorreu nas doses de 1500 e 2000 mg/kg. Infelizmente, em virtude da limitada quantidade de óleo de *O. selloi* disponível para o teste, não foi possível investigar doses mais altas (2500 e 5000 mg/kg) em machos. De qualquer modo os nossos resultados claramente indicam a existência de diferenças entre sexos quanto a susceptibilidade aos efeitos tóxicos do óleo de *O. selloi*.

A toxicidade oral aguda em camundongos, particularmente em fêmeas, pode ser considerada como de ligeira a moderada. É recomendável, entretanto, a realização de estudos

adicionais de toxicidade de doses únicas em outras espécies (e.g. ratos) e de doses repetidas em camundongos e em outros roedores.

### VI. 3- ESTUDO DA AÇÃO REPELENTE

O método empregado neste estudo para avaliar a atividade repelente de mosquitos foi uma adaptação dos métodos realizados em campo por Trigg (1996); Yap, *et al.* (1998); e Yap, Jahangir & Zairi (2000). De acordo com o que foi proposto por Yap (1998), alguns cuidados, como a utilização de cada voluntário como seu próprio controle, foram tomados para evitar que eventuais diferenças inter-individuais quanto a atração do mosquito e susceptibilidade à picadas, tornassem o teste pouco sensível.

A ação repelente de mosquitos das plantas da família Lamiaceae, inclusive as do gênero *Ocimum*, tem sido estudada por diversos pesquisadores. Estes estudos foram realizados com várias espécies de mosquitos vetores de doenças e utilizaram diferentes métodos para evidenciar a atividade repelente. Em que pese as diferentes abordagens, a efetividade da ação repelente de mosquitos tem sido consistente em *Ocimum* spp.

Neste estudo demonstramos que a espécie *Ocimum selloi* não fugiu à regra, ficando clara sua atividade repelente, contra o *Anopheles brasiliensis*, onde obtivemos uma redução de 88% no número de picadas após a aplicação do óleo. O valor de *P* foi de 0,011 indicando que essa diferença foi estatisticamente significativa.

White (1973) demonstrou a ação repelente de duas espécies de *Ocimum*, o *O. americanum* e o *O. suave*, contra o *Aedes aegypti*, transmissor da febre amarela e do dengue. Outros autores, como por exemplo Palsson & Jaesson (1999), confirmaram esta ação, estudando o *O. americanum* (*O. canum*). Chogo & Crans (1981) foram além, após terem estudado a ação repelente do *O. suave*, retiraram o seu principal componente, o eugenol. Os

pesquisadores citados encontraram então resultados que sugeriram que a ação repelente destas espécies de *Ocimum* devia-se ao alto teor de eugenol. Entretanto o *O. selloi* exibe como componentes majoritários o metil chavicol (ou estragol) e o anetol, não apresentando proporções significativas de eugenol.

Quando se analisa as estruturas químicas do estragol, do anetol e do eugenol, observa-se que estes componentes químicos são fenilpropanóides, provenientes da redução da cadeia lateral do ácido cinâmico, apresentando portanto a mesma origem biogênica. Esse fato poderia justificar a ação repelente encontrada nas espécies estudadas.

A ação repelente do óleo de *O. selloi* constatada neste trabalho foi avaliada contra o *A. brasiliensis*. Embora se tenha notícia da presença de *Plasmodium sp* infectando esta espécie de anofelino em regiões endêmicas de malária, felizmente ela ainda é considerada como sendo de importância secundária na transmissão de doenças (Póvoa *et. al.*, 2001).

Apesar deste trabalho ter evidenciado um claro efeito repelente, estudos adicionais devem ser realizados para determinar o tempo de persistência da ação repelente deste óleo volátil, bem como para testá-lo contra outras espécies do gênero *Anopheles* de maior importância como vetores de doenças.

#### **VI. 4- CONCLUSÕES**

Neste trabalho determinamos as características físico-químicas e identificamos os principais componentes (*e.g.* estragol e trans-anetol) do óleo essencial obtido das folhas de *Ocimum selloi* coletadas na região de Ponta Grossa, estado do Paraná.

Os dados preliminares obtidos para caracterizar o perfil toxicológico do óleo de *O. selloi* mostraram ausência de indícios de mutagenicidade no teste de Ames e toxicidade oral aguda em camundongos que pode ser classificada como sendo de ligeira a moderada. Embora

esses resultados preliminares não desaconselhem o uso do óleo como repelente, estudos adicionais (*e.g.* genotoxicidade *in vivo*, toxicidade aguda em ratos e toxicidade de doses repetidas em camundongos) são recomendados como etapas subseqüentes para melhor caracterização do perfil toxicológico e da segurança deste uso.

Os resultados preliminares obtidos neste estudo também indicaram que o óleo de *O. selloi* não foi irritante para a pele humana e exibiu claramente atividade repelente de mosquitos. Neste aspecto esses resultados promissores aqui apresentados recomendam fortemente a realização de estudos adicionais para avaliar o potencial irritante em exposições repetidas, a persistência da atividade repelente e a repelência de outras espécies de mosquitos.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, J.R. 1998. *Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones.

AMARAL, C.F.L. & CASALI, V.W.D. 2000. Identification and characterization of two populations of “alfavaca” (*Ocimum selloi* Benth.) by isoenzyme markers. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2: 9-15.

BARNARD, D.R.; POSEY, K.H.; SMITH, D. & SCHERER, C.E. 1998. Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellents tests. *Medical and Veterinary Entomology*, 12: 39-45.

BASKETTER, D.A.; CHAMBERLAIN, M.; GRIFFITHS, H. A. et al. 1997. The Classification of Skin Irritants by Human Patch Test. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 845-852.

BROWN, M. & HERBERT, A. 1997. Insect Repellents: An overview. *Journal of American Academy of Dermatology*, 36: 243-9.

BRUNETON, J. 1991. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Barcelona: editorial Acribiá.

CHOGO, J.B. & CRANK, G. 1981. Chemical Composition and Biological Activity of Tanzanian Plant *Ocimum suave*. *Journal of Natural Products*, 44: 308-311.



CIMANGA, K.; KUMBU, K.; APERS, S.; BRUYNE, T.D.; TOTTE, J.; PIERTERS, P.; VLIETINCK, A. J. 2001. 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*, article in press.

CUTIS, S.F. 1991. Natural and Synthetic repellents. In: Cutis, C.F. (Ed.), *Control of Disease Vectors in the Community*. Wolfe, London, 75-92.

DAVIS, E.E. & BOWEN, M. F. 1994. sensory Physiological Basis for Attraction in Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10: 316-325.

DEBBOUN, M. STRICKMAN, D.; KLEIN, T.A.; GLASS, J. A.; WYLIE, E.; LAUGHINGHOUSE, A.; WIRTZ, R.A.; GUPTA, R.K. 1999. Laboratory evaluation of AI3-37220, AI3-35765, CIC-4, and DEET repellents against three species of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15: 342-347.

DE VICENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F & SCAZZOCCHIO, B.S. 2000. Constituents of Aromatics Plants: II. Estragole. *Fitoterapia*, 71: 725-729.

DOGAN, E.B.; AYRES, J.W.; ROSSIGNOL, P.A. 1999. Behavioral mode of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 97-100.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA.** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ateneu, 1988.

FATOPE, M. O. 1995. Cowpea weevil bioassay: A Simple Prescreen for Plants with Grain Protectant Effects. *International Journal of Pest Management*, 41:84-86.

FIDALGO, O. & BONONI, V.L.R. 1986. *Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico*. São Paulo: Instituto de Botânica.

FLOORE, T. 2000. Mosquito Information. *The American Mosquito Control Association*. 17 outubro 2001. <<http://www.mosquito.org/mosquito.html>>

FORATINI, O. P. 1962. *Entomologia Médica*. São Paulo: Tipografia EDANEE S.A.

FRADIN, M.S. 1998. Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide. *Annals of Internal Medicine*, 128: 931-940.

GEIER, M; BOSH, O; BOECKH, J. 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chemical Senses*, 24: 647-653.

GILLIES, M.T. 1980. The Role of Carbon Dioxide in Host-Feeding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bulletin of Entomology Research*, 70: 525-532.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I; PAUMGARTTEN, FJR. 1998. Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, 416: 129-136.

GOMES-CARNEIRO, M.R. 1997. *Avaliação do Potencial Mutagênico de Monoterpenos Presentes em Óleos Essenciais*. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro: Pós-graduação em Ciências, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.

MARON, D.M. & AMES, B. 1983. Revised Methods for the *Samonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

MARQUESINI, N.R. 1995. *Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil – Guarani, Kaingang, Xogleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá*. Dissertação de mestrado, Curitiba: Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MARTINS, E. R.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A. & CARAZZA, F. (1997). Essential Oil in the Taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 8: 29-32.

MOHRY, L. 1973. Metil-Chavicol, *cis* e *trans*-Anetol no Óleo Essencial de *Ocimum selloi* Benth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 45: 401-412.

PALSSON, K. & JAENSON, T.G.T. 1999. Plant Products Used as Repellents in Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica*, 72: 39-52.

PANEESA, S. 1997. *Plantas que curam. Cheiro de mato*. São Paulo: IBRASA.

PATIL, S. M.; PATRICK, E. & MAIBACH, H. I. 1996. Animal, Human, and *in vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation. In: *Dermatotoxicology* (F. N. Marzulli & H. I. Maibach), pp. 411-436, Washington: Taylor & Francis.

PÓVOA, M. M.; WIRTZ, R.A.; LACERDA, R.N.L.; MILES, M.A.; WARHURST, D .2001. Malaria Vectors in the Municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 179-184.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. 1996. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Media: Williams & Wilkins.

SCHERECK, C.E. 1977. Techniques for the evaluation of insects repellents: a critical review. *Annual Review of Entomology*, 22:101-119.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. UFRGS/ ed. UFSC.

SINGH, G.; UPADHYAY, R.K. 1993. Essential Oils: A potent Source of Natural Pesticides. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 52: 676-83.

SUKUMAR, K.; PERICH, M. & BOOBAR, L. L. 1991. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A Review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7: 210-237.

SUTHERLAND, D.J. & CRANS, W.J. 2001. Mosquitoes in your life. *New Jersey Agriculture Experiment Station Publication*. 12 janeiro 2002 <<http://www-rci.rutgers.edu/~insects/moslife.htm>>.

TAWATSIN, A.; WRATTEN, D.S.; SCOTT, R.R.; THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. 2001. Repellency of Volatile Oils From Plants Against Three Mosquito Vectors. *Journal of Vector Ecology*, 26: 76-82.

- TESKE, M. & TRENTINI, A.M. 1995. *Compêndio de Fitoterapia*. Curitiba: Herbarium..
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 22<sup>nd</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.
- TRIGG, J.K. 1996. Evaluation of a *Eucalyptus*-based repellent against *Culicoides impactus* (Diptera: Ceratopogonidae in Scotland). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12: 329-330.
- VERPOORTE, R. 1998. Antimicrobially Active Alkaloids. In: *Alkaloids; Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications* (M.F. ROBERTS & M. WINK), pp. 397-433, New York: Plenum Press.
- VIEIRA, R. F. & SIMON, J.E. 2000. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Economic Botany*, 54: 207-216.
- WAGNER, H.; BLADT, S. & ZGAINSKI, E.M. 1983. *Dragenanalyse: Dunnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Berlin: Springer-Verlag.
- WALKER, A. P.; BASKETTER, B. A.; BAVEREL, M.;DIEMBECK, W.; MATTHIES, W.; MOUGIN, D.; ROTH LISBERGER, R.; COROAMA, M. 1997. Test Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients in Man. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 1099-1106.
- WHITE, .B. 1973. The insect repellent value of *Ocimum* spp. (Labiatae): traditional anti-mosquito plants. *East African Medical Journal*, 50: 249-252.

WHO (World Health Organization), 1985. *Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. Environmental Health Criteria*. Geneva: WHO.

YAP, H. H.; JAHANGIR, K.; CHONG, A.S.C.; ADANA, C.R.; CHONG, N.L.; MALIK, Y.A. & ROHAIZAT, B.. 1998. Field Efficacy of New Repellent, KBR 3023, Against *Aedes albopictus* (SKUSE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in a Tropical Environment. *Journal of Vector Ecology*, 23: 62-68.

YAP, H. H.; JAHANDIR, K. & ZAIRI, J. 2000. Field Efficacy of Four Insect Repellent Products Against Vector Mosquitoes in a Tropical Environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 16: 241-244.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. 2001. *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos.

< <http://www.bioscis.ohio-state.edu/~parasite/anopheles.html> > 21/04/2002.

< <http://ulb.ac.be/sciense/biodic/imdiptere002.html> > 20/04/2002.

< <http://www.howstuffworks.com/gif/mosquito4a.jpg> > 20/04/2002.

## VIII – ANEXOS

### ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado a participar de uma etapa da pesquisa “ESTUDO DA AÇÃO REPELENTE DO ÓLEO DE *Ocimum selloi* Benth. CONTRA *Anopheles brasiliensis* (CHAGAS) 1907”. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (UEPG).

Os objetivos deste estudo são avaliar a composição química, irritação primária e a ação repelente do óleo de *O.selloi*, planta popularmente conhecida como anis do campo, erva doce silvestre, alfavaca do mato, hortelã bravo, que tem sido usada popularmente como digestivo, e para tratar gastrite, tosse, dores nas pernas, entre outras. Não há, entretanto comprovação científica de que a planta seja eficaz para essas finalidades terapêuticas. Por outro lado, não há também relatos de efeitos tóxicos resultantes deste uso popular. Ensaio preliminares feitos no nosso laboratório demonstram que o óleo essencial que será estudado apresenta baixa toxicidade aguda e não é mutagênico (isto é o óleo não causa dano ao material genético).

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá na aplicação do óleo em estudo no antebraço por um período de quatro horas. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se ao aparecimento de vermelhidão no local da aplicação e eventuais reações alérgicas ao óleo. Esta etapa da pesquisa terá como benefício descobrir se o óleo de *O. selloi* tem potencial irritante à pele.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação em qualquer momento.

**Declaro que não tenho conhecimento de ser alérgico, e que entendi os objetivos e riscos de minha participação nesta etapa da Pesquisa e concordo em participar.**

---

Sujeito da Pesquisa

---

Josiane Padilha de Paula<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> JOSIANE PADILHA DE PAULA – Av. Carlos Cavalcanti, 3342 – Ponta Grossa PR

## ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “ESTUDO DA AÇÃO REPELENTE DO ÓLEO DE *Ocimum selloi* Benth CONTRA *Anopheles brasiliensis* (CHAGAS) 1907”. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (UEPG).

Os objetivos deste estudo são avaliar a composição química e a ação repelente do óleo de *O.selloi*, planta popularmente conhecida como anis do campo, erva doce silvestre, alfavaca do mato, hortelã bravo, que tem sido usada popularmente como digestivo, e para tratar gastrite, tosse, dores nas pernas, entre outras. Não há, entretanto comprovação científica de que a planta seja eficaz para essas finalidades terapêuticas. Por outro lado, não há também relatos de efeitos tóxicos resultantes deste uso popular. Ensaio preliminares feitos no nosso laboratório demonstram que o óleo essencial que será estudado apresenta baixa toxicidade aguda e não é mutagênico (isto é o óleo não causa dano ao material genético).

Sua participação nesta pesquisa consistirá na aplicação do óleo em estudo no antebraço e posterior exposição do braço direito ao mosquito *A. brasiliensis*, bem como a exposição do braço esquerdo sem o óleo ao *A. brasiliensis*, conhecido como pernilongo. Os mosquitos serão provenientes da criação da UEPG (Universidade Estadual de Ponta Grossa) não havendo qualquer risco de transmissão de doenças. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se ao aparecimento de vermelhidão no local da aplicação e eventuais reações alérgicas ao óleo ou à picada.

A pesquisa terá como benefício descobrir se o óleo de *O. selloi* tem atividade repelente, o que possibilitará seu uso para proteger indivíduos de doenças transmitidas por mosquitos (e.g. malária, dengue, febre amarela).

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação em qualquer momento.

**Declaro que não tenho conhecimento de ser alérgico à picada de mosquitos, e que entendi os objetivos e riscos de minha participação no Pesquisa e concordo em participar.**

---

**Sujeito da Pesquisa**

---

**Josiane Padilha de Paula<sup>2</sup>**