

# Análise das Propriedades Antioxidantes da *Ocimum gratissimum* e Seu Papel no Processo de Antienvelhecimento

## Analysis of Antioxidant Properties of *Ocimum gratissimum* and Its Role in the Process of Antiaging

Dálila Dias Costa<sup>1</sup>, Túlio César Ferreira<sup>2</sup>, Débora Mesquita Guimarães Fazzio<sup>1</sup>

**Resumo:** A preocupação com a saúde e a estética tem aumentado ao decorrer dos anos, necessitando-se de estudos cada vez mais aprofundados. O envelhecimento precoce é desencadeado por diversos fatores, mas um dos principais são o excesso de radicais livres no organismo, o que leva ao dano nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a perda de funções biológicas como a alteração na estrutura do colágeno. A ingestão adequada de antioxidante auxilia no combate aos radicais livres.

**Objetivo:** Analisar: o potencial antioxidante do extrato aquoso de alfavaca (*Ocimum gratissimum*) contra danos ao DNA e associar esse potencial como um tratamento auxiliar contra o envelhecimento precoce. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental no qual foram montados *in vitro* sistemas geradores de dano oxidativo à molécula de DNA alvo (plasmídeo bacteriano) por meio da adição de extratos da planta medicinal (*Ocimum gratissimum*) em diferentes concentrações. Os níveis de proteção ao DNA por compostos antioxidantes presentes nos extratos vegetais foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose.

**Resultados:** Os resultados mostraram que houve real proteção somente na amostra contendo extrato bruto em ambos os estudos realizados com a planta desidratada. Já nos estudos feitos com a planta *in natura*, o resultado foi inconclusivo.

**Conclusão:** O estudo revelou que há presença de antioxidantes na infusão do extrato bruto de alfavaca. O envelhecimento precoce da pele está diretamente ligado à presença de radicais livres no organismo, podendo-se associar o consumo da alfavaca na terapêutica antienvelhecimento. Embora sejam necessárias análises mais refinadas sobre essas moléculas antioxidantes.

**Palavras chave:** *Ocimum gratissimum*, antioxidante, radicais livres, envelhecimento.

<sup>1</sup> Curso de Nutrição, Universidade Paulista (UNIP), Campus Brasília-DF

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB)-DF.

### Correspondência:

Dálila Dias Costa. Qr 405. Conjunto 02. Casa 07. Samambaia Norte-DF. CEP: 72.319-202. E-mail: dalila\_ddc@hotmail.com.

Recebido em: 11/12/2012  
Aceito em: 31/12/2012.

**Abstract:** Concern about health and aesthetics have increased through the years, thus, there is a need of further studies. Aging is triggered by several factors, but the main one is the excessive amount free radicals in the body, leading to damage to DNA (deoxyribonucleic acid) molecules and loss of biological functions such as changes in the collagen's structure. Diminishing The Action Of free radicals is supported by the adequate intake of antioxidants.

**Objective:** The objective of this article is to analyse the usage of the aqueous extract of Alfavaca (*Ocimum gratissimum*) against DNA damage and associate its potential as an adjunctive treatment against premature aging.

**Methods:** An experimental study was made, in which generator systems of oxidative damage to the target DNA molecule (bacterial plasmid) were assembled *in vitro*, through the addition of medicinal plants' extracts (*Ocimum gratissimum*) in varied concentrations. The levels of DNA protection by the antioxidant compounds existent in plant extracts were analyzed by electrophoresis in agarose gel.

**Results:** The results show that there only was genuine protection in the sample containing crude extract among the two studies done with the dried plant. The study conducted with the fresh plant had inconclusive results nevertheless, there is a need of more accurate analysis about these antioxidant molecules.

**Conclusions:** The study revealed that there antioxidants became present during the infusion of crude extract fusion of basil. Premature aging of the skin is directly linked to the presence of free radicals in the body, and can be associated with the consumption of basil in the adjuvant treatment against aging.

**Keywords:** *Ocimum gratissimum*, antioxidant, free radicals, aging.

## INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento se dá por diversos fatores, mas um dos principais deles é o gerado por danos nas moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) desencadeados pelo excesso de radicais livres (RL) circulantes. Esse fenômeno leva a sua oxidação a qual pode causar o rompimento da dupla fita ou ainda retirar uma de suas bases. A hidroxilação, a desidrogenação e a glicação protéica são frutos de tais reações na qual a última é responsável por perdas das funções biológicas de proteínas como as proteoglicanas e o colágeno, alterando assim toda a estrutura da pele, o que leva a flacidez<sup>1</sup>.

A alfavaca (*Ocimum gratissimum*) tem seu uso muito comum na medicina caseira sendo usada para doenças como diarreia (antidiurético), cefaléia, problemas respiratórios e febre tifóide cujos efeitos mais comuns incluem os sudorífico, diurético e carminativo, principalmente quando consumida na forma de chá<sup>2</sup>.

A alfavaca caracteriza-se por ser uma planta rica em óleos essenciais como o timol e o eugenol, sendo estes óleos substratos metabólitos ricos em antioxidantes que atuam neutralizando os RL e inibindo a peroxidação lipídica. É de grande relevância o estudo mais aprofundado sobre o potencial antioxidante dessa planta e sua possível proteção ao dano nas moléculas de DNA<sup>3</sup>.

Os antioxidantes têm por função no organismo proteger as células de lesões, podendo ser eles de prevenção, de varredura ou de reparo. A deficiência de antioxidantes ou o excesso de RL pode levar o organismo ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, induzir lesões ao DNA<sup>4</sup>.

O presente estudo tem o objetivo de analisar as propriedades antioxidantes do extrato aquoso (chá) de *Ocimum gratissimum* contra danos ao DNA e sua possível atuação no processo de antienvhecimento.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) no período compreendido entre setembro e novembro de 2012.

### Preparação da amostra

Para o preparo da amostra foram utilizadas folhas desidratadas de alfavaca (*Ocimum gratissimum*) vendida por raizeiro de uma feira permanente de Ceilândia-DF. As folhas foram compradas e armazenadas em local escuro até o dia da análise laboratorial e a amostra *in natura* (cultivada sem agrotóxico) foi colhida em uma chácara situada no Guará I-DF. As folhas foram higienizadas e congeladas até o dia da análise.

### Preparação de extratos

As folhas de *Ocimum gratissimum* foram maceradas em um almofariz com o auxílio de um pistilo (ambos de cerâmica) até ficarem em pedaços bem pequenos. Logo após, foram pesados 1g em uma balança de precisão e foi preparada uma infusão com 10mL de água deionizada quente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o resfriamento, retirou-se 1mL somente a parte aquosa da infusão e colocou-se em um tubo de microcentrifuga de 1,5mL. A amostra foi centrifugada durante dois minutos a 12.000rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifuga novo, a partir do qual foi feita a preparação de amostras diluídas.

### Diluições dos extratos

A diluição dos extratos foi feita em água deionizada em seis concentrações diferentes usando micropipetas para maior precisão (Quadro I).

**Quadro I - Componentes utilizados para cada diluição e suas respectivas quantidades do extrato bruto**

Diluição	Extrato	Água
Bruto	1 mL	--
1:10	50 µL	450 µL
1:20	50 µL (1:10)	50 µL
1:40	50 µL (1:20)	50 µL
1:80	50 µL (1:40)	50 µL
1:160	50 µL (1:80)	50 µL
1:320	50 µL (1:160)	50 µL

*Análise antioxidante dos extratos*

Para a preparação das reações foram separados nove tubos de microcentrifuga de 1,5mL e adicionados água deionizada, tampão Hepes pH 7,2, DNA plasmidial (pUC 19, Invitrogen®), sulfato de ferro hexahidratado ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), extrato de planta e por fim peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para dar início à reação. Após dez minutos, contados a partir da adição do último composto ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), foram adicionados 5µL de tampão de amostra de DNA (50% glicerol (p/v), 0,25% azul

de bromofenol (p/v), tampão TEB) em cada tubo para parar a reação. Esse método foi realizado conforme descrito por Avellar et al<sup>5</sup>.

### Eletroforese em gel de agarose

A preparação do gel de agarose e a eletroforese foram feitas conforme protocolo padrão descrito em Sambrook et al.<sup>6</sup> e também por Magalhães et al.<sup>7</sup>. O gel de agarose foi preparado adicionando-se 0,4 gramas de agarose (SigmaAldrich) em um Erlenmeyer contendo 50mL de (tampão TEB 0,089M Trizma base, 0,089 M ácido bórico, 0,008M EDTA). A solução foi fervida em forno microondas por aproximadamente dois minutos e após um resfriamento breve da solução foi adicionado o corante de DNA brometo de etídeo para uma concentração final de 5µg/mL. Em seguida, a solução de gel foi derramada em uma forma retangular. Dois pentes de acrílico foram posicionados um na extremidade do molde e outro no meio, estando eles imersos na solução de gel ainda em estado líquido.

Após o endurecimento do gel, os pentes foram retirados e o gel submerso em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida (tampão TEB). Todo o volume da reação foi aplicado em cada um dos poços e submetido à técnica de eletroforese (Quadro II). Depois de 40 minutos, o gel foi retirado da cuba e colocado sobre um transluminador de luz ultravioleta para visualização do DNA. A imagem foi capturada por um sistema de captura de imagem da marca Sony®.

### Quadro II. Soluções que compõem o sistema gerador de

#### dano oxidativo ao DNA e extrato de alfavaca.

Componentes da reação	Controle positivo	Controle negativo	Extrato bruto	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Água deionizada	8	18	3	3	3	3	3	3	3
Hepes (170 mM, pH 7,2)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DNA (100 ng/µL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ferro (0,4 mM)	5		5	5	5	5	5	5	5
Extrato (100 mg/mL)			5	5	5	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3mM)	5		5	5	5	5	5	5	5

## RESULTADOS

A captura de imagem da primeira análise mostrou um dano significativo na amostra correspondente ao controle positivo (poço 1, onde a reação é constituída de DNA e o sistema gerador de radicais livres; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>•</sup> + OH<sup>-</sup>). As amostras contendo o extrato aquoso de alfavaca revelaram uma real proteção somente na amostra contendo extrato bruto em ambos os estudos realizados (Figura 1).

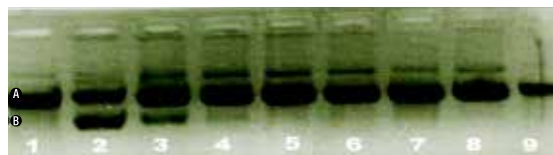
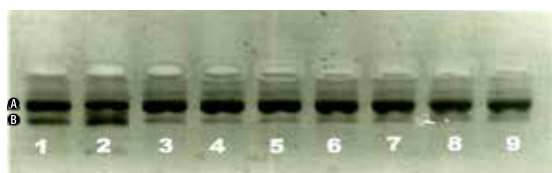


Figura 1. Análise de DNA Plasmidial em gel de agarose a 0,8% e diluições do extrato aquoso de alfavaca usando amostra desidratada (*Ocimum gratissimum*). "A" indica banda superior com DNA frouxo e "B" indica banda inferior com DNA em estado mais compactado. (1) Controle positivo (com dano), (2) controle negativo (sem dano). Poços 3 a 9 correspondem as reações contendo sistema gerador de dano + extrato de alfavaca, onde (3) + extrato bruto (não diluído), (4) + extrato diluído 1:10, (5) + extrato diluído 1:20, (6) + extrato diluído 1:40, (7) + extrato diluído 1:80, (8) + extrato diluído 1:160, (9) + extrato diluído 1:320. Experimento feito em duplicata.

Para efeitos comparativos, os extratos de folhas de alfavaca recém colhidas (amostras *in natura*) foram utilizados no intuito de verificar se a baixa eficiência de proteção observada no teste anterior foi devido à perda das propriedades antioxidantes, visto que é uma amostra desidratada. Os resultados indicaram que não ocorreu dano ao DNA no controle positivo (controle que tem DNA mais o sistema gerador de dano). Nas demais amostras que deveriam ter sido observadas a proteção em níveis diferentes (devido

Nota: valores indicados referem-se volume em microlitros (µL).

às diluições de extrato) não foram constatadas diferenças nos resultados, mostrando ser inconclusivos.



**Figura 2.** Análise de DNA Plasmidial em gel de agarose a 0,8% e diluições do extrato aquoso de alfavaca usando amostra natural (*ocimum gratissimum*). "A" indica banda superior com DNA frouxo e "B" indica banda inferior com DNA em estado mais compactado. (1) Controle negativo (sem dano), (2) controle positivo (com dano). Poços 3 a 9 correspondem as reações contendo sistema gerador de dano + extrato de alfavaca, onde (3) + extrato bruto (não diluído), (4) + extrato diluído 1:10, (5) + extrato diluído 1:20, (6) + extrato diluído 1:40, (7) + extrato diluído 1:80, (8) + extrato diluído 1:160, (9) + extrato diluído 1:320.

## DISCUSSÃO

O DNA alvo usado nesse estudo apresenta-se em duas a três conformações estruturais distintas, as quais podem ser observadas pela presença de duas ou três bandas no gel de agarose (poço 2, figura 1). A banda inferior representa o DNA na conformação superenovelada, ou seja, extremamente compactação enquanto as superiores são moléculas de DNA em estado mais frouxo de compactação (pouco enovelado). Constatou-se que quando o DNA sofre algum tipo de dano, geralmente, a banda inferior tende a se tornar imperceptível quando o gel é exposto à luz ultravioleta (controle positivo, poço 1, figura 1).

Observou-se, também, que somente a amostra contendo o extrato bruto apresentou uma proteção significativa contra o dano ao gerado no sistema, devido à uma pequena redução da intensidade da banda inferior, enquanto que, na amostra contendo extrato diluído 10 vezes, a capacidade protetora foi observada com menor intensidade. Nas amostras restantes, foi averiguado pouco ou nenhuma proteção contra o dano oxidativo ao DNA.

Um antioxidante tem por característica a capacidade de inibir uma reação oxidativa quando está em baixíssimas quantidades<sup>8</sup>. Neste estudo, verificou-se que foi necessária uma quantidade considerável de extrato (amostra não diluída) para observar uma proteção ao DNA. Embora alguns trabalhos descrevam o uso de alfavaca no tratamento de algumas doenças como descrito por Passos et al.<sup>2</sup>, existem poucos dados na lite-

ratura sobre a utilização da alfavaca como fonte de antioxidantes. Assim, não foi possível afirmar se a quantidade de antioxidantes presentes no extrato em questão é alta ou baixa.

A alfavaca é uma planta rica em óleos essenciais e esses por sua vez são fontes de antioxidantes, como exemplo o timol e o eugenol, estes atuam no combate aos RL e contra a peroxidação lipídica. Conforme estudo realizado por Dias et al<sup>3</sup>, o composto metanólico de alfavaca possui ação antioxidante, importante para a proteção e prevenção de doenças degenerativas causadas principalmente pela atuação de RL.

Portanto, são necessários estudos adicionais com metodologia mais aprofundada de extração dos compostos antioxidantes presentes nas folhas de alfavaca (extração com solventes orgânicos, por exemplo), bem como a utilização de componentes isolados dos extratos e até mesmo de extratos in natura para confirmar se o uso dessa planta como uma fonte de antioxidantes é eficiente, eficaz e efetivo.

## CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que há presença de antioxidantes na infusão no extrato bruto de alfavaca, embora sejam necessárias análises mais aprofundadas, a alfavaca pode se tornar uma alternativa promissora no auxílio da prevenção de doenças e na melhora da parte estética. O envelhecimento precoce da pele está diretamente ligado à presença de RL no organismo, sendo possível associar o consumo da alfavaca na terapêutica do antienvhecimento.

Cabe ressaltar que, sendo a análise preliminar deste estudo qualitativa, realizada em duplicata, torna-se imprescindível elaborar ensaios dose resposta mais refinados, incluindo a determinação da concentração inibitória média (IC<sup>50</sup>) dos extratos, já que é um índice comumente usado para demonstrar a eficiência dos efeitos protetores de determinados componentes. Nesse sentido, pesquisas adicionais com métodos diferenciados são necessárias para comprovar a possível ação antioxidante da alfavaca.

## CONFLITOS DE INTERESSE

**NÃO HÁ CONFLITOS DE INTERESSE.**

## REFERÊNCIAS

1. Hirata LL, Sato MEO, Santos CAM. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil, 2004.
2. Passos MG, Carvalho HH, Wiest J M. Conservação e condimentação de alimentos por *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) - Labiatae - (*Lamiaceae*). Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil, 2008.
3. Dias LP et al. Determinação da atividade antioxidante do extrato metanólico da alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica Belém do Pará, 2009.
4. Telesi M, Machado FA. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. SaBios: Rev. Saúde e Biol. 2008; 3(1):40-49.
5. Avellar IG, Magalhães MM, Silva AB, Souza LL, Leitão AC, Hermes-Lima M. Reevaluating the role of 1, 10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. Biochim. Biophys. Acta 2004; 1675: 46-53.
6. Sambrook J et al. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, 2000.
7. Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. Rev Inst Adolfo Lutz 2005; 64(2):155-161.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3.ed. Oxford University Press Inc., New York, 1999.