

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Letícia Gomes de Oliveira

**Caracterização fitoquímica e avaliação dos potenciais biológicos do extrato
aquoso de *Ocimum basilicum***

Juiz de Fora
2024

Letícia Gomes de Oliveira

**Caracterização fitoquímica e avaliação dos potenciais biológicos do extrato
aquoso de *Ocimum basilicum***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Co-orientadora: Danielle Maria de Oliveira Aragão

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Letícia Gomes de .

Caracterização fitoquímica e avaliação dos potenciais biológicos do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* / Letícia Gomes de Oliveira.

-- 2024.

82 p.

Orientadora: Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Danielle Maria de Oliveira Aragão

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. *Ocimum basilicum*. 2. Antioxidante. 3. Anti-inflamatório. I. Fabri, Rodrigo Luiz, orient. II. Aragão, Danielle Maria de Oliveira, coorient. III. Título.

LETÍCIA GOMES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS
BIOLÓGICOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Ocimum basilicum***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 31 de Julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri – orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dra. Patrícia Aparecida Fontes Viera
Universidade Federal de Viçosa

Juiz de Fora, 15/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Luiz Fabri, Chefe de Departamento, em 31/07/2024, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Patrícia Aparecida Fontes Vieira, Usuário Externo, em 31/07/2024, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº](#)

[10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Danielle Maria de Oliveira Aragao, Professor(a), em 31/07/2024, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gilson Costa Macedo, Professor(a), em 02/08/2024, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1862181 e o código CRC D3F6CA96.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me desamparar, mantendo minha resiliência e fazendo-me entender o quanto a fé é fundamental para nos mantermos firmes diante de todas as dificuldades.

À minha família, em especial a meus pais, que nunca mediram esforços para me auxiliar na busca dos meus objetivos; à minha irmã, Dayanne, e minha tia, Denise, que sempre vibraram com as minhas conquistas; ao meu esposo, à minha filha e meus padrinhos João Batista e Cláudia, que me impulsionam a querer ser motivo de orgulho e admiração.

Às minhas amigas Laísa, Lauriane, Cinara, que continuamente alegram-se com cada conquista e me mantiveram firme neste propósito, por acreditarem na minha capacidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (LPNB), Ari, Victor, Alisson e Lívia, que além da paciência e disponibilidade em me auxiliar durante os ensaios realizados, proporcionaram momentos de descontração e alegria, tornando o processo mais leve e prazeroso.

Ao técnico do LPNB, Delfino, pelo acolhimento, colaboração e amizade; por estar sempre de prontidão a me auxiliar e pelos conselhos dados ao longo dessa jornada.

Ao professor Marcos Vidal pela prontidão e colaboração neste trabalho.

Ao meu orientador Rodrigo Luiz Fabri, que, desde o início, esteve disposto a ajudar nas propostas de complementação do projeto, auxiliando na definição do que seria viável de ser realizado.

À minha coorientadora Danielle Maria de Oliveira Aragão, a quem tenho imensa gratidão por todos os ensinamentos e oportunidades concedidas, pela confiança no meu trabalho, por acreditar no meu potencial e por ser uma pessoa humilde, que valoriza acima de tudo a essência do ser humano. Nosso vínculo vai muito além da

pesquisa; tenho-a como amiga, incentivadora e exemplo de determinação e comprometimento.

Ao Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP), pela estrutura e prontidão dos técnicos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal e profissional.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E a todos os que me apoiaram durante todo o processo.

RESUMO

O aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tem sido atribuído a fatores associados ao estilo de vida inadequado. No Brasil, em 2019, 41,8% das mortes entre indivíduos de 30 a 69 anos foram atribuídas às DCNT. Atualmente, a busca por produtos naturais como forma de complemento ao tratamento médico convencional tem sido proposta. Nesse sentido, destaca-se a utilização de *Ocimum basilicum* (OB), popularmente conhecido como manjerição e utilizado para tratamento de diversos distúrbios metabólicos. Logo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica *in vitro* e realizar a caracterização fitoquímica do extrato aquoso de OB. A avaliação da atividade antioxidante do extrato baseou-se nos métodos de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), sistema β -caroteno/ácido linoleico e ensaio baseado na capacidade de absorção de radicais oxigenados – ORAC. Foi realizada a análise da citotoxicidade dos extratos, através da redução metabólica do 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) nas linhagens celulares de fibroblastos (L929) e macrófagos (J774A.1). O potencial anti-inflamatório foi avaliado pela capacidade de redução da formação de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- α) em macrófagos estimulados. Foi realizada uma triagem fitoquímica pelas dosagens de fenóis e flavonoides ($121,34 \pm 8,40$ mg de Eq. de ácido tânico/g de amostra e $6,17 \pm 0,58$ mg de Eq. de quercetina/g de amostra, respectivamente), além da caracterização a partir da técnica de UFLC-MS-Q-TOF, mostrando uma prevalência de ácidos fenólicos (ácidos: p-hidroxibenzoico, quínico, gálico, chicórico, clorogênico, ferúlico, caftárico e rosmarínico), seguida de flavonoides (quercetina e rutina). O extrato apresentou atividade antioxidante promissora, evidenciada por valores reduzidos de CI_{50} (DPPH = $2,78 \pm 0,61$ μ g/mL; ORAC = $10,03 \pm 0,21$ μ g/mL). OB manteve o percentual de viabilidade das linhagens celulares acima de 70%, como preconizado pela ISO 10993-5. A atividade anti-inflamatória *in vitro* mostrou redução da concentração de NO (% redução ~ 85%) e das citocinas pró-inflamatórias (% redução IL-6 ~ 52%; IL-12 ~ 46%; TNF- α ~ 30%). Diante dos resultados alcançados, observa-se que o extrato apresentou atividade biológica promissora, que pode ser atribuída ao conteúdo de fitoconstituintes presentes na amostra, tornando possível o prosseguimento de investigações de efeitos terapêuticos subsequentes.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum*; antioxidante; anti-inflamatório.

ABSTRACT

The increase in chronic non-communicable diseases (NCDs) has been attributed to factors associated with inadequate lifestyle. In Brazil, in 2019, 41.8% of deaths among individuals aged 30 to 69 were attributed to NCDs. Currently, the search for natural products as a complement to conventional medical treatment has been proposed. In this sense, the use of *Ocimum basilicum* (OB) stands out, popularly known as basil and used to treat various metabolic disorders. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity in vitro and perform the phytochemical characterization of the aqueous extract of OB. The evaluation of the antioxidant activity of the extract was based on the methods of scavenging the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, the β -carotene/linoleic acid system and an assay based on the absorption capacity of oxygenated radicals – ORAC . The cytotoxicity of the extracts was analyzed through the metabolic reduction of 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) in fibroblast (L929) and macrophage (J774A) cell lines. The anti-inflammatory potential was evaluated by the ability to reduce the formation of nitric oxide (NO) and production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- α) in stimulated macrophages. A phytochemical screening was carried out using the dosages of phenols and flavonoids (121.34 ± 8.40 mg of tannic acid Eq./g of sample and 6.17 ± 0.58 mg of quercetin Eq./g of sample, respectively), in addition to characterization using the UFLC-MS-Q-TOF technique, showing a prevalence of phenolic acids (acids: p-hydroxybenzoic, quinic, gallic, chicoric, chlorogenic, ferulic, caftaric and rosmarinic acids), followed by flavonoids (quercetin and rutin). The extract showed promising antioxidant activity, evidenced by reduced IC₅₀ values (DPPH = 2.78 ± 0.61 μ g/mL; ORAC = 10.03 ± 0.21 μ g/mL). OB maintained the viability percentage of cell lines above 70%, as recommended by ISO 10993-5. In vitro anti-inflammatory activity showed a reduction in the concentration of NO (% reduction ~ 85%) and pro-inflammatory cytokines (% reduction IL-6 ~ 52%; IL-12 ~ 46%; TNF- α ~ 30%). In view of the results achieved, it is observed that the extract showed promising biological activity, which can be attributed to the content of phytoconstituents present in the sample, making it possible to continue investigations into subsequent therapeutic effects.

Keywords: *Ocimum basilicum*; antioxidante; anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	21
Figura 2 – Propriedades farmacológicas de <i>Ocimum basilicum</i>	22
Figura 3 – Percentuais de inibição do radical livre DPPH pelo extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> e quercetina em diferentes concentrações.....	52
Figura 4 – Mecanismos de ação na redução do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	54
Figura 5 – Perfil de decaimento da fluorescência avaliada com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 538 nm, durante 60 minutos.....	56
Figura 6 – Percentual de inibição do extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> e quercetina em diferentes concentrações.....	58
Figura 7 – Perfil de decaimento da absorbância do β -caroteno (curva de oxidação), avaliada em 470 nm, mostrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação.....	59
Figura 8 – Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> na linhagem celular L929 em diferentes concentrações.....	61
Figura 9 – Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> em linhagem celular J774A.1 em diferentes concentrações	62
Figura 10 – Avaliação da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico do extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> em linhagem celular J774A.1 em diferentes concentrações.....	64
Figura 11 – Avaliação da influência do extrato de <i>Ocimum basilicum</i> na produção de citocina IL-6 por células J774A.1 estimuladas.....	66
Figura 12 – Avaliação da influência do extrato de <i>Ocimum basilicum</i> na produção de citocina IL-12 por células J774A.1 estimuladas.....	67
Figura 13 – Avaliação da influência do extrato de <i>Ocimum basilicum</i> na produção de citocina TNF- α por células J774A.1 estimuladas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hierarquia taxonômica de <i>Ocimum basilicum</i>	20
Tabela 2 – Análise de fenóis totais e teor de flavonoide.....	45
Tabela 3 – Identificação dos compostos do extrato aquoso de <i>Ocimum basilicum</i> por UFLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (TR), modos negativo e positivo $[M-H]^-$ / $[M-H]^+$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências.....	49
Tabela 4 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e quercetina, através do método de inibição do radical livre DPPH. Resultados expressos em valores de CI_{50}	53
Tabela 5 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e trolox, através do ensaio baseado na capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Resultados expressos em valores de CI_{50}	55
Tabela 6 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e quercetina pelo ensaio do β -caroteno/ácido linoleico, através do estudo cinético pelo método das tangentes.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais compostos bioativos presentes nos extratos de manjerição.....24

Quadro 2 – Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
Abs	Absorbância
AAPH	Dicloridrato de 2,2'- azobis (2-amidino-propano)
ATP	Adenosina trifosfato
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
CI_{50}	Concentração inibitória de 50%
CLAE- DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjos de diodos
CLAE - EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLUE – EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CO_2	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELIZA	do Inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DAMPs	Padrões moleculares associados ao Dano
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DMEM	do Inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil

GPx	Glutathione Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Inos	Óxido nítrico sintase induzível
ISO	do Inglês International Organization for Standardization
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NED	N-naftiletilenodiamina
NF	Fator Nuclear de Transcrição Kappa B
NK κ B	Célula natural killer
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
OB	<i>Ocimum basilicum</i>
O ₂ ⁻	Radicais superóxido
°C	Graus Celsius
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito

ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
pg	Picograma
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Proteína C reativa
PRRs	Receptores de reconhecimento de Padrões
PEG	Polietilenoglicol
R.F.U	Unidade relativa de fluorescência
ROS	Espécies Reativas de oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RPMI	do Inglês <i>Roswell Park Memorial Medium</i>
SBF	Soro Fetal Bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFLC	do Inglês <i>Ultra Fast Liquid chromatography</i>
TLR	do Inglês Toll-Like Receptor
SUS	Sistema Único de Saúde
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção Para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	A FAMÍLIA LAMIACEA E A ESPÉCIE <i>OCIMUM BASILICUM</i>	20
2.2	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA	22
2.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>OCIMUM BASILICUM</i>	25
2.4	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	26
2.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.6	EFEITO DO CONSUMO DE ESPECIARIAS NA NUTRIÇÃO HUMANA	29
2.7	SISTEMA IMUNOLÓGICO	30
2.7.1	Inflamação	32
2.7.2	Biomarcadores de inflamação	32
3.	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAL VEGETAL	36
4.2	PREPARO DO EXTRATO VEGETAL	36
4.3	IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DE <i>OCIMUM BASILICUM</i>	36
4.3.1	Teor de fenóis totais	36
4.3.2	Dosagem de Flavonoide	37
4.3.3	Identificação dos constituintes por UFLC-MS-Q-TOF	37
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	38
4.4.1	Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	38
4.4.2	Sistema β-caroteno/ácido linoleico	39
4.4.3	Ensaio baseado em fluorescência para espécies reativas de oxigênio – ORAC	41
4.5	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	41
4.5.1	Linhagens celulares	41
4.5.2	Cultura de células	42

4.5.3	Preparo do Extrato	42
4.5.4	Avaliação da viabilidade celular	43
4.5.5	Determinação da produção de óxido nítrico	44
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	FENÓLICOS TOTAIS E TEOR DE FLAVONOIDES	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR UFLC-MS-Q-TOF	48
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
5.4	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	61
5.5	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO <i>IN VITRO</i>	63
5.5.1	Influência do extrato na produção de NO por células J774A.1	63
5.5.2	Influência do extrato na produção de citocinas por células J774A.1	65
6.	CONCLUSÃO	69
7.	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) são resultado da soma dos fatores genético, comportamental, fisiológico e ambiental. Este último contempla a ocorrência de hábitos alimentares inadequados, inatividade física, exposição ao tabaco e o consumo de álcool. Entre as doenças de maior prevalência encontra-se as alterações cardiovasculares, cânceres, doenças respiratórias, obesidade e diabetes, conjuntamente responsáveis por cerca de 41 milhões de mortes a cada ano (Who, 2021).

No Brasil, os resultados são igualmente preocupantes. Em 2019, as DCNTs totalizaram cerca de 41,8% de mortes na faixa etária de 30 a 69 anos de idade, a partir dos resultados divulgados pelo VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção Para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) (Brasil,2021). De acordo com Nilson *et al.* (2020), a partir de estimativas sobre os custos econômicos para a saúde que contemplam os dispêndios hospitalares e medicamentosos para tratamento de hipertensão, diabetes e obesidade distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), foram gastos, em 2018, 3,45 bilhões de reais.

Dentre os fatores de risco responsáveis pelo desencadeamento dessas doenças, pode-se destacar o estilo de vida inadequado com prevalência de consumo de alimentos ultraprocessados, que por definição, são produtos alimentícios de alta densidade energética, baixo valor nutricional e passam por vários processos industriais com adição de ingredientes para melhorar a palatabilidade e aumentar a validade. Além de apresentarem alto índice glicêmico, possuem baixo potencial em promover saciedade, resultando em um grande consumo e efeitos metabólicos que podem se perpetuar a longo prazo resultando na inflamação crônica de baixo grau, chamada de metainflamação, característica das DCNTs (Asensi *et al.*, 2023; Tosi *et al.*,2023; Monteiro *et al.*, 2019).

Nesse contexto, estudos têm demonstrado a importância de uma alimentação saudável e seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes a partir do consumo de alimentos fontes de fitoconstituintes, como compostos fenólicos proveniente do metabolismo secundário de plantas, atuando na prevenção do surgimento das DCNTs

(Tosi *et al.*, 2023; Zekrumah *et al.*, 2023). Pesquisas evidenciam a importância da dieta mediterrânea, por exemplo, na baixa incidência de DNCTs, aumento da longevidade e melhora na qualidade de vida da população europeia, atribuindo esses benefícios ao alto teor de substâncias bioativas e ao sinergismo entre os nutrientes (Dominguez *et al.*, 2021; Schwingshackl *et al.*, 2020).

Considerando o expressivo aumento das DCNTs justificado pela presença de um estado inflamatório crônico, é relevante relacionar o uso de substâncias bioativas que atuem na prevenção e/ou de forma coadjuvante a tratamentos convencionais, contribuindo para um prognóstico positivo e ao mesmo tempo reduzindo os efeitos adversos de medicamentos alopáticos utilizados no manejo dessas doenças. Dessa forma, o uso de especiarias na alimentação torna-se relevante, uma vez que são fontes de fitocompostos que atuam na manutenção da saúde e bem-estar, agregando propriedades funcionais à dieta, a partir da neutralização de radicais livres e modulação de processos metabólicos (Zekrumah *et al.*, 2023).

Dentre essas especiarias, destaca-se a espécie *Ocimum basilicum* L. (OB). Trata-se de uma erva aromática utilizada mundialmente devido à sua versatilidade, apresentando ampla atividade biológica, a qual é atribuída à presença de substâncias bioativas como compostos fenólicos, responsáveis pelas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras (Avasiloaiei *et al.*, 2023; Azizah *et al.*, 2023; Bajomo *et al.*, 2022). Entretanto, poucas pesquisas realizaram e exploraram o potencial biológico do extrato aquoso desta planta no que tange às propriedades imunomodulatória, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica *in vitro*, visto que a maior parte dos estudos foram realizados com óleos essenciais ou outras espécies do gênero. É importante ressaltar a relevância do uso de solventes verdes, cada vez mais requeridos por indústrias de diversas áreas, visto que apresentam baixa toxicidade, custo reduzido, são biodegradáveis e consequentemente não apresentando qualquer efeito nocivo ao meio ambiente (Chemat *et al.*, 2019).

Desse modo, a partir da composição química de *Ocimum basilicum* descrita na literatura, acredita-se que o extrato aquoso de OB exerça atividades biológicas importantes, atuando no combate aos radicais livres e exercendo efeitos modulatórios. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica das folhas e hastes de *Ocimum basilicum*; quantificar o teor de composto fenólico e flavonoide;

avaliar o potencial antioxidante e determinar a atividade citotóxica e imunomodulatória do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FAMÍLIA LAMIACEA E A ESPÉCIE *OCIMUM BASILICUM*

A família Lamiaceae compreende cerca de 6000 espécies e 236 gêneros de plantas com ampla aplicabilidade comercial, sendo utilizadas desde a conservação de alimentos e consumo alimentar até propriedades medicinais. *Ocimum* é um dos gêneros pertencentes à família Lamiaceae e possui 65 espécies nativas da África do Sul, Ásia e América do Sul (Avasiloiae *et al.*, 2023). A hierarquia taxonômica pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 – Hierarquia Taxonômica de *Ocimum basilicum*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae
Gênero	Ocimum
Espécie	Basilicum

Fonte: Purushothaman *et al.*, 2018.

Conhecido popularmente como manjerição, alfavaca, erva-real, manjerição doce, etc., *Ocimum basilicum* (Figura 1) é uma planta herbácea anual de polinização cruzada. Possui várias ramificações, aroma característico e alcança entre 0,5 e 1 metro de altura. Sua haste é reta, com numerosas folhas ovaladas, suculentas e ausentes em pelos, com tonalidade verde-brilhante. Na parte inferior das folhas, pequenas cavidades abrigam gotículas de essências. As flores existentes, agrupam-se em espigas, e seus frutos consistem em aquênios, pequenos, secos e indeiscentes.

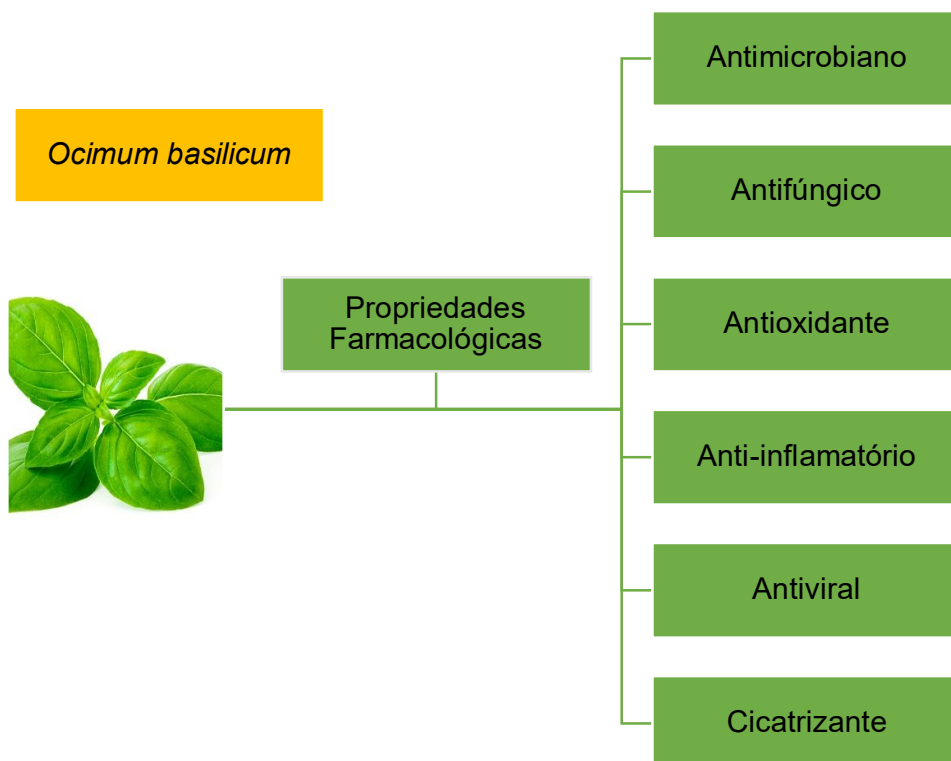
Apresenta boa adaptação em climas subtropical, temperado, quente e úmido (Rodrigues & Gonzaga, 2001; Purushothaman *et al.*, 2018).

Figura 1 – Manjerição (*Ocimum basilicum*)



Fonte: Arribas (2023).

A espécie *Ocimum basilicum* possui amplas funcionalidades, e os estudos destacam seu uso como especiaria na culinária, principalmente na Dieta Mediterrânea – utilizada como referência de dieta saudável, devido à presença de alto teor de fitoconstituintes -, planta ornamental, aromatizante natural, conservante e flavorizante. Ainda, pesquisas sugerem seu potencial antimicrobiano, efeito coadjuvante do trato gastrointestinal (carminativo, antiulcerogênico, promotor da saúde estomacal) e respiratório, anti-inflamatório, antinociceptivo, antioxidante, antidepressivo, anticancerígeno, analgésico, cicatrizante, cardioprotetor, além de ser aplicado na indústria farmacêutica na área cosmética e medicinal (Zhakipbekov *et al.*, 2024; Purushothaman *et al.*, 2018; Sestili *et al.*, 2018). As atividades farmacológicas da espécie estão resumidas na Figura 2.

Figura 2 – Propriedades Farmacológicas de *Ocimum basilicum*

Fonte: Adaptado de Zhakipbekov *et al.* (2024).

2.2 CONSTITUIÇÃO FITOQUÍMICA

Ocimum basilicum é uma planta aromática rica em óleos essenciais, os quais são atribuídas várias propriedades biológicas. Considerando a predominância dos estudos direcionados à caracterização e identificação de substâncias presentes em óleos voláteis, a partir da análise em CG-EM, metabólitos como linalol, eugenol, metil chavicol, metil cinamato, metil eugenol e geraniol são alguns dos óleos essenciais presentes no manjericao (Purushothaman *et al.*, 2018).

Em relação aos compostos fenólicos presentes em extratos de manjericao, vários pesquisadores identificaram a presença de ácidos fenólicos e flavonoides. Housse *et al.* (2023) realizaram triagem fitoquímica, caracterização e quantificação de compostos bioativos no extrato aquoso de *Ocimum basilicum*. Através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos fotodiodos (CLAE-DAD) foram identificados, em ordem decrescente de quantidade, o ácido rosmarínico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico e kaempferol.

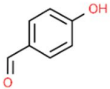
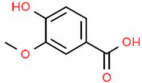
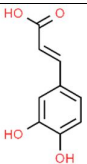
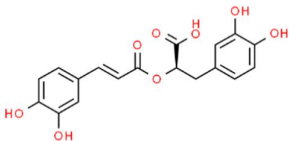
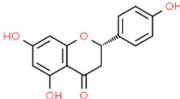
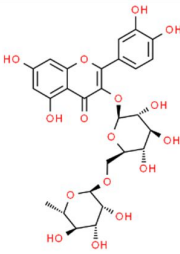
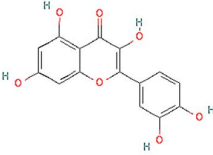
Utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas e fonte de ionização em eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS), Ibrahim *et al.* (2019), realizaram um estudo para caracterizar os principais constituintes do extrato aquoso de manjerição usando diferentes técnicas quantitativas e qualitativas e investigaram os efeitos protetivos contra a disfunção testicular, induzida por quimioterapia e radioterapia. Foram identificados 22 compostos polifenólicos a partir dos picos dos íons moleculares e dados comparados na literatura. Do total de substâncias identificadas no extrato, 25,95% corresponderam aos flavonoides glicosídicos e agliconas, dentre eles, destacaram-se a apigenina O-glicosídeo, luteolina, quercetina e rutina. Os ácidos fenólicos estavam em maior proporção no extrato, cerca de 46,54%, dos quais, o composto majoritário foi o ácido rosmarínico seguido do ácido caftárico.

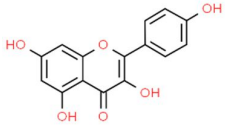
Extratos produzidos por outros solventes como etanólico e metanólico diferiram em alguns compostos bioativos identificados quando comparado ao extrato aquoso. Nadeem *et al.* (2022) relacionaram o estágio de crescimento com a toxicidade de diferentes extratos da planta. Entre os compostos bioativos identificados, estavam a liquiritigenina, umbeliferona, ácidos elágico e rosmarínico e catequina.

Ullah *et al.* (2022) descreveram o uso de plantas do gênero *Ocimum* no tratamento de afecções renais e dermatológicas – picadas de insetos e cobras, acne – e destacaram seus efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênico, antimutagênico, antioxidante e antibacteriano. Nesse estudo, os ácidos gálico, vanílico, cafeico e siríngico; os flavonoides luteolina, apigenina, rutina, quercetina e kaempferol estavam presentes no extrato metanólico.

Em relação à composição centesimal, Dharsono *et al.* (2022) realizaram um estudo de revisão no qual os achados relatam a presença dos nutrientes cálcio, fósforo, vitamina A, C e β -caroteno. A estrutura dos principais fitoconstituintes presentes em extratos de manjerição são ilustrados no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais compostos bioativos presentes nos extratos de manjeriço

Metabólito Secundário	Fórmula Molecular	Estrutura Química	Referências
Ácido p-hidroxibenzoico	$C_7H_6O_2$		House <i>et al.</i> , 2023.
Ácido vanílico	$C_8H_8O_4$		House <i>et al.</i> , 2023; Ullah, <i>et al.</i> , 2022.
Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$		House <i>et al.</i> , 2023; Ullah, <i>et al.</i> , 2022; Ibrahim <i>et al.</i> , 2019.
Ácido rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$		House <i>et al.</i> , 2023; Ibrahim <i>et al.</i> , 2019; Nadeem <i>et al.</i> , 2020.
Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$		House <i>et al.</i> , 2023.
Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$		House <i>et al.</i> , 2023; Ullah, <i>et al.</i> , 2022; Ibrahim <i>et al.</i> , 2019.
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$		House <i>et al.</i> , 2023; Ullah, <i>et al.</i> , 2022; Ibrahim <i>et al.</i> , 2019.

Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		House <i>et al.</i> , 2023; Ullah, <i>et al.</i> , 2022.
------------	--	--	---

Fonte: Adaptado de ChemSpider; PubChem (2024).

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *OCIMUM BASILICUM*

A presença de metabólitos secundários identificados no manjeriço justifica-se pelas suas aplicabilidades em uma infinidade de propriedades biológicas. Os estudos mostraram que além da culinária, o manjeriço pode ser usado em distúrbios renais, dor de ouvido, irregularidades menstruais, tratamento de tosse, febre, enxaqueca, asma, gripe, bronquite e malária (Azizah *et al.*, 2023).

Além disso, pesquisas têm evidenciado atividade promissora contra infecções virais, fúngicas e bacterianas. Em relação à atividade antibacteriana do manjeriço, estudos sugerem que a presença de compostos fenólicos altera a permeabilidade da membrana celular e inibe a síntese de enzimas necessárias a síntese de DNA, RNA e proteínas, levando apoptose e necrose de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As propriedades antifúngicas podem ser atribuídas ao conteúdo de taninos capaz de causar precipitação de proteínas importantes ao desenvolvimento fúngico, privação do crescimento e desenvolvimento, redução na síntese de ATP, além de inibir a germinação de esporos e desenvolvimento micelial (Zhakipbekov *et al.*, 2024; Azizah *et al.*, 2023).

Ademais, sobre as propriedades antioxidantes, grande parte dos estudos são realizados com óleos essenciais e a presença de estragol, linalol, eugenol, metil chavicol, metil eugenol, eucaliptol e bergamoteno, justificam suas atividades promissoras contra a peroxidação lipídica, inibição do radical livre DPPH e neutralização dos radicais peróxido, hidroxila, ânion superóxido e óxido nítrico (Purushothaman *et al.*, 2018).

Os efeitos sinérgicos dos compostos bioativos presentes nos extratos de manjerição são capazes de atuar na modulação do sistema imunológico a partir da proteção contra lise da membrana lisossomal, inibição de enzimas atuantes em vias inflamatórias como ciclooxigenases, lipoxigenases, óxido nítrico sintase induzível, moléculas de adesão e mediadores pró-inflamatórios como citocinas, fatores de transcrição e eicosanoides (Zhakipbekov *et al.*, 2024).

Sobre as propriedades farmacológicas, o uso de manjerição apresenta efeitos anti-tumorigênico, antioxidante, anti-inflamatório, antiestresse, anti-diabético, anti-pirético, antimicrobiano, imunomodulatório, radioprotetivo e profilático em doenças cardiovasculares (Shahrajabian *et al.*, 2020; Purushothaman *et al.*, 2018; Gebrehiwot *et al.*, 2015).

2.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidas fisiologicamente através de reações metabólicas como a respiração celular, defesa do organismo contra invasores e atuam no controle da sinalização e proliferação celular (Pisoschi *et al.*, 2021), mas também podem ser geradas a partir de fatores ambientais como estilo de vida inadequado, incluindo alimentação desbalanceada, sedentarismo, uso de álcool, cigarro, poluição ambiental, radiação, medicamentos, dentre outros fatores, culminando com a alteração da homeostase redox e estresse oxidativo (Jomova *et al.*, 2023).

Caracteriza-se como radicais livres substâncias altamente reativas por apresentarem elétrons desemparelhados nos seus orbitais externos (Meo & Venditti, 2020), sendo as moléculas mais prevalentes o ânion superóxido, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, óxido nítrico, e peroxinitrito (Pambuk & Muhammad, 2018). Para proteger órgãos e tecidos contra a ação desses radicais, o organismo humano detém de sistemas de defesa antioxidante endógeno e exógeno compreendendo enzimas antioxidantes – catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) – e nutrientes, respectivamente (Pisoschi *et al.*, 2021).

Situações nas quais o sistema de defesa antioxidante, seja este endógeno e/ou exógeno são ineficientes para conter a propagação de radicais livres resultam no estresse oxidativo (Sies, 2020), alterando a estrutura de proteínas, lipídeos, lipoproteínas, DNA e permeabilidade de membranas celulares. Como consequência, ocorre a perda de função dessas moléculas, afetando a atividade catalítica de enzimas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios, sendo uma das causas responsáveis pela gênese de várias doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, diabetes, câncer, doenças respiratórias, neurológicas, autoimunes e cardiovasculares (Hajam *et al.*, 2022). As principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, bem como as categorias de antioxidantes e ações biológicas estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	Antioxidantes		Ação Biológica
Ânion superóxido (O_2^-)	Enzimático	Catalase	Realizam a dismutação do O_2^- em O_2
Oxigênio singlete		Glutathione	Promove a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)		Superóxido Dismutase	Reduz a peroxidação lipídica e as concentrações de H_2O_2
Radical hidroxila (OH^-)	Não enzimático	Alfa-tocoferol (Vitamina E)	Diminui a peroxidação lipídica sequestrando os radicais O_2^- e OH^- ; interrompe as reações em cadeias dos radicais livres
Óxido nítrico (NO^-)		β -caroteno (Pró-vitamina A)	Retém os radicais O_2^- e OH^- e reduz a oxidação da vitamina A

Peróxinitrito (ONOO ⁻)		Ácido Ascórbico (Vitamina C)	Reduz as concentrações de O ₂ ⁻ , OH ⁻ e H ₂ O ₂ ; neutraliza oxidantes gerados por neutrófilos e aumenta os níveis de vitamina E
	Compostos Fenólicos	Ácidos Fenólicos, Flavonoides, Taninos, Óleos Essenciais	Estabilizam, neutralizam e restringem a formação de RNS e ROS

Fonte: Adaptado de Chaudhary *et al.* (2023).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante diz respeito à capacidade de uma substância, quando presente em pequenas concentrações, de neutralizar radicais livres ou retardar a oxidação do substrato, além de inibir a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios (Chaudhary *et al.*, 2023). Os antioxidantes podem ser classificados em primários, quando atuam retardando ou interrompendo a propagação de reações oxidativas, seja estabilizando os radicais através da doação de elétrons ou eliminando-os; e antioxidantes secundários, que removem o oxigênio singlete, inibem enzimas oxidativas, desagregam peróxidos, quelam íons metálicos e absorvem radiação (Pisoschi *et al.*, 2021). Muitas dessas propriedades são atribuídas aos fitoconstituintes presentes em extratos vegetais (Jiang, 2019).

Com propriedades amplamente documentadas, fitocompostos das classes dos ácidos fenólicos, tais como, ácido cafeico, gálico, ferúlico, carnósico e p-coumárico; estilbenos como o resveratrol, lignanas, alcaloides e terpenoides presentes em óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas relatadas na literatura, que incluem efeito anti-inflamatório, anticancerígeno e antioxidante atribuídos à capacidade dessas moléculas em atuar na modulação do equilíbrio pró e antioxidante (Chaudhary *et al.* 2023; Christ *et al.*, 2019). Entretanto, é importante considerar que a eficiência antioxidante de compostos bioativos depende da

biodisponibilidade, dose, nível de estresse oxidativo e presença de metais (Jomova *et al.*, 2023).

2.6 EFEITO DO CONSUMO DE ESPECIARIAS NA NUTRIÇÃO HUMANA

Embora o consumo de ervas e especiarias permanece baixo, comparando-se à ingestão dos demais alimentos (Vázquez-Fresno *et al.*, 2019), o uso de ervas aromáticas na alimentação superou as perspectivas puramente dietéticas e relacionadas ao uso culinário. A relação do desenvolvimento de DCNTs relacionadas com a progressão de processos oxidativos e inflamatórios despertou interesse pelo estudo dos efeitos desses alimentos na saúde e na doença (Tapsell *et al.*, 2006).

Pesquisas mostram a importância da utilização de especiarias na alimentação, com o intuito de reduzir o consumo de sal e gordura saturada, favorecendo o tratamento de alterações cardiovasculares e reduzindo a pressão arterial (Petersen *et al.*, 2024). Além disso, especialistas apontam para efeitos positivos na prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer, cujo mecanismo de ação está relacionado ao estímulo apoptótico de células cancerígenas, inibição do crescimento, proliferação e migração celular, além da sensibilização de tumores à terapia oncológica (Zeng *et al.*, 2016). Em se tratando de alterações metabólicas, existem trabalhos na literatura relacionando o consumo de ervas com o prognóstico favorável em relação às doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus tipo 2, modulação do perfil lipídico, dentre outros (Bower *et al.*, 2016; Vázquez-Fresno *et al.*, 2019).

O manjerição pode ser encontrado mundialmente, mas a sua presença e consumo na Dieta Mediterrânea prevalece entre os demais continentes. A justificativa para o seu elevado uso nessas regiões é pautado em seus efeitos positivos à saúde. Em relação ao diabetes, estudos mostram que a presença de ácido rosmarínico e catequinas são potentes inibidores de α -amilase e α -glicosidase, apresentando atividade hipoglicemiante. Os efeitos anti-inflamatórios são atribuídos à capacidade de modular o sistema imune, reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias e inibindo a atividade da enzima iNOS. Atividade hipolipemiante também foi avaliada

em estudos *in vitro* e *in vivo*, que mostraram efeitos preventivos e terapêuticos na aterosclerose. Por fim, o manjeriço também apresenta atividade anti-hipertensiva e melhora a função renal *in vivo*, efeitos evidenciados pela redução de angiotensina II e ureia no sangue (Bower *et al.*, 2016).

Entretanto, conhecer os mecanismos pelos quais a inclusão desses alimentos na dieta apresenta benefícios à saúde requer melhor compreensão, no que se refere ao desenvolvimento de técnicas metodológicas coerentes e padronizadas, que possam fornecer orientações a respeito da quantidade a ser consumida, forma de preparo, frequência alimentar, além de considerar o sinergismo com os demais alimentos contidos na rotina de ingestão, visando potencializar ao máximo a obtenção dos benefícios relacionados à saúde.

2.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico consiste de um conjunto de células e moléculas responsáveis pelo combate de agentes infecciosos e tem por objetivo manter constante a homeostasia do organismo. A resposta imunológica pode ser dividida em dois seguimentos, a depender de diversas variáveis como a magnitude necessária para o combate do agente infeccioso, tipos de células e moléculas envolvidas, forma de exposição e fator desencadeante da resposta ao dano, dentre outros fatores (Abbas *et al.*, 2019).

A imunidade inata ou natural é caracterizada por uma resposta mediante padrões comuns a micro-organismos e produtos característicos de células danificadas, sendo o primeiro instrumento de defesa apresentado pelas células. A imunidade adaptativa ou adquirida possui alta especificidade e pode ser estimulada a partir do contato subsequente com substâncias e micro-organismos (Abbas *et al.*, 2019).

Nesse sentido, cinco tipos celulares possuem funções específicas no que tange os mecanismos de defesa do corpo e são conjuntamente denominados leucócitos. Os neutrófilos são células que respondem rapidamente às alterações provocadas por micro-organismos invasores, assim como os monócitos, que se

diferenciam em macrófagos nos tecidos. Essas células possuem propriedades fagocíticas, estando incluídas no aparato da imunidade inata. Basófilos e eosinófilos estão relacionadas à defesa contra parasitos e podem ter suas concentrações aumentadas em situações alérgicas. Os linfócitos fazem parte da imunidade adaptativa e podem ser divididos em células B, secretoras de anticorpos, relacionado à imunidade humoral e células T, constituintes da imunidade celular, responsáveis pela regulação das respostas imunes e efetividade no combate ao agente patogênico (Nicholson, 2016).

Em situações de reconhecimento de antígenos, as células do sistema imunológico agem em harmonia no combate ao fator agressor e as etapas que tornam efetiva a resposta imune cursam com um processo inflamatório agudo, eliminação do patógeno e resolução da injúria (Hotamislingil, 2017). Entretanto, a perpetuação do estado inflamatório crônico de baixo grau, reconhecido como metainflamação está ligado ao surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, uma vez que está relacionado ao estresse oxidativo persistente, resistência à insulina, polarização de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e disfunções em organelas, contribuindo, dessa forma, para o rompimento da homeostase metabólica do organismo (Leiba *et al.*, 2023).

2.7.1 Inflamação

Entende-se por inflamação um processo que pode ser desencadeado por vários fatores como lesão tecidual, desordens do sistema imunológico, exposição a toxinas e substâncias químicas, invasão celular por micro-organismos, estilo de vida inadequado, isquemia, dentre outros, e cursa com o recrutamento do sistema imunológico a fim de efetivar a resolução do dano e restaurar os padrões homeostáticos do organismo (Roe, 2020; Medzhitov, 2008). As alterações observadas no processo inflamatório agudo apresentam como sinais clássicos dor, rubor, calor, edema e perda de função (Leiba *et al.*, 2023).

A inflamação pode ser desencadeada por indutores microbianos patogênicos ou comensais, os quais apresentam moléculas padrões capazes de serem

reconhecidas pelo sistema imunológico, através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e são denominados de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Fatores de virulência e substâncias exógenas como alérgenos e compostos tóxicos também podem desencadear uma resposta inflamatória a partir de danos teciduais (Medzhitov, 2008).

As células residentes no tecido lesionado produzem mediadores e citocinas pró-inflamatórias (Cicala & Morello, 2023) e, a partir da mudança funcional do endotélio, leucócitos e proteínas plasmáticas são direcionados ao local de lesão, no qual, após o contato direto com o patógeno, os neutrófilos ativados começam a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e proteases. Dentre os receptores capazes de reconhecer os PAMPs encontram-se os do tipo Toll-Like (TLR), que compreende proteínas transmembranas localizadas em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Existem diferentes classes dos receptores TLR e a interação entre estes é responsável pelo tipo de sinalização celular gerada, que implicará na cascata de eventos para produção e liberação de mediadores inflamatórios. Dentre os fatores de transcrição e citocinas pró-inflamatórias produzidas a partir da interação patógeno-TLR e cascata de sinalização intrínseca, destacam-se o TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 (Ferraz *et al.*, 2011). No diabetes mellitus tipo 2 e na obesidade, por exemplo, observa-se níveis elevados de PCR, IL-6 e TNF- α , sugerindo que a inflamação sistêmica tem um papel importante na gênese dessas doenças metabólicas (Bennett *et al.*, 2018).

Após a erradicação do agente causador da injúria é iniciado o processo de resolução e reparo tecidual (Scotece & Conde-aranda, 2020). Porém, caso a resposta imunológica não seja bem coordenada, resolutive e autolimitada, o processo inflamatório pode ser perpetuado, dando origem a diversas doenças crônicas (Bennett *et al.*, 2018).

2.7.2 Biomarcadores de inflamação

O reconhecimento de padrões microbianos como lipopolissacarídeos (LPS) e peptideoglicanos, por exemplo, pelos receptores PRR localizados em neutrófilos,

macrófagos e células dendríticas, desencadeia a propagação de sinais pró-inflamatórios refletindo na ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e IFN- γ . Conjuntamente, esses fatores estimulam a expressão de genes pró-inflamatórios que codificam diversas citocinas tais como, TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1, sendo responsáveis pela relação estritamente coordenada das imunidades inata e adaptativa (Barton, 2008).

Após um processo infeccioso ou estresse celular, no citoplasma das células é formado uma estrutura proteica conhecida como inflamassoma, que dentre outros aspectos, é importante na ativação das caspases – envolvidas em processos apoptóticos -, liberação das citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-1 β e IL-18 e indução de morte celular por piroptose (Brox & Dixit, 2016; Barton, 2008).

O evento subsequente a um estímulo provocado, seja pelo reconhecimento de PAMPs, lesão tecidual ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) resulta na produção de interleucinas, polipeptídeos que possuem amplas funções, que favorecem os processos de diferenciação, crescimento, progressão e produção de células imunológicas para controlar as reações pró-inflamatórias (Weber *et al.*, 2010; Behzadi, *et al.*, 2016).

Uma dessas interleucinas pode ser identificada como IL-1, a qual é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por fibroblastos, queratinócitos, neutrófilos, células epiteliais, endoteliais, dentre outras e está relacionada à imunidade inata. Os efeitos da IL-1 podem ser locais ou sistêmicos e incluem recrutamento de células imunológicas aos locais de lesão, estímulo à produção de diversas enzimas como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases, além de exercer papel estimulatório à maturação de osteoclastos e regulação da imunidade adquirida. Embora as alterações que ocorram subsequentemente à produção de IL-1 sejam responsáveis pelo estímulo à inflamação e resolução dos processos de dano, estudos têm relacionado suas concentrações com doenças que cursam com inflamação crônica, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e algumas terapias farmacológicas têm sido propostas visando antagonizar os efeitos dessa interleucina (Gabay *et al.*, 2010).

Nesse mesmo contexto está a IL-6, um mediador solúvel de efeitos pleiotrópicos, que é produzido por diversos tipos celulares como adipócitos,

queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e mesangiais, células T e monócitos (Behzadi *et al.*, 2016). A IL-6 não possui funções restritas apenas ao sistema imunológico, estimulando a diferenciação de células T_{H17} , células T citotóxicas, diferenciação de células B produtoras de anticorpos, mas também está envolvida na produção de proteínas de fase aguda positiva no fígado, como PCR, fibrinogênio e haptoglobina, por exemplo; atua na ativação da hematopoiese e está envolvida com o metabolismo de ferro e zinco, além de diversas outras funções. Assim como a IL-1, altos níveis de IL-6 estão relacionadas ao surgimento de doenças crônicas e autoimunes (Tanaka *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2018).

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células dendríticas, fagócitos e células B em resposta à antígenos microbianos. Um dos seus principais estímulos está na diferenciação de células TCD4 virgens em células T_{H1} produtoras de IFN- γ . Sendo um mediador solúvel, a IL-12 possui além da atividade antiviral, a capacidade de modular as respostas imunes inata e adaptativa, aumenta a ativação de células B com consequente elevação na concentração de imunoglobulinas e potencialização da citotoxicidade e produção de mediadores citotóxicos por células T e natural killer (NK) (Teng *et al.*, 2015; Trinchieri, 2003). Níveis aumentados dessa citocina de forma persistente são observados em doenças como psoríase, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais e alguns tipos de câncer (Croxford *et al.*, 2014).

Por fim, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também está inserido na categoria de citocinas pró-inflamatórias. É produzido por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T e apresenta atividade celular necrótica e apoptótica, com ação adicional de resistência às infecções e cânceres, organização de órgãos linfoides, desenvolvimento do centro germinativo que conduzirá o destino de células em amadurecimento, além de promover o estímulo à resolução da inflamação e reparo tecidual (Idriss & Naismith, 2000). A partir da sua ligação a receptores específicos, desencadeia o estímulo para proliferação, crescimento e sobrevivência celular (Jang *et al.*, 2021). Ainda assim, em conjunto com a IL-1 ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), envolvido no controle da expressão de diversos genes relacionados à inflamação e apoptose, seleção clonal além de controlar a migração de células efetoras do sistema imunológico para locais específicos (Barnabei *et al.*, 2021; Kataoka, 2009). Similarmente às citocinas citadas anteriormente, sugere-se que a

produção acentuada de TNF- α esteja relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, psoríase, artrite reumatoide, espondilite anquilosante e hidradenite supurativa (Kallioli & Ivashkiv, 2016).

Diante das informações mencionadas, entende-se que o que torna efetivo a resolução da inflamação é a relação entre indutores e mediadores inflamatórios e havendo condições que perpetuem ou desequilibrem esse processo cronificando-o, contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis de elevada emergência nos dias atuais, que apresentam em comum a inflamação excessiva em todas as formas de desenvolvimento e progressão dessas doenças (Furman *et al.*, 2019). Nesse contexto, destaca-se a importância de se identificar substâncias imunomoduladoras que atuem na diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias, consequentemente reduzindo o tempo de inflamação e a probabilidade do surgimento de DCNTs.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica *in vitro* e realizar a caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*, visando investigar seu potencial biológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o teor de fenol e flavonoide do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*;
- ✓ Realizar a caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*;
- ✓ Investigar a citotoxicidade do extrato aquoso de *Ocimum basilicum*;
- ✓ Avaliar a influência do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* na produção de mediadores inflamatórios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta da planta foi realizada no município de Juiz de Fora, em Agosto de 2022 nas coordenadas [lat: 21° 46' 38" S, long: 43° 23' 18" W] e uma amostra da espécie vegetal inteira foi utilizada na preparação da exsicata, que foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESF, na Universidade Federal de Juiz de fora (*Ocimum basilicum* – 75408). A planta também possui cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (AE84FB4).

4.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL

Após triagem, as folhas e hastes do manjeriço, em conjunto, foram secas em estufa a 40°C e trituradas em moinho de facas modelo MA-048® (Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda, São Paulo, Brazil). Em seguida, 5 gramas do material vegetal foram submetidos à maceração estática utilizando 100 mL de água destilada a 40°C durante 1 hora, posteriormente armazenado ao abrigo de luz em frasco hermeticamente fechado e deixado em contato com o líquido extrator durante 24 horas em temperatura ambiente. O extrato vegetal foi liofilizado (liofilizador Alpha 1-2 LD Plus, Christ) e acondicionado sob refrigeração a -20°C para análises posteriores. O percentual de rendimento foi de 19,4% para o extrato liofilizado de *Ocimum basilicum*.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DE *OCIMUM BASILICUM*

4.3.1 Teor de fenóis totais

A quantificação de fenólicos totais foi mensurada a partir da adaptação da metodologia de Singleton & Rossi (1965). Para isso, foi preparada uma curva de calibração utilizando-se o ácido tânico como substância padrão (0,5 mg/mL em

metanol) com concentrações finais, que variaram de 0,9 a 30 µg/mL. Posteriormente, 120 µL de Folin Ciocalteu 20% (v/v em água destilada), 30 µL de amostra (1 mg/mL) e 100 µL de Carbonato de Sódio 4% (m/v em água destilada) foram adicionados em triplicata aos poços da microplaca de Elisa de 96 poços, além do branco da amostra. Em seguida, a microplaca foi armazenada ao abrigo de luz, aguardando-se 30 minutos. A leitura foi realizada a 730 nm (espectrofotômetro UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido tânico por grama de amostra.

4.3.2 Dosagem de Flavonoide

O teor de flavonoides foi avaliado através da metodologia adaptada de Miliauskas *et al.* (2004). Preparou-se uma curva de calibração utilizando-se a quercetina como padrão (1 mg/mL em etanol) com concentrações finais que variaram de 0,5 a 50 µg/mL. Sequencialmente, 120 µL de etanol, 40 µL de amostra (2 mg/mL) e 40 µL de cloreto de alumínio 2% (m/v em etanol com 5% de ácido acético) foram adicionados em triplicata aos poços da microplaca de Elisa de 96 poços, juntamente com o branco da amostra. Posteriormente a microplaca foi armazenada ao abrigo de luz, aguardando-se 40 minutos. A leitura da absorbância foi feita a 415 nm e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra.

4.3.3 Identificação dos constituintes por UFLC-MS-Q-TOF

A análise dos fitoconstituintes presentes em OB foi feito através da cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa no modo de íons positivos e negativo usando um equipamento Shi-madzu UFLC (modelo Nexera) e um espectrômetro de massa Bruker (modelo QTOF Compact) com fonte de ionização por eletrospray. Como fase móvel, foi utilizada água acidificada com ácido fórmico, pH = 3 (fase A) e metanol (fase B), com vazão de injeção de 0,4 mL/min e

tempo de corrida de 12 min. A coluna utilizada foi do tipo Kinetex 2,6 μm , C18-100A, com dimensões de 100 mm x 3,0 mm.

A corrida cromatográfica começou com 40% da fase B, aumentando para 70% aos 12,20 min e 95% aos 15,70 min. Posteriormente, a fase móvel foi devolvida a 40% B aos 17,20 min para reequilibrar a coluna, seguindo até 18,50 min, com término em 20 min. As condições de ionização foram definidas da seguinte forma: voltagem de eletrospray da fonte de íons de 40 V, voltagem capilar de 4500 V e temperatura capilar de 220 °C. A aquisição de massa de varredura completa foi realizada por varredura de 100 a 1000 m/z.

A comparação do perfil de fragmentação dos constituintes presentes no extrato foi feita por meio do banco de dados Wiley e dados da literatura. A análise foi realizada em colaboração com a Fiocruz através da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos/Fiocruz.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As análises das atividades antioxidantes foram avaliadas pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), sistema β -caroteno/ácido linoleico e pelo ensaio baseado em fluorescência para espécies reativas de oxigênio - ORAC, cujas metodologias são representadas a seguir.

4.4.1 Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O ensaio antioxidante reproduzido pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) consiste na avaliação da capacidade de uma substância em reduzir o radical livre através da transferência de elétrons (Ionita, 2021; Huang *et al.*, 2005).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi realizada conforme metodologia adaptada de Brand-Williams *et al.* (1995). As concentrações finais da amostra analisada, em $\mu\text{g/mL}$, foram: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97 e 0,49. Em uma microplaca de 96 poços para Elisa foram transferidos, em triplicata, 100 μL de amostra, seguido da adição de 50 μL de metanol nos poços laterais. Posteriormente, 50 μL de amostra foram retirados da primeira fileira e realizada a diluição seriada nos poços subsequentes. Sequencialmente, 150 μL do

radical livre DPPH foram adicionados nos poços contendo amostra + metanol, exceto no branco da amostra. Por fim, a placa foi incubada ao abrigo de luz, em temperatura ambiente, durante 30 minutos.

A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 517 nm. O controle negativo consistiu de metanol + DPPH, o qual apresenta 100% da oxidação e o branco do teste continha apenas metanol. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o branco da amostra continha amostra + metanol. O resultado foi expresso no valor médio da concentração inibitória média (CI₅₀) ± desvio padrão e pelo percentual de inibição, conforme equação a seguir:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100$$

Equação 1 - Cálculo para o percentual de inibição. Legenda: Abs_{controle}: absorbância do controle; Abs_{amostra}: absorbância da amostra.

Fonte: Brand-Williams *et al.*, 1995.

4.4.2 Sistema β-caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada conforme metodologia descrita por Marco (1968) e modificada por Miller (1971). As concentrações finais da amostra analisada, em µg/mL, foram: 38,46; 19,23; 9,61; 4,8; 2,4 e 1,2. Inicialmente foi preparada uma emulsão contendo 100 µL β-caroteno (10 mg/mL), 30 µL de ácido linoleico, 265 µL de Tween40 e 500 µL de diclorometano. Aplicou-se nitrogênio gasoso para secagem do solvente e adicionou-se 40 mL de água destilada saturada com oxigênio. Após essa etapa, 240 µL da emulsão foram transferidos para microplaca para Elisa de 96 poços e adicionados 10 µL das amostras nas devidas concentrações em triplicata. A absorbância foi ajustada entre os valores de 0,6 e 0,7 em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) avaliada a 470 nm, a cada 15 minutos, durante 120 minutos a 45°C. O controle negativo consistiu da emulsão + metanol, o qual apresenta 100% da oxidação. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o branco da amostra continha amostra + metanol. O resultado foi expresso a partir da curva de

oxidação que representa o decaimento da absorbância do β -caroteno ao longo do tempo.

Além disso, o estudo cinético da atividade antioxidante das especiarias foi estimado pelo método das tangentes descrito por Yanishlieva & Marinova (1995). Denomina-se fator 1 a relação entre as tangentes das curvas cinéticas da amostra - composto pelo meio reacional mais o extrato -, e o controle sem o antioxidante. Esse valor representa a eficiência do antioxidante em bloquear as reações iniciais de oxidação (15 – 45 minutos) através da interação com os radicais peróxidos. A fórmula da operação é representada a seguir:

$$F1 = \frac{\text{tangente do extrato (15 – 45 min)}}{\text{tangente do controle (15 – 45 min)}}$$

Equação 2 - Cálculo para avaliar a capacidade de bloqueio da formação de peróxidos.

Fonte: Yanishlieva & Marinova (1995).

Na segunda parte da curva (entre 75 – 105 min) é medida a possibilidade do antioxidante de participar de outras reações (degradação de peróxidos) durante o processo oxidativo, cujo resultado é designado de fator 2. A fórmula da operação é demonstrada a seguir:

$$F2 = \frac{\text{tangente do extrato (75 – 105 min)}}{\text{tangente do controle (75 – 105 min)}}$$

Equação 3 - Cálculo para avaliar a capacidade de bloqueio dos produtos da decomposição dos peróxidos.

Fonte: Yanishlieva & Marinova (1995).

4.4.3 Ensaio baseado em fluorescência para espécies reativas de oxigênio – ORAC

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC foi realizada conforme metodologia adaptada de Glazer *et al.* (1990). As concentrações finais da amostra analisada, em µg/mL, foram: 62,5; 37,5; 12,5; 6,25 e 3,125. Inicialmente, 300 µL de água destilada foram transferidas para os poços extremos da microplaca para Elisa de 96 poços. Foram adicionados 25 µL de amostra nas devidas concentrações, em triplicata, nos poços subsequentes. Em seguida, 150 µL de fluoresceína foram inseridos em todos os poços, exceto no branco da amostra. Posteriormente a placa foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, 25 µL de AAPH (2,2'-azobis) foram adicionados em todos os poços, exceto nos brancos e realizada agitação por 10 segundos no leitor de microplacas. A leitura da fluorescência foi realizada no modo cinético com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 538 nm, durante 60 minutos. O controle negativo consistiu de tampão fosfato + fluoresceína, o qual apresenta 100% da oxidação. O trolox foi utilizado como controle positivo e o branco da amostra continha amostra + tampão fosfato. Os resultados foram expressos a partir do valor médio de $CI_{50} \pm$ desvio padrão e pelo decaimento da fluorescência ao longo do tempo.

4.5 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

4.5.1 Linhagens celulares

No presente estudo foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774A.1 (ATCC® TIB-67) obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro e fibroblastos murinos da linhagem L929 (ATCC® CCL-1) do estoque do laboratório.

4.5.2 Cultura de células

As células foram mantidas criopreservadas (vapor de nitrogênio líquido) em meio de congelamento composto por 95% de SFB (Gibco) e 5% de DMSO (Synthy) até o momento do uso. Para o cultivo, as células foram descongeladas, transferidas para tubos cônicos (Kasvi) contendo 15 mL de meio RPMI-1640 e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo (10% de Soro Fetal Bovino - SFB), 100 U/mL de penicilina; 1µg/mL de estreptomicina e 0,1% de 2-mercaptoetanol). Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² (Kasvi) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A cada dois ou três dias, realizou-se a troca do meio de cultura. As células foram monitoradas até alcançarem confluência de aproximadamente 80%, quando então foram transferidas para garrafas maiores (75 cm²) e cultivadas nas mesmas condições. Tendo em vista que as linhagens utilizadas no estudo são aderentes, houve a necessidade de realizar o desprendimento destas células antes da transferência para garrafas maiores. Para isso, as células J774A.1 foram raspadas com auxílio de um raspador plástico (cell scraper – Sartedt) enquanto para as células L929 utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA (0,25%; Gibco) por 3 a 5 minutos a 37 °C. Novamente, as células foram incubadas (37°C, 5% CO₂) até atingir a confluência de 80% quando então realizou-se os ensaios.

4.5.3 Preparo do Extrato

O extrato foi solubilizado em meio *Roswell Park Memorial Medium* (RPMI)1640 (Gibco) de forma a obter a solução estoque. Em seguida, esta solução foi filtrada em filtros de 0,22µm (Jet Biofil) de forma a remover partículas, bem como possíveis contaminações. Para atingir as concentrações de uso, a solução estoque foi diluída em meio RPMI suplementado (5% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 100U/mL de penicilina e 1µg/mL de estreptomicina - Gibco).

4.5.4 Avaliação da viabilidade celular

A determinação da influência do extrato na viabilidade celular foi realizada segundo os padrões da ISO 10993-5:2009. Células L929 foram cultivadas até atingir a confluência necessária e removidas, conforme previamente descrito. Em seguida, o número de células viáveis foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (Sigma) e transferidas para placas de 96 poços de fundo chato (Kasvi), na concentração de 1×10^4 células por poço. As células foram então incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A segunda etapa do ensaio consistiu na remoção do meio de cultura presente, com consequente retirada de células mortas, e adição de 100 µL de meio RPMI completo (com 5% SFB) e 100µL dos extratos, perfazendo seis diferentes concentrações (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL) em sextuplicata. Todas as placas continham controles não tratados (apenas meio de cultura).

Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 50 µL da solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - Thermo Fischer Scientific) solubilizado em RPMI (1 mg/mL). A placa foi incubada por um período adicional de 2 horas (37°C, 5%CO₂). Ao final deste intervalo, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram ressuspensos em DMSO (Dinâmica). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm. Para calcular a viabilidade foi utilizada a equação mostrada abaixo:

$$\text{Viabilidade}(\%) = \frac{100 \times DO_{595a}}{DO_{595CTe}}$$

Equação 4 – Cálculo do percentual de viabilidade. Legenda: DO_{595a}: valor da densidade óptica das amostras testadas; DO_{595CTe}: valor médio da densidade óptica do controle não tratado. Fonte: ISO 10993-5: 2009.

4.5.5 Determinação da produção de óxido nítrico

A determinação da produção de Óxido Nítrico (NO) foi realizada de maneira indireta, avaliando-se a concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante das culturas de células J774A.1 através da Reação de Griess. Para isso, células J774A.1 foram plaqueadas conforme descrito previamente, na concentração de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e as células foram estimuladas com $0,1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich®) juntamente com $0,9 \text{ ng/mL}$ da citocina interferon- γ (IFN- γ) por 60 minutos, quando então procedeu-se os tratamentos com $50 \mu\text{L}$ do extrato nas concentrações desejadas. Após 48 horas de incubação os sobrenadantes foram coletados e a concentração de nitrito determinada conforme descrito abaixo. Em todas as análises, a viabilidade celular também foi determinada nestas células (teste de MTT conforme previamente descrito), de forma a excluir fatores externos.

Para determinar a concentração de nitrito, $50 \mu\text{L}$ os sobrenadantes das culturas de células foram plaqueados ($50 \mu\text{L}$ /poço) em placas de 96 poços de fundo chato. Em seguida adicionou-se $50 \mu\text{L}$ do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% e alfa-naftiletilenodiamina 0,1%). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de nitrito (NO_2) nas amostras foi calculada por meio de uma curva padrão de uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) (Guevara *et al.*, 1998). O ensaio foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em μM .

4.5.5 Dosagem de Citocinas

Para a determinação da produção de citocinas, células J774A.1 foram cultivadas e plaqueadas conforme descrito previamente, na concentração de 5×10^4 células/poço. Em seguida, as células foram estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) e incubadas por uma hora (37°C , 5% CO_2). Após o período de incubação, as células foram tratadas com $50 \mu\text{L}$ do extrato nas concentrações desejadas. Após 24 (TNF- α) ou 48 horas (IL-6, IL-12) do tratamento, o

sobrenadante foi coletado e a concentração de citocinas determinada por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) do tipo sanduíche, usando kits comerciais (Becton & Dickinson Company), conforme protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado em quadruplicada, sendo repetido por, no mínimo, duas vezes. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8 (versão 8.0, GraphPad Software Inc.), por meio na análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FENÓLICOS TOTAIS E TEOR DE FLAVONOIDES

Os valores correspondentes ao conteúdo de fenólicos totais e flavonoides estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Análise de fenois totais e teor de flavonoide

Fenólicos Totais (mg de equivalentes de ácido tânico/g de amostra)		Teor de Flavonoides (mg de equivalentes de quercetina/g de amostra)	
<i>Ocimum Basilicum</i>	121,34 ± 8,40	<i>Ocimum basilicum</i>	6,17 ± 0,58

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A partir desses resultados é possível observar uma quantidade reduzida de flavonoide no extrato aquoso de OB, sugerindo a presença de outras classes de

compostos fenólicos na amostra. Sabe-se que a produção de metabólitos secundários pelas plantas ocorre a partir de condições que possam colocar em risco a sobrevivência e a perpetuação da espécie vegetal (Yang *et al.*, 2018). Dessa forma, estudos relatam que a síntese de compostos fenólicos, em especial de flavonoides, é favorecida em condições de alta incidência solar, pois a radiação ultravioleta e temperaturas elevadas são fontes de estresse ambiental. Ferrera *et al.* (2016) mostraram uma produção 4,5 vezes maior de flavonoides no verão, quando comparada à estação de outono. Dessa forma, uma provável explicação para uma quantificação diminuída de flavonoides no extrato aquoso de OB poderia ser a estação do ano na qual houve a coleta da planta.

O consumo de alimentos fontes de fitoquímicos tem apresentado efeitos promissores que diz respeito às propriedades biológicas observadas em relação às doenças crônicas não transmissíveis e esses benefícios podem ser atribuídos à presença dos compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonoides, por exemplo. Nesse sentido, Naz *et al.* (2023) atribuíram a presença de polifenóis aos efeitos antihiperlipidêmicos a partir de estudos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Dentre os mecanismos de ação observados pode-se listar a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase relacionadas à absorção de carboidratos, regulação da secreção e sinalização de insulina, estímulo à proliferação de células β -pancreáticas, manutenção da saúde intestinal, modulação do sistema imunológico e inibição da formação de produtos finais de glicação avançada.

Ibrahim *et al.* (2019) avaliaram o efeito protetor do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* na indução de lesão testicular em ratos, realizou uma triagem fitoquímica e quantificou o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides. Os valores observados nessa pesquisa foram similares aos observados no presente estudo, diferindo de forma mais notável na dosagem de flavonoides.

É importante considerar que a constituição fitoquímica sofre influência de vários fatores como espécie, área geográfica, época de colheita, parte anatômica da planta, clima, solo, incidência solar, armazenamento, tipo de extração, etc. (Firenzuoli & Gori, 2007) e esses determinantes podem justificar as diferenças observadas em relação aos estudos.

Nesse mesmo contexto, Kaurinovic *et al.* (2011) realizaram uma investigação a respeito das atividades antioxidantes de diferentes extratos de plantas com diversos solventes, dentre eles destaca-se o extrato aquoso de *Ocimum basilicum*, que

comparativamente apresentou concentrações semelhante referentes à fenólicos totais e flavonoides. Os autores fizeram uma correlação entre os teores de fenóis e flavonoides com a capacidade antioxidante dos extratos e sugeriram que a quantidade de metabólitos secundários não é um fator que deve ser considerado exclusivamente determinante para justificar a atividade antioxidante dos extratos, mas os tipos de compostos bioativos presentes são também fundamentais para determinar a efetividade biológica, que mesmo em concentrações reduzidas, podem apresentar efeitos promissores.

Por outro lado, Nadeem *et al.* (2022) investigaram a toxicidade, a atividade antioxidante e o perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ocimum basilicum* e dentre os resultados encontrados, a quantidade de flavonoide do extrato aquoso foi similar com o valor observado neste trabalho (6,49 mg de equivalentes de quercetina/g de amostra), embora a concentração de fenólicos totais tenha sido expressivamente inferior.

Outro estudo investigou as atividades biológicas de algumas plantas do gênero *Ocimum* através da extração comparativa com diferentes solventes. Em relação aos outros solventes avaliados (acetona, metanol e etanol), Sharma *et al.* (2022) notou que o extrato aquoso da espécie *Ocimum basilicum* foi o que apresentou menor conteúdo de fenóis e flavonoides e coincidentemente exibiu valor semelhante de fenólicos totais em relação ao notado nesta pesquisa (168 mg de equivalentes de ácido gálico/g de amostra). Essa quantificação inferior pode ser justificada pela polaridade do solvente, visto que os fitoconstituintes presentes em caules e folhas possuem natureza mais apolar e a utilização de solventes como etanol e metanol podem favorecer a extração de determinadas substâncias (Eloff, 2019).

Dudonné *et al.* (2009) fizeram um estudo comparativo entre diferentes técnicas para avaliação da atividade antioxidante de diversos trinta extratos aquosos de plantas, destacando a importância do conteúdo de compostos fenólicos para justificar as propriedades apresentadas pelas plantas avaliadas, explicando que a presença de hidroxilas é responsável pela formação de radicais fenoxil estabilizados por ressonância. Os autores destacaram também a relevância da avaliação da atividade biológica de extratos aquosos e sua aplicabilidade na produção de nutracêuticos e conservantes alimentares, visto que são mais seguros para o uso humano.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR UFLC-MS-Q-TOF

Observa-se na Tabela 3 que a maioria dos compostos presentes no extrato aquoso de *Ocimum basilicum* são ácidos fenólicos e apenas dois flavonoides foram caracterizados. Todas as substâncias anotadas foram determinadas por razão massa/carga (m/z) do íon molecular e dos fragmentos nos modos positivos e negativos, seguido da comparação a partir de trabalhos na literatura avaliando a mesma espécie de planta.

No tempo de retenção de 1,1 minuto, o ácido p-hidroxibenzoico mostrou m/z 294,1551 $[M + H]^+$ e 175,1079 $[M + Cl]^-$ no modo positivo. O ácido quínico foi encontrado no modo negativo com m/z de 191,0582, seguido do ácido chicórico identificado no modo positivo e m/z de 513,1374. A rutina, um dos flavonoides caracterizados, apresentou-se no modo positivo com m/z de 609,1481. Outros polifenóis anotados foram os ácidos clorogênico ($Tr = 2,9$; $m/z = 355,1684$), caftárico ($Tr = 3,9$; $m/z = 349,1207$), gálico ($Tr = 4,6$; $m/z = 193,1167$), ferúlico ($Tr = 5,2$; $m/z = 231,1310$) e rosmarínico ($Tr = 8,0$; $m/z = 329,1939$). Por fim, no tempo de retenção de 10,4 minutos foi encontrada a quercetina com m/z de 339,2029.

Tabela 3 - Identificação dos compostos do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* por UFLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (TR), modos negativo e positivo $[M-H]^-$ / $[M+H]^+$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências.

Nº	T _R (min)	Modo	Fragmentação	Compostos Caracterizados	Referências
1	1,1	$[M+H]^+$	294,1551 $[2M + NH_4]^+$; 175,1079 $[M + Cl]^-$;	Ácido p-hidroxibenzoico	Housse <i>et al.</i> , 2023
2	1,4	$[M-H]^-$	191.0582 $[M - H]^-$;	Ácido quínico	Fernandes <i>et al.</i> , 2019
3	1,6	$[M+H]^+$	513,1374 $[M + K]^+$;	Ácido chicórico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2020
4	2,3	$[M-H]^-$	609,1481 $[M - H]^-$; 523,2349 $[M - H - CO_2 - CO]^-$;	Rutina	Housse <i>et al.</i> , 2023; Ibrahim <i>et al.</i> , 2020; Ullah <i>et al.</i> , 2022
5	2,9	$[M+H]^+$	355,1684 $[M + H]^+$;	Ácido clorogênico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2020
6	3,9	$[M+H]^+$	349,1207 $[M + Cl]^-$;	Ácido caftárico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2020
7	4,6	$[M+H]^+$	193,1167 $[M + Na]^+$;	Ácido gálico	Housse <i>et al.</i> , 2023; Ullah <i>et al.</i> , 2022
8	5,2	$[M+H]^+$	231,1310 $[M + Cl]^-$;	Ácido ferúlico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2020
9	8,0	$[M+H]^+$	329,1939 $[M + K]^+$;	Ácido rosmarínico	Housse <i>et al.</i> , 2023; Nadeen <i>et al.</i> , 2022; Ullah <i>et al.</i> , 2022
10	10,4	$[M-H]^-$	339,2029 $[M + Cl]^-$;	Quercetina	Housse <i>et al.</i> , 2023; Ibrahim <i>et al.</i> , 2020; Ullah <i>et al.</i> , 2022

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Condizente com os resultados de fenóis e flavonoides obtidos previamente, na caracterização do extrato de OB, foi possível observar que o conteúdo de flavonoides na amostra apresentou-se pouco expressivo e que a presença de ácidos fenólicos prevaleceu. Nesse contexto, todos os metabólitos secundários caracterizados apresentam atividades biológicas descritas na literatura.

Os fitoquímicos são produzidos por espécies vegetais com múltiplas finalidades, que vão desde a proteção da planta contra estresse ambiental e agentes predadores, à atração de polinizadores para germinação e dispersão de sementes (Martinez *et al.*, 2017). Na saúde humana, as funcionalidades também são amplas e várias pesquisas relatam efeitos benéficos relacionado ao consumo de substâncias bioativas (Kussmann *et al.*, 2023; Sorrenti *et al.*, 2023).

Após a quantificação do teor de fenólicos totais e flavonoides foi realizada a caracterização dos fitoconstituintes empregando o método de cromatografia líquida de alta eficiência associado à espectrometria de massas (UFLC-MS-Q-TOF). Foram caracterizados dez compostos, sendo eles os ácidos fénilocos p-hidrobenzoico, quínico, chicórico, clorogênico, caftarico, gálico, ferúlico e rosmarínico; além dos flavonoides rutina e quercetina.

Amplamente distribuído em fontes alimentares, o ácido p-hidroxibenzoico é um composto fenólico que apresenta diversos efeitos positivos à saúde, exercendo atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiaterogênica, além de atuar como agente antimutagênico e hipoglicemiante (Kalinowska *et al.*, 2021; Manuja *et al.*, 2013;), atraindo, dessa forma, o interesse de indústrias nas áreas de tecnologia de alimentos, suplementos alimentares e medicamentos (Gong & Zha, 2022).

O ácido quínico é encontrado em uma variedade de alimentos como batata, cenoura, tomate e café e alguns estudos destacam suas propriedades anti-inflamatórias e antivirais (Zanello *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2009). O ácido chicórico é um derivado do ácido cafeico, sendo bastante utilizado no âmbito medicinal, químico e agrícola. Seus efeitos na saúde baseiam-se na sua atuação como agente hipoglicemiante, hipolipemiante, antienvhecimento, antioxidante, anti-inflamatório e contra afecções do trato gastrointestinal (Yang *et al.*, 2022).

Outro ácido fenólico observado no extrato foi o ácido clorogênico, cuja fonte mais abundante é o café verde. A utilização deste metabólito confere proteção ao sistema renal, hepático e nervoso, somado as suas atividades antioxidante,

antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, hipoglicemiantes e reguladora do metabolismo lipídico (Wang *et al.*, 2022).

Com exceção do ácido gálico que é derivado do ácido hidrozibenzoico, os ácidos caftárico, rosmarínico e ferúlico são derivados do ácido hidroxicinâmico e conjuntamente apresentam atividades biológicas bem consolidadas, seja em estudos *in vitro* e *in vivo*. Estudos demonstram atividade imunomoduladora, atuação promissora em doenças de caráter metabólico como obesidade e síndrome metabólica, além da redução de marcadores de estresse oxidativo ao mesmo tempo que complementa o sistema antioxidante endógeno (Kahkeshani *et al.*, 2019). Presente em altas concentrações na semente e no suco de uva, o ácido caftárico é utilizado com propriedades hipoglicemiante e anti-hipertensiva. Estudos em modelo animal sugerem atividade antimutagênica e quimipreventiva (Koriem, 2020). O ácido rosmarínico está presente em uma variedade de plantas da família *Laminaceae* e suas aplicações são relevantes em distúrbios alérgicos, osteoartríticos e dermatológicos, além de seus efeitos em doenças metabólicas (Hitl *et al.*, 2021). O ácido ferúlico apresenta atividade antiplaquetária, atuando no combate aos radicais livres, inflamação e processos fibróticos, além de apresentar efeitos antiapoptóticos (Li *et al.*, 2021).

Por fim, a quercetina e a rutina são dois flavonoides que estão inseridos no subgrupo dos flavonols, sendo a rutina um glicosídeo da quercetina. A rutina apresenta propriedades antifúngica, antimicrobiana e antialérgica (Negahdari *et al.*, 2021), enquanto pesquisas inferem que a quercetina exerça proteção cardiovascular, além de atuar contra toxicidade de micotoxinas e no tratamento da imunossupressão (Yang *et al.*, 2020). Ambas compartilham efeitos contra o estresse oxidativo e inflamação.

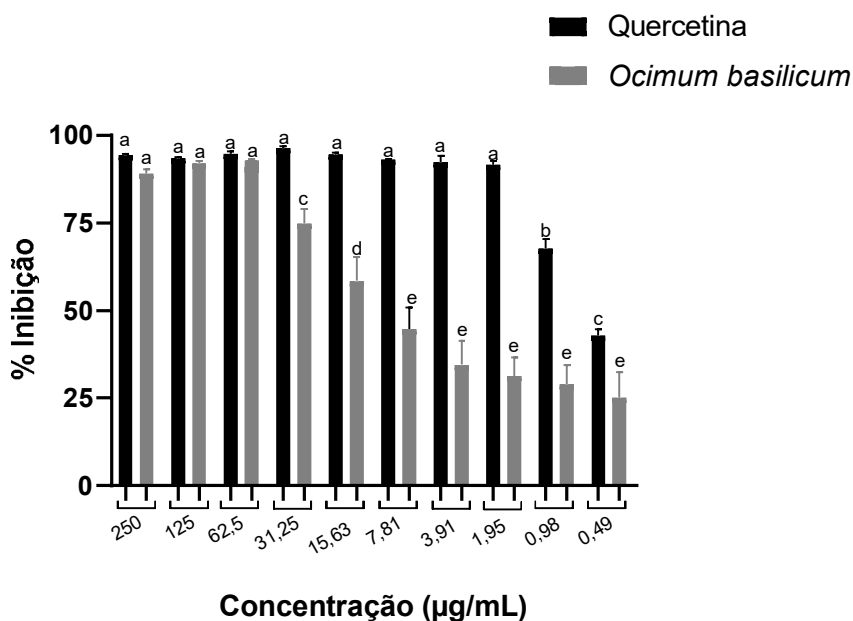
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise do percentual de inibição foi avaliada e a partir do que está representado na Figura 3, sendo possível verificar que entre as concentrações de 250 a 31,25 µg/mL o extrato aquoso de OB apresentou percentual de inibição superior a 90% e estatisticamente igual à quercetina ($p < 0,05$). Os percentuais de inibição apresentaram decaimento em seus valores conforme a redução das concentrações

do extrato, diferentemente da quercetina, que só apresentou redução em seu percentual de inibição a partir da penúltima concentração (0,98 µg/mL).

É interessante notar, que mesmo após diluição, o percentual de inibição do extrato aquoso de OB manteve-se constante a partir da concentração de 7,81 µg/mL, apresentando capacidade de inibição acima de 40% mesmo na concentração mais reduzida de 0,49 µg/mL.

Figura 3 – Percentuais de inibição do radical livre DPPH pelo extrato aquoso de *Ocimum basilicum* e quercetina em diferentes concentrações.



Diferenças estatística em relação ao controle positivo quercetina são representadas por letras diferentes ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Além do percentual de inibição, outra forma de representar os resultados de atividade antioxidante é baseado no valor de CI_{50} , que equivale à concentração de uma substância necessária para promover a inibição do radical livre em 50% (Swinney, 2011). De acordo com a Tabela 4, observa-se que não houve diferença estatística entre o extrato e a substância de referência, evidenciando que em

pequenas concentrações o extrato aquoso de OB foi efetivo em inibir pela metade a concentração do radical.

Tabela 4 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e quercetina, através do método de inibição do radical livre DPPH. Resultados expressos em valores de CI_{50} .

DPPH - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Quercetina	$0,20 \pm 0,03^a$
<i>Ocimum basilicum</i>	$2,78 \pm 0,61^a$

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente ($p<0,05$). ANOVA seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

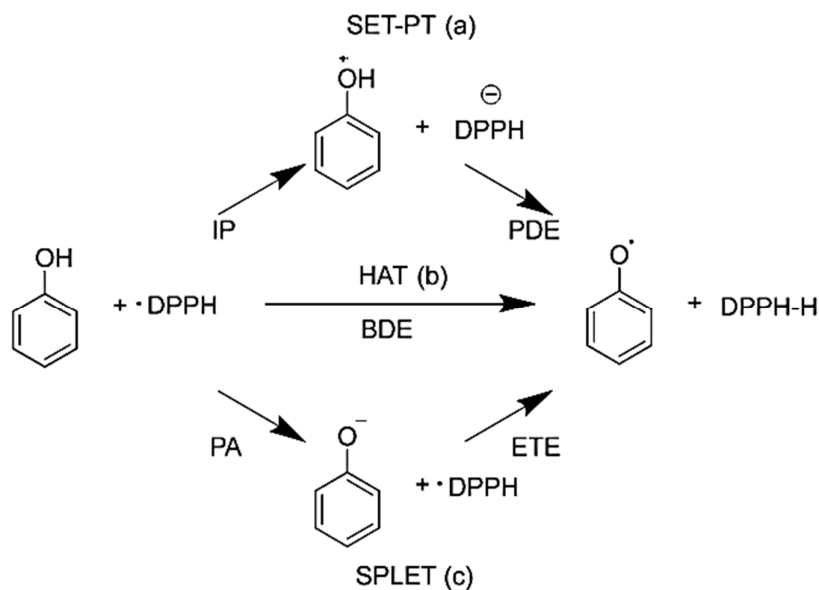
Substâncias com propriedades antioxidantes são de extrema importância visto que possuem atuação na neutralização e eliminação de espécies reativas. Nesse sentido, é relevante pensar na notabilidade do consumo de alimentos com propriedades antioxidantes contrapondo à grande tendência ao surgimento de DCNT, uma vez que a sua incorporação à dieta potencializa o sistema de defesa antioxidante enzimático no combate aos radicais livres e atua contra o processo de estresse oxidativo que ocorre de forma comum em todas essas doenças crônicas (Phillips *et al.*, 2019).

Kashino *et al.* (2019) conduziram um estudo de coorte prospectivo com a população japonesa e chegaram à conclusão de que a capacidade antioxidante não enzimática, ou seja, o conteúdo de antioxidantes obtidos por meio da alimentação apresentou correlação inversa com o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares, sugerindo que quanto maior o consumo de alimentos com potencial antioxidante, maior é o efeito cardioprotetor.

De acordo com Yamauchi *et al.* (2024) existem três mecanismos possíveis de estabilizar o radical livre DPPH, os quais são mostrados na Figura 4. A primeira possibilidade compreende a capacidade da substância antioxidante em doar um único elétron seguido da transferência de um próton (a); a segunda opção consiste na doação de um átomo de hidrogênio; e o terceiro mecanismo é a transferência

sequencial de elétrons por perda de prótons (c). O tipo de reação estabilizadora é influenciado por vários fatores como perfil antioxidante, pH, solvente, dentre outros.

Figura 4: Mecanismos de ação na redução do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)



Fonte: Yamauchi *et al.* (2024).

Um estudo de Elansary & Mahmoudc (2015) avaliaram a atividade antioxidante e antiproliferativa de seis diferentes cultivares de manjerição, dentre elas, o extrato aquoso e metanólico de *Ocimum basilicum*. Curiosamente, os percentuais de inibição do extrato aquoso foram menores quando comparados aos nossos resultados, diferença que poderia ser justificada pela forma de extração. No trabalho citado, os autores realizaram a infusão da planta e o emprego de temperaturas mais elevadas pode ter sido um dos fatores responsáveis pela degradação de substâncias com propriedades bioativas. Santos & Tonin (2019) estudaram a influência da temperatura de secagem e tipo de solvente extrator na capacidade antioxidante de uma determinada substância e observaram redução da atividade antioxidante dependente da temperatura, mas ausência da influência desta sobre o conteúdo de flavonoides, embasando a justificativa de que não apenas a concentração da substância tem papel importante na atividade biológica, como também o tipo de

fitoconstituente presente no extrato produzido e a metodologia utilizada para avaliação das propriedades biológicas.

A análise da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB também foi avaliada pelo ensaio baseado na capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC), metodologia muito utilizada na análise de alimentos. Nesse teste, é observado, a partir de parâmetros cinéticos, a capacidade da substância avaliada em inibir a propagação de radicais peroxil - à medida que a reação progride, mais antioxidante é consumido, visto que a geração de radicais apresenta fluxo constante. Quanto menor a capacidade de inibir a formação de radicais peroxil gerados pela decomposição térmica de um composto azo (AAPH), maior a intensidade de decaimento da fluorescência, maior a oxidação e, conseqüentemente, menor a capacidade antioxidante da substância testada (Carvalho *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2005).

Conforme observado na Tabela 5, a atividade antioxidante do extrato foi menor quando comparado ao controle positivo Trolox, um análogo solúvel da vitamina E.

Tabela 5 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e trolox, através do ensaio baseado na capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Resultados expressos em valores de CI_{50} .

CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
ORAC	
Trolox	$4,48 \pm 0,73^a$
<i>Ocimum basilicum</i>	$10,03 \pm 0,21^b$

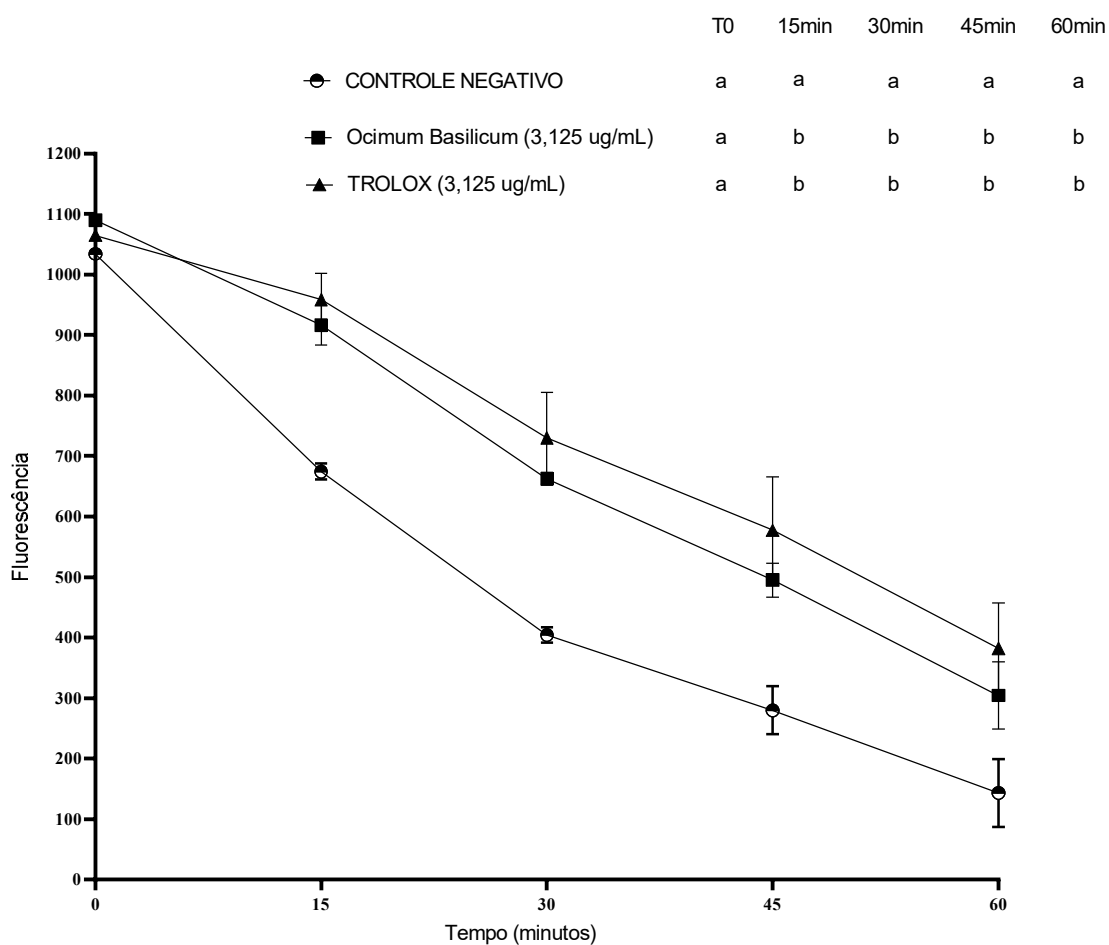
Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente ($p<0,05$). ANOVA seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Por outro lado, através da observação da área sobre a curva de decaimento da fluorescência representada na Figura 5, é possível reparar a capacidade do extrato

em manter a fluorescência do sistema ao longo do tempo de forma muito semelhante ao trolox, não diferindo do controle positivo ao longo dos 60 minutos do teste.

Figura 5 – Perfil de decaimento da fluorescência avaliada com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 538 nm, durante 60 minutos.



Atividade antioxidante do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* e trolox por meio da preservação da fluorescência ao longo de 60 minutos. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Carvalho *et al.* (2023) indicaram formas de interpretação de dados do ORAC em seus estudos, onde foram apresentados a dinâmica de eliminação dos radicais gerados no sistema e a comparação do uso de diferentes controles positivos na eficiência da análise. Um dos pontos discutidos na pesquisa referiu-se à importância de considerar a diferença entre o comportamento de compostos puros e matriz alimentar complexa, enfatizando que os resultados podem diferir mesmo se tratando do mesmo sistema, levando à subestimação da capacidade antioxidante da substância avaliada quando esta é uma mistura de compostos. Essa consideração pode aplicar-se ao extrato aquoso bruto de OB, que apresentou atividade antioxidante inferior ao Trolox comparando-se os valores de CI_{50} .

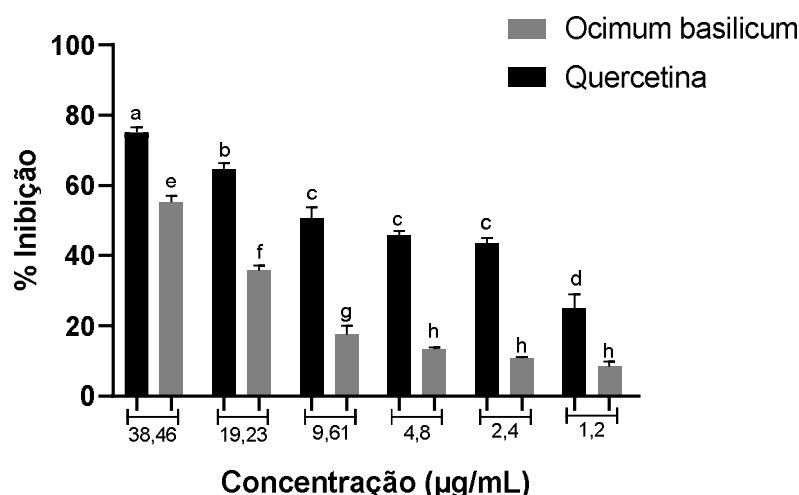
Besaid *et al.* (2022) realizaram um estudo comparativo relacionado ao conteúdo de fenólicos, capacidade antioxidante, caracterização fitoquímica e potencial imunomodulador entre os extratos aquoso e etanólico de folhas e caules de *Ocimum basilicum*. Os extratos etanólicos de folhas e caules apresentaram resultados da atividade antioxidante pelo método ORAC superiores aos extratos aquosos de ambas as partes da planta, ao mesmo tempo que o extrato etanólico das folhas e aquoso dos caules tiveram teores mais elevados de compostos fenólicos. Os autores justificaram as diferenças observadas devido às funções metabólicas distintas associadas a determinadas partes específicas da planta, além da consideração da presença de variáveis externas como condições climáticas, período do ano, solvente utilizado e demais fatores já mencionados anteriormente.

A atividade antioxidante de uma determinada substância sofre influência de vários fatores já mencionados anteriormente, abrangendo desde fatores ambientais a tipos diferentes de metodologias. Dessa forma, uma revisão de Frankel & Meyer (2000) evidenciou a importância de se avaliar de forma unidimensional a atividade antioxidante de um composto, utilizar de técnicas adicionais de forma a abranger condições que incluam testar diversas condições de oxidação, mimetizar processos biológicos, mensurar produtos iniciais e finais de oxidação, utilizar as mesmas concentrações entre extrato e substância padrão a nível de comparação da atividade antioxidante e expressar os resultados de diferentes formas. Por isso, outra forma de avaliar a capacidade antioxidante do extrato de manjerição foi analisada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, técnica que avalia a capacidade da amostra testada de inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação lipídica do ácido linoleico.

Portanto, trata-se de uma técnica espectrofotométrica que analisa a eficiência da amostra em proteger o substrato lipídico da oxidação do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação do ácido linoleico (Miller, 1971; Marco, 1968). Dessa forma, quanto maior a degradação oxidativa do ácido linoleico maior a descoloração do β -caroteno, reduzindo a absorbância do teste.

A Figura 6 apresenta o percentual de inibição de acordo com as concentrações testadas, indicando uma atividade acima de 50% na maior concentração, porém inferior à quercetina em todas as concentrações.

Figura 6 - Percentual de inibição do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* e quercetina em diferentes concentrações.

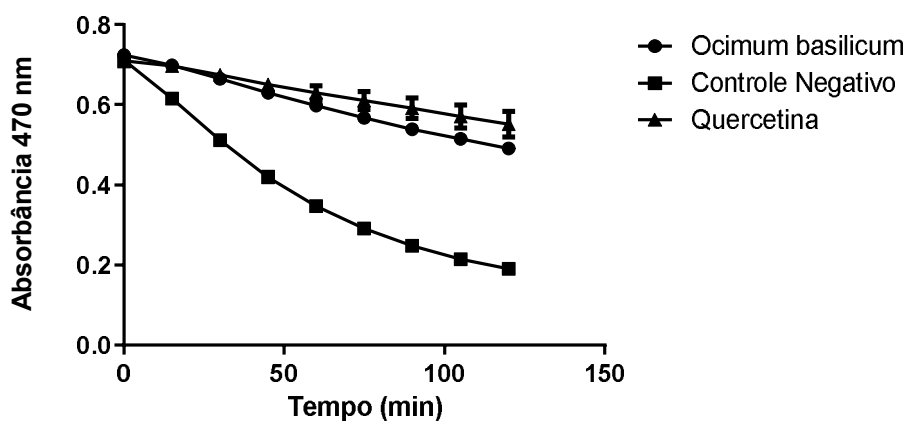


Legenda: Diferenças estatística em relação ao controle positivo quercetina são representadas por letras diferentes ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Figura 7 apresenta a oxidação do β -caroteno durante 120 minutos. É possível observar atividade antioxidante de *Ocimum basilicum* semelhante à quercetina, justificada pelo baixo decaimento da absorbância ao longo do tempo, evidenciando a capacidade do extrato em agir como inibidor da peroxidação lipídica.

Figura 7 – Perfil de decaimento da absorbância do β -caroteno (curva de oxidação), avaliada em 470 nm, mostrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação



Legenda: Atividade antioxidante do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* por meio da inibição da peroxidação lipídica e preservação da coloração do β -caroteno ao longo de 120 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Além dos gráficos representando o percentual de inibição e a curva de oxidação do ácido linoleico ao longo de 120 minutos, a técnica descrita permite realizar algumas interpretações adicionais relacionadas ao resultado da metodologia, dentre elas, o estudo cinético pelo método das tangentes, o qual determina que valores do fator 1 (F1) - referente à capacidade de bloqueio da formação de peróxidos (entre 15 e 45 minutos) - e do fator 2 (F2) - correspondente à eficiência na inibição de produtos da decomposição de peróxidos e outras espécies radicalares (entre 75 e 90 minutos) -, próximos a 1 estão relacionados à baixa atividade antioxidante do composto avaliado (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

Dessa forma, os achados sugerem que a atividade antioxidante do extrato foi mais efetiva no bloqueio da formação de peróxidos, devido a um valor reduzido do fator 1 (OB = $0,23339 \pm 0,039752$), em comparação ao fator 2 (OB = $0,727551 \pm 0,13398$). No entanto, mesmo apresentando resultados mais próximos de 1, é possível sugerir que o extrato aquoso de OB também apresentou capacidade de inibição dos

produtos finais de degradação de peróxidos mesmo que de forma menos eficiente, visto que não diferiu estatisticamente da quercetina, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de OB e quercetina pelo ensaio do β -caroteno/ácido linoleico, através do estudo cinético pelo método das tangentes.

Amostras	F1	F2
Quercetina	0,19 $\pm$ 0,01 ^a	0,75 $\pm$ 0,10 ^a
<i>Ocimum basilicum</i>	0,23 $\pm$ 0,04 ^b	0,73 $\pm$ 0,13 ^a

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente (p<0,05). ANOVA seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

É possível comparar o gráfico que representa a curva de oxidação do ácido linoleico junto aos resultados do estudo cinético pelo método das tangentes e observar que nos primeiros 45 minutos iniciais de reação o extrato de manjerição foi capaz de manter a absorbância do sistema de forma mais eficiente, justificando-se valores mais reduzidos do fator 1; em contrapartida, é possível perceber um maior decaimento da absorbância nos minutos finais de reação, isso condiz com os valores mais elevados do fator F2. Portanto, é possível inferir que o extrato apresentou maior efetividade na inibição da formação de peróxidos quando comparado à capacidade de inibição de produtos da decomposição de peróxidos e outras espécies de radicais livres.

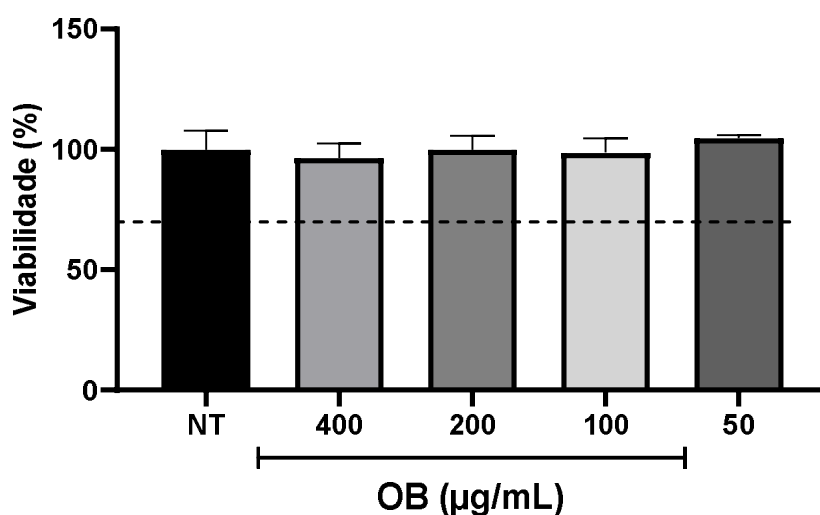
Poucos trabalhos avaliaram a atividade antioxidante de *Ocimum basilicum* pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e mesmo aqueles que foram pesquisados, não realizaram o estudo cinético pelo método das tangentes. Ademais, os estudos obtidos a partir da busca na literatura são referentes aos óleos essenciais e espécies diferentes da planta, não sendo possível realizar a comparação de resultados. Por outro lado, é importante destacar a originalidade em reproduzir essa técnica no presente estudo. Elansary & Mahmoud (2015) avaliaram as atividades antioxidante e antiproliferativa de diferentes extratos de cultivares de manjerição. Os percentuais

de inibição do ensaio β -caroteno/ácido linoleico apresentaram-se superiores aos observados no presente estudo, cuja justificativa pode ser pautada na diferença de extração. No trabalho citado, os autores produziram o extrato a partir da infusão da planta, diferentemente do que foi realizado neste estudo, que empregou a maceração à 40°C. A temperatura é um dos fatores que pode influenciar na concentração e tipo de fitoconstituente extraído.

5.4 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

A Figura 8 representa o gráfico de viabilidade celular em linhagem de fibroblastos (L929) analisada pelo método MTT. Seguindo como referência a ISO10993-5:2009, que considera aceitável uma taxa de sobrevivência celular acima de 70% é possível observar que o extrato, mesmo na maior concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de manter o percentual de células viáveis em cerca de 96%, evidenciando baixa citotoxicidade.

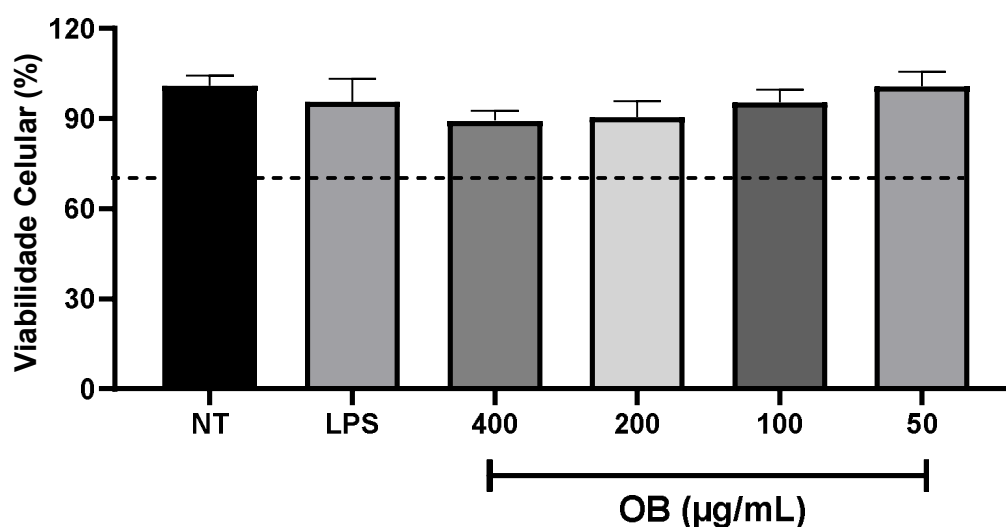
Figura 8 – Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* na linhagem celular L929 em diferentes concentrações.



Legenda: A linha tracejada indica o percentual de viabilidade celular de 70% (mínimo aceitável de acordo com a ISO10993-5:2009). Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NT: não tratado.
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Em seguida a mesma técnica foi utilizada para avaliar os efeitos do extrato aquoso de OB na linhagem celular de macrófagos murinos - J774A.1 -, conforme Figura 9. Da mesma forma como observado na linhagem celular L929, a cultura de macrófagos apresentou percentual de viabilidade correspondente à 89% na maior concentração e esses percentuais foram aumentados proporcionalmente à redução das concentrações do extrato.

Figura 9 – Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* e em linhagem celular J774A.1 em diferentes concentrações.



Legenda: A linha tracejada indica o percentual de viabilidade celular de 70% (mínimo aceitável de acordo com a ISO10993-5:2009). Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NT: não tratado, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O aumento na prevalência das DCNTs despertou o interesse pela busca do entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese dessas alterações. Várias pesquisas relacionam a mudança de estilo de vida, a qual pode-se destacar a inadequação de fatores dietéticos como um dos pilares para o surgimento de uma inflamação metabólica crônica, chamada de metainflamação, caracterizada

pela alteração da homeostasia imunometabólica (Christ *et al.*, 2019; Phillips *et al.*, 2019; Hariharan *et al.*, 2022).

Por outro lado, cresce na mesma proporção a busca por compostos bioativos que exerçam funções imunomoduladora, preventiva e atue na melhora de parâmetros inflamatórios com função coadjuvante ao tratamento medicamentoso (Rangel-Huerta & Gil, 2016). Nessa perspectiva, destacam-se as especiarias, que ganharam notoriedade não apenas pelo emprego na culinária, atribuindo sabor, cor e aroma aos alimentos, como também atuando para fins medicinais e terapêuticos em condições de doenças crônicas (Jiang, 2019). Contudo, é de extrema relevância considerar que o uso de fontes vegetais para fins medicinais deve ser seguro, justificando a necessidade de estudos que avaliam sua toxicidade.

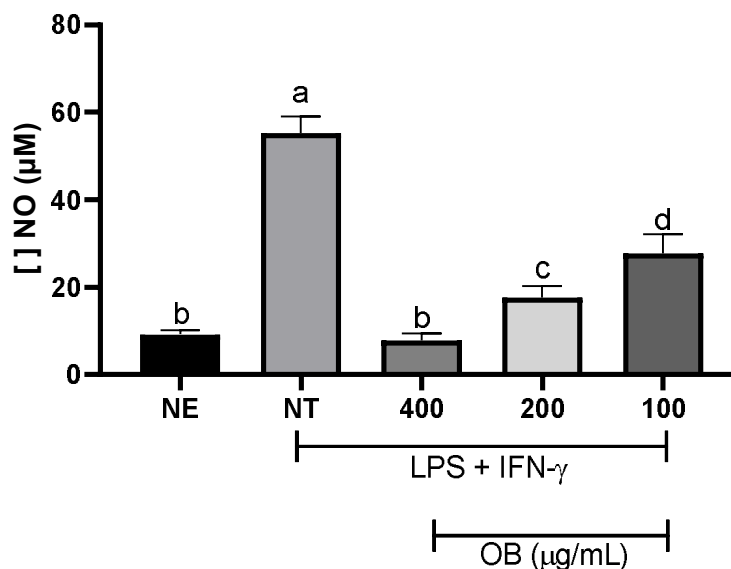
Besaid *et al.* (2022) realizaram um estudo, no qual, buscaram avaliar os efeitos biológicos dos extratos aquoso e etanólico de folhas e caules de *Ocimum basilicum*. Além da análise antioxidante e fitoquímica, os autores investigaram a citotoxicidade dos extratos na linhagem celular de macrófagos J774A.1 estimulados e observaram que ambos os extratos - etanólico e aquoso de folhas e caules - não alteraram a viabilidade da célula avaliada em concentrações que variaram de 200 a 50 µg/mL. Esses resultados foram compatíveis aos adquiridos no nosso estudo, sugerindo a possibilidade de explorar novas ações biológicas, considerando a ausência de citotoxicidade.

5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO*

5.5.1 Influência do extrato na produção de NO por células J774A.1

Foi avaliado a influência do extrato aquoso na produção de óxido nítrico por células J774A.1 estimuladas, por meio da reação de Griess. Conforme ilustrado na Figura 10, é possível observar que todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir a produção de óxido nítrico quando comparadas ao controle não tratado, evidenciando a atividade promissora do extrato de OB.

Figura 10 – Avaliação da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* em linhagem celular J774A.1 em diferentes concentrações.



Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NE: não estimulado, NT: não tratado. Estatística: análise de variância, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O surgimento das DCNTs compartilha em comum um estado inflamatório crônico, que recebe grande influência do sistema imunológico na secreção de diversas substâncias, dentre elas o óxido nítrico, um radical livre produzido por neutrófilos a partir do aminoácido arginina, cuja reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Kumar & Dikshit, 2024; Cinelli *et al.*, 2020).

A produção de óxido nítrico está relacionada à eliminação de patógenos invasores, mas também à ativação das enzimas ciclo-oxigenases (COX), que agem sobre o ácido aracdônico, culminando com a produção de produção dos mediadores lipídicos, prostaglandinas e tromboxanos. Prostaglandinas e tromboxanos exercem grande influência na inflamação, uma vez que atuam promovendo a vasodilatação e podem induzir a produção de quimiocinas e citocinas (Salvemini *et al.*, 2013).

Nesse contexto, destaca-se a importância de identificar compostos que atuem na regulação da resposta inflamatória com a finalidade de modular a atividade imunológica e prevenir a perpetuação de um processo inflamatório, reduzindo os efeitos adversos observados no tratamento alopático (Garg *et al.*, 2023).

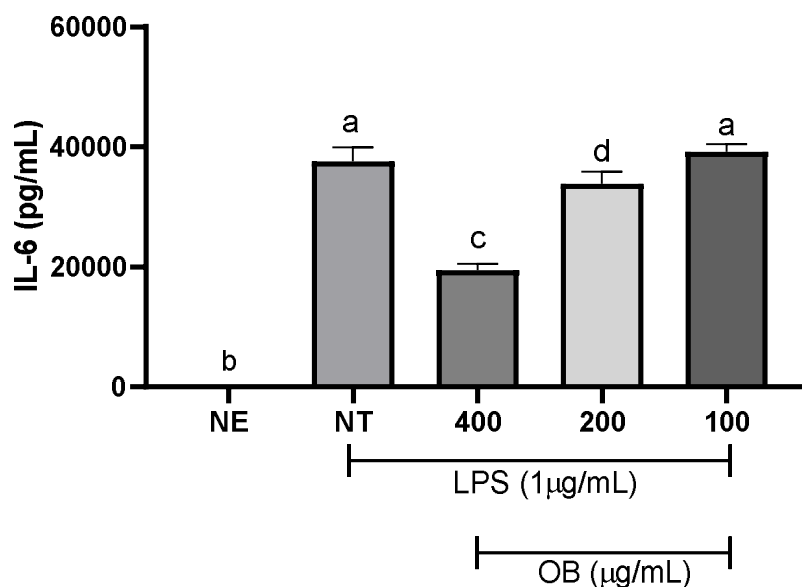
De acordo com pesquisas realizadas nas bases de dados, até o momento, não existem trabalhos avaliando a capacidade do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* na redução da produção de óxido nítrico na linhagem celular J774A.1. Os estudos concentram-se na avaliação da atividade de óleos essenciais e/ou extratos utilizando solventes diferentes, bem como outras linhagens celulares.

5.5.2 Influência do extrato na produção de citocinas por células J774A.1

Considerando a capacidade do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* em reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados, análises subsequentes para avaliação do comportamento relacionado à redução da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- α) foram avaliadas.

A IL-6, é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células, tais quais, monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, dentre outras. A partir da Figura 11 é possível observar que nas concentrações de 400 e 200 $\mu\text{g/mL}$ o extrato foi capaz de reduzir a produção de IL-6, porém, a menor concentração avaliada não apresentou diferença estatística com o controle não tratado.

Figura 11 – Avaliação da influência do extrato de *Ocimum basilicum* na produção de citocina IL-6 por células J774A.1 estimuladas.



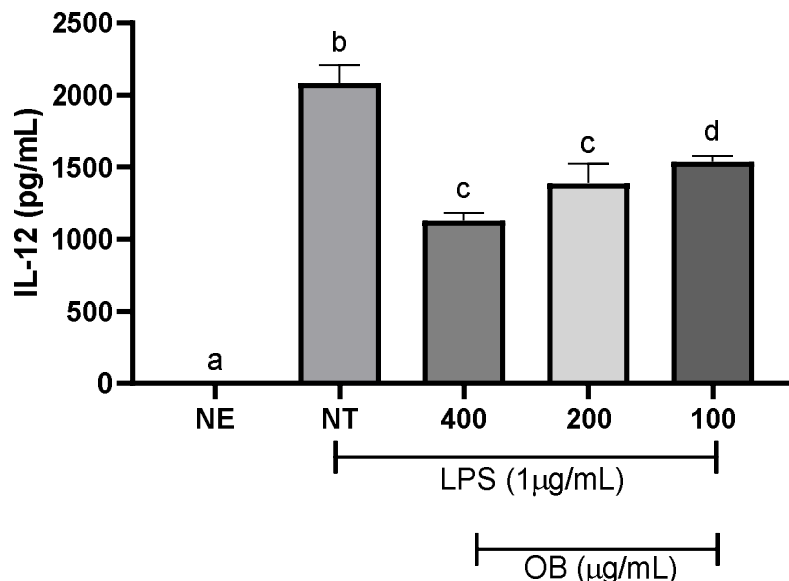
Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NE: não estimulado, NT: não tratado. Estatística: análise de variância, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A expressão de IL-6 tem sido associada com a imunopatogênese de várias doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, uma vez que esta citocina possui ações pleiotrópicas que vão desde o estímulo da produção de proteínas de fase aguda à hematopoiese, desenvolvimento embrionário, diferenciação, metabolismo, e indução de apoptose celular (Uciechowska & Dempkeb, 2021; Hirano, 2020). Junto ao fator de crescimento transformador β (TGF- β) a IL-6 é capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T virgens em células T_H17 , estando, dessa forma, também relacionada ao surgimento de doenças autoimunes (Aliyu *et al.*, 2022). Nesse contexto, a redução de IL-6 encontrada poderia impactar na diferenciação de células T_H17 .

Conforme apresentado na Figura 12, é possível observar que todas as concentrações testadas o extrato foi capaz de reduzir a produção de IL-12.

Figura 12 – Avaliação da influência do extrato de *Ocimum basilicum* na produção de citocina IL-12 por células J774A.1 estimuladas.



Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NE: não estimulado, NT: não tratado. Estatística: análise de variância, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

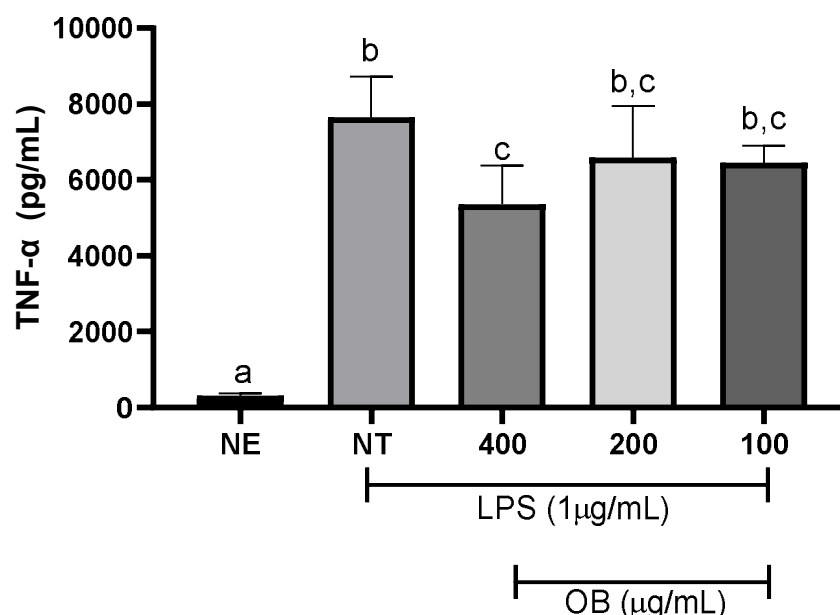
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A IL-12, por sua vez, também é uma citocina pró-inflamatória secretada por células fagocíticas que atua na interface entre as imunidades inata e adaptativa a partir da sinergia com outros estímulos moduladores. O estímulo para sua secreção consiste no contato da célula com bactérias, vírus, fungos ou parasitas a partir do reconhecimento de PAMPs pelos receptores do TRLs. A ligação da IL-12 a receptores presentes em células NK e linfócitos T culmina com a produção de IFN- γ , estimulando a atividade de células T_H1 . Além disso, essa citocina causa um impacto indireto na diferenciação de células T_H17 , a partir da sua relação com a IL-23, estando relacionada à inflamação crônica (Croxford *et al.*, 2014). Dessa forma, a redução de IL-12 observada em todas as concentrações analisadas do extrato aquoso de OB permite sugerir a capacidade de equilibrar as respostas T_H1 e T_H17 em condições inflamatórias.

Muitos modelos de estudos em animais e humanos descrevem o envolvimento desta citocina em diversas doenças como diabetes mellitus, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso, doenças inflamatórias intestinais, e esclerose múltipla (Chyuan & Lai, 2020; Ullrich *et al.*, 2020).

É possível observar, a partir da Figura 13, que a concentração de 400 µg/mL foi a mais efetiva na redução da produção da citocina TNF-α e as demais concentrações não diferiram do controle não tratado.

Figura 13 – Avaliação da influência do extrato de *Ocimum basilicum* na produção de citocina TNF-α por células J774A.1 estimuladas.



Legenda: OB – *Ocimum basilicum*, NE: não estimulado, NT: não tratado. Estatística: análise de variância, seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), assim como a IL-6, apresenta efeitos em vários tipos celulares. Além da sua atuação como uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados, nas últimas décadas foi elucidada sua atuação como uma adipocina, secretada em altas concentrações pelo tecido adiposo em quadros de obesidade (Sethi &

Hotamisligil, 2021). Sua ligação a receptores específicos direciona o tipo de resposta apresentada pela célula, que pode cursar com o desenvolvimento de inflamação, degeneração tecidual, defesa do hospedeiro, proliferação, sobrevivência celular ou necroptose (Jang *et al.*, 2021). Estudos indicam que indivíduos portadores DCNTs cursam com níveis elevados marcadores inflamatórios, dentre os quais pode-se incluir o TNF- α (Furman *et al.*, 2019).

Diante dos resultados mencionados, é possível inferir que o extrato aquoso de OB apresentou potencial anti-inflamatório através da capacidade de reduzir as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e TNF- α . Uma possível justificativa para essa pronunciada atividade imunomoduladora *in vitro* pode ser atribuída ao conteúdo de compostos fenólicos presentes na amostra. Estudos mostram o papel dos polifenóis na regulação de células imunológicas, influência na produção de citocinas e expressão de genes pró-inflamatórios (Yahfoufi *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho nos permitiu sugerir que o extrato aquoso de *Ocimum basilicum* apresentou promissora atividade biológica, que pode ser justificada pelo conteúdo expressivo dos ácidos fenólicos p-hidroxibenzoico; quínico, chicórico, clorogênico, caftárico, gálico, ferúlico e rosmarínico; e pela presença dos flavonoides quercetina e rutina, fitoquímicos estes que apresentam diversos efeitos positivos à saúde já descritos na literatura.

Os ensaios para avaliar a atividade antioxidante permitiram sugerir a capacidade do extrato em inibir não apenas os radicais livres, mas atuar frente às reações de peroxidação, retardando a propagação e atuando na inibição de produtos da decomposição de peróxidos e outras espécies radicalares.

A respeito da atividade imunomodulatória *in vitro* é importante enfatizar que, até o momento, este foi o único trabalho que avaliou o potencial citotóxico e anti-inflamatório, através da dosagem indireta de óxido nítrico e citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α do extrato aquoso de *Ocimum basilicum* em linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1. Nesse sentido, a capacidade de manter a viabilidade celular das culturas de células avaliadas, somado aos prováveis efeitos anti-inflamatórios

observados reforça a segurança no uso desse extrato, permitindo amplas aplicabilidades.

Por fim, diante do potencial biológico promissor apresentado pelo extrato aquoso de *Ocimum basilicum* é possível sugerir que trabalhos futuros se fazem necessários no sentido de avaliar mais especificamente a atuação deste extrato frente à um modelo específico de doença crônica não transmissível, visto que a gênese dessas doenças inicia-se com alterações que cursam com o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico e presença de estresse oxidativo no qual a atividade antioxidante e imunomoduladora são de extrema relevância.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 565 p., 2019.
- ALIYU, M.; ZOHORA, F. T.; ANKA, A. U.; ALI, K.; MALEKNIA, S.; SAFFARIOUN, M.; AZIZI, G. Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. **Int Immunopharmacol.**, v. 111, 2022. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109130.
- ARRIBA, V. **Manjeriço (Ocimum basilicum)**. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/photos/264371286>> Acesso: 08 MAI 2024.
- ASENSI, M. T.; NAPOLETANO, A.; SOFI, F.; DINU, M. Low-Grade Inflammation and Ultra-Processed Foods Consumption: A Review. **Nutrients**, v. 15, 2023. <https://doi.org/10.3390/nu15061546>
- AVASILOAIEI, M. C.; BREZEANU, P. M.; MURARIU, O. C.; BREZEANU, C. On the Future Perspectives of Some Medicinal Plants within Lamiaceae Botanic Family Regarding Their Comprehensive Properties and Resistance against Biotic and Abiotic Stresses. **Genes**, v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes14050955>
- AZIZAH, N. S.; IRAWAN, B.; KUSMORO, J.; SAFRIANSYAH, W.; FARABI, K.; OKTAVIA, D.; DONI, F.; MIRANTI, M. Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)—A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacological Activities, and Biotechnological Development. **Plants**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12244148>
- BAJOMO, E. M.; AING, M. S.; FORD, L. S.; NIEMEYER, E. D. Chemotyping of commercially available basil (*Ocimum basilicum* L.) varieties: Cultivar and morphotype influence phenolic acid composition and antioxidant properties. **NFS Journal**, v. 26, p. 1-9, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.01.001>
- BARNABEI L.; LAPLANTINE E.; MBONGO W.; RIEUX-LAUCAT.; WEIL R. NF-κB: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. **Front. Immunol.**, v. 12, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.716469
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>.
- BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. Il-12 family cytokines: general characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 63, n. 1, p. 1–25, 2016. DOI: 10.1556/030.63.2016.1.1
- BENNETT, J. M.; REEVES, G.; BILLMAN, G. E.; STURMBAG, J. P. Inflammation – nature’s way to efficiently respond to all types of challenges: implications for understanding and managing “the epidemic “ of chronic diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- BENSAID, A.; BOUDARD, F.; SERVENT, A.; MOREL, S.; PORTET, K.; GUZMAN, C.; VITOU, M.; BICHON, F.; POUCHERET, P. Differential Nutrition-Health Properties of

Ocimum basilicum Leaf and Stem Extracts. **Foods**, v. 11, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11121699>

BOWER, A.; MARQUEZ, S.; DE MEJIA, E. G. The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 56, n. 16, p. 2728-2746, 2016. doi: 10.1080/10408398.2013.805713.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995. doi:10.1016/s0023-6438(95)80008-5.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Panorama da mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil**. Boletim Epidemiológico, Brasília, DF, v. 52, n. 23, p. 13-20, 2021.

BROX, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol.**, v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016. doi: 10.1038/nri.2016.58.

CARVALHO, J.R.B.; MEIRELES, A.N.; MARQUES, S.S.; GREGÓRIO, B.J.R.; RAMOS, I.I.; SILVA, E.M.P.; BARREIROS, L.; SEGUNDO, M.A. Exploiting Kinetic Features of ORAC Assay for Evaluation of Radical Scavenging Capacity. **Antioxidants**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12020505>

CHAUDHARY P.; JANMEDA P.; DOCEA, A. O.; YESKALIYEVA, B.; ABDULL RAZIS, A. F.; MODU, B.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Front. Chem.**, 2023. doi: 10.3389/fchem.2023.1158198

CHEMAT, F.; ABERT, V. M.; RAVI, H. K.; KHADHRAOUI, B.; HILALI, S.; PERINO, S.; TIXIER, A. F. Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, 2019. doi: 10.3390/molecules24163007.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, 2019 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>

CHYUAN, I. T.; LAI, J. H. New insights into the IL-12 and IL-23: From a molecular basis to clinical application in immune-mediated inflammation and cancers. **Biochem Pharmacol.**, 2020. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113928.

CICALA, C.; MORELLO, S. Signaling Pathways in Inflammation and Its Resolution: New Insights and Therapeutic Challenges. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241311055>

CINELLI, M. A.; DO, H. T.; MILEY, G. P.; SILVERMAN, R. B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Med Res Rev.**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2020. doi: 10.1002/med.21599.

CROXFORD, A. L.; KULING, P.; BECHER, B. IL-12-and IL-23 in health and disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.017>

DHARSONO, H. D. A.; PUTRI, S. A.; KURNIA, D.; DUDI, D.; SATARI, M. H. Ocimum Species: A Review on Chemical Constituents and Antibacterial Activity. **In *Molecules***, v. 27, n. 19, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27196350>

DOMINGUEZ, L. J.; DI, B. G.; VERONESE, N.; BARBAGALLO, M. Impact of Mediterranean Diet on Chronic Non-Communicable Diseases and Longevity. **Nutrients**, v. 13, n. 6, 2021. doi: 10.3390/nu13062028.

DUDONNÉ, S.; XAVIER, V.; PHILIPPE, C.; WOILLEZ, M.; MERILLON, J-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 5, 2009.

ELANSARY, H. O.; MAHMOUD, E. A. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of six international basil cultivars. **Nat Prod Res**, v. 29, n. 22, p. 2149-2154, 2015. doi: 10.1080/14786419.2014.995653.

EL-AZIM, M. H. M. A. B. D.; ABDELGAWAD, A. A. M.; EL-GERBY, M.; ALI, S.; EL-MESALLAMY, A. M. D. Phenolic Compounds and Cytotoxic Activities of Methanol Extract of Basil (*Ocimum basilicum* L.). **J Microb Biochem Technol.**, v. 7, n. 4, 2015. DOI: 10.4172/1948-5948.1000202

ELOFF, J. N. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>

FERNANDES, F.; PEREIRA, E.; CÍRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* leaves (red rubin basil): a source of bioactive compounds and natural pigments for the food industry. **Food Funct.**, v. 10, p. 3161–3171, 2019.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; DOS SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.2, p.588-596, 2016. doi: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_197

FERRAZ, E. G.; SILVEIRA, B. B. B.; SARMENTO, V. A.; SANTOS, J. N. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. **Rev Gaúcha Odontol.**, v. 59, n.3, p. 483-490, 2011.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L. Herbal medicine today: Clinical and research issues. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.4, p.37–40, 2007. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem096>

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

FURMAN D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E.; CARRERA-BASTOS, P.; TARG, S.; FRANCESCHI, C.; FERRUCCI, L.; GILROY, D. W.; FASANO, A.; MILLER, G. W.; MILLER, A. H.; MANTOVANI, A.; WEYAND, C. M.; BARZILAI, N.; GORONZY, J. J.;

RANDO, T. A.; EFFROS, R. B.; LUCIA, A.; KLEINSTREUER, N.; SLAVICH, G. M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nat Med.**, v. 25, n. 12, p. 1822-1832, 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.

GABAY, C.; LAMACCHIA, L.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 6, p. 232–241, 2010. doi:10.1038/nrrheum.2010.4

GARG, M.; SHARMA, A.; BANSAL, S.; GROVER, R.; SHARMA, T.; KUMARI, S.; GOYAL, A.; BHATIA, S.; VAID, L.; DESWAL, G.; GREWAL, A. S. Role of Medicinal Plants in the Management of Inflammatory Disorders: An Overview. **Recent Adv Inflamm Allergy Drug Discov.**, v. 17, n. 1, p. 20-30, 2023. doi: 10.2174/2772270817666230227140659.

GEBREHIWOT, H.; BACHETTI, R.; DEKEBO, A. Chemical composition and antimicrobial activities of leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) herb. **International Journal of Basic and Clinical Pharmacology**, p. 869–875, 2015. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20150858>

GLAZER, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 161-168, 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86106-6)

GONG, D.; ZHA, Z. Hydroxybenzoic Acids. **Springer**, 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-81404-5_2-1

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBINSKA-KIEC, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOL-BEK, I.; BARTU, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

HAJAM, Y. A.; RANI, R.; GANIE, S. Y.; SHEIKH, T. A.; JAVAID, D.; QADRI, S. S.; PRAMODH, S.; ALSULIMANI, A.; ALKHANANI, M. F.; HARAKEH, S.; *et al.* Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells**, n.11, 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>

HARIHARAN, R.; ODJIDJA, E. N.; SCOTT, D.; SHIVAPPA, N.; HÉBERT, J. R.; HODGE, A.; DE COURTEN, B. The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases. **Obes Rev.**, v. 23, n. 1, 2022. doi: 10.1111/obr.13349.

HIRANO T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **Int Immunol.**, v. 33, n. 3, p. 127-148, 2021. doi: 10.1093/intimm/dxaa078.
HITL, M.; KLADAR, N.; GAVARIĆ, N.; BOŽIN, B. Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits. **Planta Med.**, v. 87, n. 4, p. 273-282, 2021. doi: 10.1055/a-1301-8648.

HOTAMISLINGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, 2017. doi:10.1038/nature21363

HOUSSE, M. El.; HADFI, A.; KARMAL, I.; IBRAHIMI, B. El.; JALAL, M.; BEN-AAZZA, S.; ERRAMI, M.; BELATTAR, M.; KHRACH, S.; IBERACHE, N.; DRIOUICHE, A. Toxicity Profile, Phytochemical Composition, and Anti-scaling Properties of the Aqueous Extract of *Ocimum basilicum* L. Leaves as Novel Green and Cost-Effective Inhibitor: Experimental, MC/SAA and DFT Approach. **Waste and Biomass Valorization**, v.14, n.11, p. 3553-3573, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02066-y>

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. doi: 10.1021/jf030723c. PMID: 15769103.

IBRAHIM, R. Y. M.; MANSOUR, S. M.; ELKADY, W. M. Phytochemical profile and protective effect of *Ocimum basilicum* aqueous extract in doxorubicin/irradiation-induced testicular injury. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 101–110, 2019. <https://doi.org/10.1111/jphp.13175>

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). **Microscopy research and technique**, v. 50, p. 184–195, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”. 3. ed, 2009. Disponível em: < <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>> Acesso: 08 MAI 2024.

IONITA, P. The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners. **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>

JANG, D.-i.; LEE, A.-H.; SHIN, H.-Y.; SONG, H.-R.; PARK, J.-H.; KANG, T.-B.; LEE, S.-R.; YANG, S.-H. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. **Int. J. Mol. Sci.**, v.22, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>

JIANG, T. A. Health Benefits of Culinary Herbs and Spices. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 2, 2019.

JOMOVA, K.; RAPTOVA, R.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, A. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUKA, K.; VALKO, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, v. 97, p. 2499–2574, 2023.

KAHKESHANI, N.; FARZAEI, F.; FOTOUHI, M.; ALAVI, S. S.; BAHRAMSOLTANI, R.; NASERI, R.; MOMTAZ, S.; ABBASABADI, Z.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H.; BISHAYEE, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 22, n. 3, p. 225-237, 2019. doi: 10.22038/ijbms.2019.32806.7897.

KALINOWSKA, M.; GOŁĘBIEWSKA, E.; ŚWIDERSKI, G.; MĘCZYŃSKA-WIELGOSZ, S.; LEWANDOWSKA, H.; PIETRYCZUK, A.; CUDOWSKI, A.; ASTEL, A.;

ŚWISŁOCKA, R.; SAMSONOWICZ, M.; ZŁOWODZKA, A. B.; PRIEBE, W.; LEWANDOWSKI, W. Plant-Derived and Dietary Hydroxybenzoic Acids-A Comprehensive Study of Structural, Anti-/Pro-Oxidant, Lipophilic, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity in MDA-MB-231 and MCF-7 Cell Lines. **Nutrients**, v. 13, n. 9, 2021. doi: 10.3390/nu13093107.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2016. doi:10.1038/nrrheum.2015.169.

KASHINO, I.; MIZOUE, T.; SERAFINI, M.; AKTER, S.; SAWADA, N.; ISHIHARA, J.; KOTEMORI, A.; INOUE, M.; YAMAJI, T.; GOTO, A.; IWASAKI, M.; NODA, M.; TSUGANE, S. Higher Dietary Non-enzymatic Antioxidant Capacity Is Associated with Decreased Risk of All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Japanese Adults. **J Nutr**, 2019. doi: 10.1093/jn/nxz145.

KAURINOVIC, B.; POPOVIC, M.; VLAISAVLJEVIC, S.; TRIVIC, S. Antioxidant capacity of ocimum basilicum L. and Origanum vulgare L. extracts. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7401–7414, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16097401>

KORIEM, K. M. M. Caftaric acid: an overview on its structure, daily consumption, bioavailability and pharmacological effects. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 5616-5623, 2020. Doi:10.33263/BRIAC103.616623

KUMAR S.; DIKSHIT M. Nitric Oxide: Regulation and Function in Neutrophil Immune Responses. **Antioxid Redox Signal**, v. 40, n.16-18, p. 998-1024, 2024. doi: 10.1089/ars.2022.0220.

KUSSMANN, M.; CUNHA, D. H. A.; BERCIANO, S. Bioactive compounds for human and planetary health. **Frontiers Nutrition**, v. 10, 2023. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1193848>

LEIBA, J.; ÖZBILGIÇ, R.; HERNÁNDEZ, L.; DEMOU, M.; LUTFALLA, G.; YATIME, L.; NGUYEN-CHI, M. Molecular Actors of Inflammation and Their Signaling Pathways: Mechanistic Insights from Zebrafish. **Biology**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/biology12020153>

LI, D.; RUI, Y. X.; GUO, S. D.; LUAN, F.; LIU, R.; ZENG, N. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. **Life Sci**, 2021. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119921.

MANUJA, R.; SACHDEVA, S.; JAIN, A.; CHAUDHARY, J. A Comprehensive Review on Biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 22, n. 2, p. 109-115, 2013.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594- 598, 1968.

MARTINEZ, K. B.; MACKERT, J.; MCINTOSH, M. K. Polyphenols and intestinal health. **Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805376-8.00018-6>

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, 2008. doi:10.1038/nature07201

MEO, D. S.; VENDITTI, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN-BEER, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **FoodChemistry**, v. 85, n. 2, p. 231- 237, 2004.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.

MONTEIRO, C. A.; CANNON, G.; LEVY, R. B.; MOUBARAC, J-C.; LOUZADA, M. L. C.; ROUBER, F.; KHANDPUR, N.; CEDIEL, G.; NERI, D.; MARTINEZ-STEELE, E.; BARALDI, L. G.; JAIME, P. C. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. **Public Health Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 936–941, 2019.

NADEEM, H. R.; AKHTAR, S.; SESTILI, P.; ISMAIL, T.; NEUGART, S.; QAMAR, M.; ESATBEYOGLU, T. Toxicity, Antioxidant Activity, and Phytochemicals of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaves Cultivated in Southern Punjab, Pakistan. **Foods**, v. 11, n. 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11091239>

NAZ, R.; SAQIB, F.; AWADALLAH, S.; WAHID, M.; LATIF, M.F.; IQBAL, I.; MUBARAK, M.S. Food Polyphenols and Type II Diabetes Mellitus: Pharmacology and Mechanisms. **Molecules**, v. 28, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28103996>

NEGAHDARI R.; BOHLOULI, S.; SHARIFI, S.; DIZAJ, S. M.; SAADAT Y. R.; KHEZRI, K.; JAFARIM S.; AHMADIAN, E.; JAHANDIZI N. G.; RAEESI, S. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. **Phytother Res.**, v. 35, n. 4, p. 1719-1738, 2021. doi: 10.1002/ptr.6904.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 275–301, 2016. DOI: 10.1042/EBC20160017

NILSON, E. A. F.; ANDRADE, R. C. S.; BRITO, D. A.; OLIVEIRA, M. L. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Rev Panam Salud Publica**, v. 44, 2020. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.32>

PAMBUK, C. I. A.; MUHAMMAD, F. M. Free radicals: the types generated in biological system. **MOJ Cell Sci Rep**, v. 5, n. 3, p. 72-73, 2018.

PETERSEN, K. S.; FULGONI, V. L.; HOPFER, H.; HAYES, J. E.; GOODING, R.; KRIS-ETHERTON, P. Using Herbs/Spices to Enhance the Flavor of Commonly

Consumed Foods Reformulated to Be Lower in Overconsumed Dietary Components Is an Acceptable Strategy and Has the Potential to Lower Intake of Saturated Fat and Sodium: A National Health and Nutrition Examination Survey Analysis and Blind Tasting. **J Acad Nutr Diet.**, v. 24, n. 1, p. 15-27, 2024. doi: 10.1016/j.jand.2023.07.025.

PHILLIPS, C. M.; CHEN, L. W.; HEUDE, B.; BERNARD, J. Y.; HARVEY, N. C.; DUIJTS, L.; MENSINK-BOUT, S. M.; POLANSKA, K.; MANCANO, G.; SUDERMAN, M.; SHIVAPPA, N.; HÉBERT, J. R. Dietary Inflammatory Index and Non-Communicable Disease Risk: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019. doi: 10.3390/nu11081873.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; STANCA, L.; PREDOI, G.; SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

PURUSHOTHAMAN, B.; PRASANNASRINIVASAN, R.; SUGANTHI, P.; GIMBUN, J.; SHANMUGAM, K. A Comprehensive Review on *Ocimum basilicum*. **Journal of Natural Remedies**, v. 18, n. 3, 2018. DOI: 10.18311/jnr/2018/21324

RANGEL-HUERTA, O. D.; GIL, A. Nutrimetabolomics: An Update on Analytical Approaches to Investigate the Role of Plant-Based Foods and Their Bioactive Compounds in Non-Communicable Chronic Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, 2016. doi: 10.3390/ijms17122072.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L.; MARKOSSIAN, S.; SITTAMPALAM, G. S.; GROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, K.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C. P.; BAELL, J.; CAAVAEIRO, J. M.M.C.; CHUNG, T. D. Y.; COUSSENS, N. P.; DAHLIN, J. L.; DEVANARYAN, V.; FOLEY, T. L.; GLICKSMAN, M.; HALL, M. D.; HAAS, J. V.; HOARE, S. R. J.; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; KAHL, S. D.; KALES, S. C.; KIRSHNER, S.; LAL-NAG, M.; LI, Z.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; RISS, T.; SARADJIAN, P.; JR, O. J. T.; WEIDNER, J. R.; WILDEY, M. J.; XIA, M.; XU, X. Cell Viability Assays. **Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, 2013.

RODRIGUES, V. G. S.; GONZAGA, D. S. O. **Plantas Medicinais**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100713/1/folder-manjericao.pdf>> Acesso: 19 ABR 2024.

ROE, K. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scand J Immunol**, 2021. <https://doi.org/10.1111/sji.12970>

SALVEMINI D.; KIM, S. F.; MOLLACE, V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 304, n. 7, p. 473-487, 2013. doi: 10.1152/ajpregu.00355.2012.

SANTOS, K. B.; TONIN, L. T. D. Study of the influence of drying temperature and extractive solvent on the antioxidant capacity of *Plantago major* leaves. **Revista Fitos**, v. 13, n. 3, p. 200-211, 2019. 10.32712/2446-4775.2019.827

SCOTECE, M.; CONDE-ARANDA, J. Inflammation in Health and Disease: New Insights and Therapeutic Avenues. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158392>

SCHWINGSHACKL, L.; MORZE, J.; HOFFMANN, G. Mediterranean diet and health status: Active ingredients and pharmacological mechanisms. **Br J Pharmacol.**, v. 177, n. 6, p. 1241-1257, 2020. doi: 10.1111/bph.14778.

SESTILI, P.; ISMAIL, T.; CALCABRINI, C.; GUESCINI, M.; CATANZARO, E.; TURRINI, E.; LAYLA, A.; AKHTAR, S.; FIMOGNARI, C. The potential effects of *Ocimum basilicum* on health: a review of pharmacological and toxicological studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, 2018. DOI: 10.1080/17425255.2018.1484450

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nat Metab.**, v. 3, n. 10, p.1302-1312, 2021. doi: 10.1038/s42255-021-00470-z.

SHAHRAJABIAN, M. H.; SUN, W.; CHENG, Q. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. **International Journal of Food Properties**, v.23, n.1, p. 1961–1970, 2020. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>

SHARMA, A. D.; KAUR, I.; ANGISH, S.; THAKUR, A.; SANIA, S.; SINGH, A. Comparative phytochemistry, antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory activities of traditionally used *Ocimum basilicum* L. *Ocimum gratissimum* L., and *Ocimum tenuiflorum* L. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 103, n.2, p. 131–142, 2022. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.116206>

SIES, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. **Antioxidants**, v. 9, 2020. doi:10.3390/antiox9090852

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdcphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144- 158, 1965.

SORRENTI, V.; BURÒ, I.; CONSOLI, V.; VANELLA, L. Recent Advances in Health Benefits of Bioactive Compounds from Food Wastes and By-Products: Biochemical Aspects. **Int J Mol Sci.**, v. 24, n. 3, 2019. doi: 10.3390/ijms24032019.

SWINNEY, D. C. **Basic Principles of Drug Discovery and Development**, 2. ed., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2011.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2014. doi: 10.1101/cshperspect.a016295

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2018. doi: 10.1101/cshperspect.a028456

TENG, M. W. L.; BOWMAN, E. P.; MCELWEE, J. J.; SMYTH, M. J.; CASANOVA, J.-L.; COOPER, A. M.; CUA, D. J. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, 2015. doi:10.1038/nm.3895

TAPSELL, L. C.; HEMPHILL, I.; COBIAC, L.; PATCH, C. S.; SULLIVAN, D. R.; FENECH, M.; ROODENRYS, S.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M.; WILLIAMS, P. G.; FAZIO, V. A.; INGE, K. E. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. **Med J Aust.**, v. 185, n. 4, p. 1-24, 2006. doi: 10.5694/j.1326-5377.2006.tb00548.x.

TOSI, M.; MONTARANI, C.; BONA, F.; TRICELLA, C.; AGOSTINELLI, M.; DOLOR, J.; CHILLEMI, C.; PROFIO, E. D.; TAGI, V. M.; VIZZUSO, S.; FIORE, G.; ZUCCOTTI, G.; VERDUCI, E. Dietary Inflammatory Potential in Pediatric Diseases: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 15, 2023. <https://doi.org/10.3390/nu15245095>

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v.3, 2003. doi:10.1038/nri1001

UCIECHOWSKI, P.; DEMPKE, W. C. M. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. **Oncology**, v. 98, n. 3, p. 131-137, 2020. doi: 10.1159/000505099. Epub 2020 Jan 20.

ULLAH, S.; RAUF, N.; HUSSAIN, A.; SHEIKH, A.; FAROOQ, M. HPLC profile of phenolic acids and flavonoids of *Ocimum sanctum* and *O. basilicum*. **Int. J. Plant Bas. Pharm**, v. 2, n.2, 2022. <https://ijpbp.com>

ULLRICH, K. A.; SCHULZE, L. L.; PAAP, E. M.; MÜLLER, T. M.; NEURATH, M. F.; ZUNDLER, S. Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. **EXCLI J.**, v. 19, p. 1563-1589, 2020. doi: 10.17179/excli2020-3104.

VÁZQUEZ-FRESNO R.; ROSANA, A. R. R.; SAJED, T.; ONOOKOME-OKOME, T.; WISHART, N. A.; WISHART, D. S. Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies - A Systematic Review. **Genes Nutr.**, 2019. doi: 10.1186/s12263-019-0636-8.

WANG L.; PAN, X.; JIANG, L.; CHU, Y.; GAO, S.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LUO, S.; PENG, C. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. **Front. Nutr.**, 2022. doi: 10.3389/fnut.2022.943911

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, K. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, 2010. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2021: a visual summary**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/data/stories/world-health-statistics-2023-a-visual-summary/>. Acesso: 02 JUL 2023.

YAHFOUFI N, ALSADI N, JAMBI M, MATAR C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2018. doi: 10.3390/nu10111618.

YAMAUCHI, M.; KITAMURA, Y.; NAGANO, H.; KAWATSU, J.; GOTOH, H. DPPH Measurements and Structure—Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols. **Antioxidants**, v. 13, 2024. <https://doi.org/10.3390/antiox13030309>

YANG, D.; WANG, T.; LONG, M.; LI, P. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. **Oxid Med Cell Longev.**, 2020. doi: 10.1155/2020/8825387.

YANG, L.; WEN, K. S.; RUAN, X.; ZHAO, Y. X.; WEI, F.; WANG, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4. doi: 10.3390/molecules23040762

YANG, M.; WU, C.; ZHANG, T.; SHI, L.; LI, J.; LIANG, H.; LV, X.; JING, F.; QIN, L.; ZHAO, T.; WANG, C.; LIU, G.; FENG, S.; LI, F. Chicoric Acid: Natural Occurrence, Chemical Synthesis, Biosynthesis, and Their Bioactive Effects. **Front. Chem.**, 2022. doi: 10.3389/fchem.2022.888673

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, v. 54, p. 377-382, 1995.

ZANELLO, P. R.; KOISHI1, A. C.; JÚNIOR, C. O. R.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, A. A.; ALMEIDA, M. V.; SANTOS, C. N. D.; BORDIGNON, J. Quinic acid derivatives inhibit dengue virus replication in vitro. **Virology Journal**, v. 12, 2015. DOI 10.1186/s12985-015-0443-9

ZEKRUMAH, M.; BEGUA, P.; RAZAK, A.; WAHAB, J.; MOFFO, N.; IVANE, A.; MO, H. O.; ELRASHIED, H.; ZOU, X.; ZHANG, D. Role of dietary polyphenols in non-communicable chronic disease prevention, and interactions in food systems: Na overview. **Nutrition**, v. 112, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112034>

ZENG K.; THOMPSON, K. E.; YATES, C. R.; MILLER, D. D. Synthesis and biological evaluation of quinic acid derivatives as anti-inflammatory agents. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 19, n. 18, 2009. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.096.

ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; XU, D. P.; LI, S.; LI, H. B. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, 2016. doi: 10.3390/nu8080495.

ZHAKIPBEKOV, K.; TURGUMBAYEVA, A.; AKHELOVA, S.; BEKMURATOVA, K.; BLINOVA, O.; UTEGENOVA, G.; SHERTAEVA, K.; SADYKOV, N.; TASTAMBEK, K.;

SAGINBAZAROVA, A.; et al. Antimicrobial and Other Pharmacological Properties of *Ocimum basilicum*, Lamiaceae. **Molecules**, v. 29, 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29020388>