

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto  
Instituto Politécnico do Porto

Sara Regina Rodrigues Fernandes

---

**Doseamento da Azadiractina e avaliação da  
atividade antimicrobiana em produtos contendo  
óleo de Neem**

Mestrado em Bioquímica em Saúde ramo de Biotecnologia

setembro de 2014







Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto  
Instituto Politécnico do Porto

---

Sara Regina Rodrigues Fernandes

---

**Doseamento da Azadiractina e avaliação da  
atividade antimicrobiana em produtos contendo  
óleo de Neem**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde ramo de Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Agostinho da Silva Cruz, Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto; da Professora Doutora Luísa Barreiros, Assistente Convidada da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto e Investigadora no REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e da Professora Doutora Cristina Prudêncio, Professora Coordenadora com Agregação da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto.

setembro de 2014



*“ Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre”*

*Charles Chaplin*



## **Agradecimentos**

*Aos meus pais,*

*Por serem a minha grande fonte de inspiração e motivação, pelo esforço contínuo para me oferecerem uma vida melhor a cada dia e pela confiança que sempre depositaram em mim.*

*À minha prima,*

*Pelo companheirismo, pelo apoio e incentivo permanentes e pelo auxílio preponderante na revisão desta tese.*

*Aos meus amigos,*

*Por serem o meu porto de abrigo em momentos de maior dificuldade, pelo companheirismo, pela humildade e por todos os bons momentos partilhados.*

*Ao Professor Doutor Agostinho Cruz,*

*Pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou.*

*À Professora Doutora Luísa Barreiros,*

*Pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, pelo apoio e incentivo permanentes, pela simpatia, pela paciência, pela disponibilidade constante e pelo muito tempo dispendido ao longo da execução deste trabalho.*

*À Professora Doutora Cristina Prudêncio,*

*Pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou.*

*A todos os elementos da Área Técnico-Científica das Ciências Químicas e das  
Biomoléculas,*

*Pela partilha de conhecimentos, pelo contributo preponderante na minha formação, por  
todo apoio e incentivo que sempre demonstraram.*

*A todos os elementos da Área Técnico-Científica de Farmácia,*

*Pelo contributo preponderante na minha formação académica e pessoal, pela partilha de  
conhecimentos, pela simpatia, alegria, apoio e palavras encorajadoras ao longo destes  
seis anos de percurso académico na ESTSP.*

*À Professora Rita Oliveira,*

*Pela possibilidade de participar neste projeto, pela confiança depositada no meu trabalho,  
pela simpatia, apoio e palavras encorajadoras.*

*Ao Dr. Morgado e à empresa M&M Biotechnology,*

*Pela possibilidade de participar neste projeto, pelo exemplo de empreendedorismo a seguir e  
pela ajuda e confiança que depositaram no meu trabalho.*

## **Fontes de Financiamento**

O presente trabalho foi desenvolvido e financiado no âmbito do Projecto de Investigação N.º 1, do Protocolo de Colaboração entre a Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto/Instituto Politécnico do Porto (ESTSP/IPP) e a empresa Marcos & Morgado Biotechnology (M&M BIOTECHNOLOGY).

## Resumo

O Neem (*Azadirachta indica*) é uma árvore indiana conhecida pela atividade pesticida e por várias atividades farmacológicas. De entre os vários compostos já isolados e estudados, a Azadiractina (AZA) foi identificada como o principal composto bioativo desta planta. Este composto apresenta uma grande diversidade de localizações nesta planta, porém assume a sua máxima concentração ao nível das sementes, porção que se apresenta também como a principal fonte de obtenção do óleo de Neem. O óleo apresenta-se como a porção menos estudada do Neem, quer ao nível do seu teor em AZA, quer ao nível das suas propriedades, nomeadamente antimicrobianas. Neste sentido, os objetivos primordiais deste estudo foram o doseamento da Azadiractina e a avaliação da atividade antimicrobiana em produtos contendo óleo de Neem.

Um método analítico rápido, sensível e seletivo utilizando HPLC-UV foi desenvolvido para a identificação e quantificação da Azadiractina-A (AZA-A) e 3-tigloylazadirachtol (AZA-B) em diferentes amostras de óleo de Neem. O teor de AZA-A, B e A+B determinado nas amostras de óleo de Neem apresentou valores entre 58,53-843,42 mg/kg, 12,52-800,223 mg/kg e 104,20-1642,17 mg/kg, respetivamente. Na generalidade, os valores obtidos foram inferiores aos descritos na literatura. A partir dos resultados obtidos, verificou-se ainda que o teor destes compostos não é similar em todas as amostras, sendo este condicionado pela qualidade das sementes que deram origem ao óleo e pelo processo extrativo utilizado. Para além disso, foi possível inferir que duas das amostras testadas teriam qualidade inferior, dados os teores reduzidos de AZA que apresentavam.

As diferentes amostras de óleo de Neem, bem como formulações comerciais contendo óleo de Neem, foram testadas em 14 microrganismos de forma a avaliar o seu potencial antimicrobiano. Após a análise, verificou-se atividade antimicrobiana de todas as amostras sobre todos os microrganismos testados, observando-se atividade tanto em bactérias Gram+ como Gram-. Os resultados alcançados mostraram que o óleo de Neem e as formulações comerciais contendo óleo de Neem têm um potencial antimicrobiano interessante, principalmente sobre bactérias comuns em patologias da pele. Para além disso, foi possível comprovar que, no caso do óleo de Neem, a AZA não será a principal responsável por esta atividade. Por outro lado, verificou-se que a atividade antimicrobiana das formulações comerciais não se deverá exclusivamente à presença do óleo de Neem,

uma vez que os valores dos halos de inibição obtidos com as formulações tenderam a ser superiores aos verificados apenas com o óleo, além de que os valores de inibição mais elevados foram observados para as formulações contendo menor percentagem de óleo de Neem incorporado.

Em suma, os resultados alcançados para os diferentes produtos analisados são promissores e, na sua maioria, convergem com o que está descrito na literatura. No entanto, apesar destes resultados serem um grande contributo, mais estudos são necessários e importantes para conhecer melhor os produtos analisados e assim poder tirar o maior proveito deles.

**Palavras-chave:** *Azadirachta indica*, Neem, Azadiractina, 3-tigloylazadirachtol, óleo de Neem, HPLC, atividade antimicrobiana.

## Abstract

Neem (*Azadirachta indica*) is an Indian tree recognized for its activity as pesticide, as well as several pharmacological properties. Among the various compounds already isolated and studied from Neem, Azadirachtin (AZA) was identified as the main bioactive compound. This compound is present at various parts in the Neem tree but it assumes its maximum concentration at seed level, portion which is also given as the primary source of obtaining the Neem oil. The oil represents the least studied plant portion, both in terms of AZA content or its properties, namely antimicrobial capacity. The primary objectives of this study were the quantification of Azadirachtin and the evaluation of antimicrobial activity in products containing Neem oil.

A rapid, sensitive and selective analytical method based on HPLC-UV was developed for the identification and quantification of Azadirachtin-A (AZA-A) and 3-*tigloylazadirachtol* (AZA-B) in different samples of Neem oil. The content of AZA-A, B, and A+B in the analysed Neem oil samples ranged from 58.53 to 843.42 mg kg<sup>-1</sup>, 12.52 to 800.23 mg kg<sup>-1</sup> and 104.20 to 1642.17 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. In general, the obtained values were below the values reported in literature. From the experimental results, it was possible to verify that the content of AZA compounds is not similar in all samples, being conditioned by the quality of the seeds originating the oil and the applied extraction process. Furthermore, it was possible to infer that two of the tested samples had inferior quality, given their reduced AZA content.

The different Neem oil samples, as well as commercial formulations containing Neem oil, were tested on 14 microorganisms in order to evaluate their antimicrobial activity. After analysis, it was observed that all the samples presented antimicrobial activity against all the tested microorganisms, exhibiting activity both on Gram+ and Gram- organisms. The obtained results demonstrated that Neem oil and commercial formulations containing Neem oil possess an interesting antimicrobial potential, particularly in common bacterial infections of the skin. In addition, it was possible to prove, that in the case of Neem oil, AZA may not be primarily responsible for the observed antimicrobial activity. On the other hand, it was found that the activity of the commercial formulations may not be exclusively due to the presence of Neem oil, since the inhibition values obtained with the formulations tended to be higher than those observed with the oil, and also because higher inhibition values were observed for the formulations containing lower percentages of Neem oil.

Overall, the results obtained with the different analysed products seem promising and, in most cases, converge with the values already reported in literature. Although these results present a great contribution, further studies are necessary and important to better understand the analysed products and thus to make the most of them.

**Keywords:** *Azadirachta indica*, Neem, Azadirachtin, *3-tigloylazadirachtol*, Neem oil , HPLC, antimicrobial activity.

## Índice

Agradecimentos .....	VII
Resumo .....	IX
Abstract.....	XI
Índice .....	XIII
Índice de Abreviaturas.....	XVII
Índice de Tabelas .....	XIX
Índice de Figuras .....	XXI
CAPÍTULO I – Introdução.....	1
1.Introdução .....	3
1.1.Objetivos.....	5
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica.....	7
2.Revisão bibliográfica.....	9
2.1. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Neem) .....	9
2.1.1.Principais compostos biologicamente ativos do Neem.....	11
2.2.Azadiractina.....	13
2.2.1.Caracterização físico-química da Azadiractina .....	13
2.2.2.Biossíntese e síntese artificial da Azadiractina.....	15
2.2.3.Propriedades biológicas da Azadiractina .....	17
2.3.Outros limonóides .....	19
2.4.Óleo de Neem .....	21
2.4.1.Aspetos toxicológicos do óleo de Neem.....	23

2.5.Doseamento de compostos ativos do Neem .....	24
2.5.1.Análise cromatográfica da Azadiractina em diferentes amostras de Neem.....	25
2.6.Atividade antimicrobiana do Neem .....	30
CAPÍTULO III – Material e Métodos .....	35
3.Material e Métodos .....	37
3.1.Amostras .....	37
3.2.Preparação de solução <i>stock</i> de Azadiractina .....	38
3.3.Preparação de soluções-padrão de Azadiractina .....	38
3.4.Preparação de amostras para análise cromatográfica .....	39
3.4.1.Amostras de óleo de Neem .....	39
3.5.Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC) .....	39
3.5.1.Equipamento .....	39
3.5.2.Condições cromatográficas .....	40
3.5.3.Validação do método analítico.....	40
3.5.3.1.Linearidade.....	41
3.5.3.1.1.Curva de calibração.....	41
3.5.3.1.2.Sensibilidade .....	42
3.5.3.2.Limiars analíticos .....	42
3.5.3.3.Precisão .....	43
3.5.3.3.1.Repetibilidade .....	43
3.5.3.3.2.Precisão intermédia.....	44
3.5.3.4.Estabilidade .....	45
3.5.3.5.Exatidão.....	46

3.6.Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem .....	47
3.6.1.Microrganismos e meios de cultura .....	47
3.6.2.Crescimento e manutenção das culturas microbianas.....	48
3.6.3.Determinação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em poço .....	48
3.7.Análise estatística .....	50
CAPÍTULO IV – Resultados.....	53
4.Resultados.....	55
4.1.Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC) .....	55
4.1.1.Validação do método analítico.....	55
4.1.1.1.Linearidade.....	55
4.1.1.2.Limiars analíticos .....	58
4.1.1.3.Precisão .....	59
4.1.1.4.Estabilidade .....	60
4.1.1.5.Exatidão.....	61
4.1.2.Teor de Azadiractina presente em amostras de óleo de Neem .....	61
4.2.Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem .....	63
4.2.1.Atividade antimicrobiana do óleo de Neem .....	63
4.2.2.Atividade antimicrobiana de formulações comerciais contendo óleo de Neem.....	70
4.2.3.Atividade antimicrobiana do padrão de Azadiractina.....	78
CAPÍTULO V – Discussão .....	79
5.Discussão.....	81
5.1.Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC) .....	81

5.2.Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem .....	86
CAPÍTULO VI – Conclusão e Perspetivas Futuras .....	101
6.Conclusão e perspetivas futuras .....	103
6.1.Conclusão .....	103
6.2.Perspetivas futuras .....	105
CAPÍTULO VII – Referências Bibliográficas .....	107
7.Referências Bibliográficas.....	109
Anexos .....	115
Anexo I – Composição dos meios de cultura utilizados.....	117

## **Índice de Abreviaturas**

**ACN** – Acetonitrilo

**ATB** – Antibiótico

**ATP** – Adenosina trifosfacto

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**AZA** – Azadiractina

**AZA-A** – Azadiractina–A

**AZA-B** – Azadiractina-B (*3-tigloylazadirachtol*)

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**CV** – Coeficiente de Variação

**DAD** – *Diode Array Detector*

**DL 50** – Dose letal mediana

**DSMZ** – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

**ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**EM** – Espectrometria de Massa

**FM** – Fase Móvel

**FE** – Fase Estacionária

**GC** – Cromatografia Gasosa

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Elevada Pressão

**H<sub>2</sub>O** – Água

**LD** - Limite de deteção

**LQ** – Limite de quantificação

**MetOH** - Metanol

**NA** – *Nutrient agar*

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NB** – *Nutrient Broth*

**NP-HPLC** – Cromatografia Líquida de Elevada Pressão de fase normal

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**R** - Coeficiente de correlação

**RP-HPLC** – Cromatografia Líquida de Elevada Pressão de fase reversa

**SFC** – Cromatografia de Fluido Supercrítico

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**THF** – Tetrahidrofurano

**TLC** – Cromatografia em Camada Fina

**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias

**UV** – Ultravioleta

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> – Compostos presentes nas diferentes porções da planta <i>Azadirachta indica</i> .....	12
<b>Tabela II</b> – Teor de AZA encontrado em sementes de Neem .....	14
<b>Tabela III</b> – Toxicidade e efeitos adversos associados ao óleo de Neem .....	23
<b>Tabela IV</b> – Resumo de estudos sobre doseamento de AZA (AZA-A) e 3- <i>tigloylazadirachtol</i> (AZA-B) utilizando HPLC .....	28
<b>Tabela V</b> – Resumo de artigos sobre atividade antimicrobiana do óleo de Neem .....	32
<b>Tabela VI</b> – Identificação das amostras de óleo analisadas .....	37
<b>Tabela VII</b> - Identificação das amostras de formulações comerciais utilizadas neste estudo.....	37
<b>Tabela VIII</b> – Volumes utilizados na preparação das diferentes soluções-padrão de AZA.....	38
<b>Tabela IX</b> – Antibióticos utilizados como controlo positivo para cada um dos microrganismos em estudo .....	49
<b>Tabela X</b> - Valores médios de área, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) determinados para os compostos Azadiractina-A, B e A+B nas diferentes soluções-padrão de AZA .....	56
<b>Tabela XI</b> - Valores dos limiares analíticos (LD e LQ) .....	59
<b>Tabela XII</b> - Repetibilidade e precisão intermédia do método analítico para a AZA-A, AZA-B e AZA-A+B .....	59
<b>Tabela XIII</b> - Percentagens de recuperação médias dos compostos em estudo a partir de amostras de óleo de Neem suplementadas com AZA .....	61
<b>Tabela XIV</b> – Teor de AZA-A, AZA-B e AZA-A+B em amostras de óleo de Neem.....	63

<b>Tabela XV</b> – Halos de inibição médios obtidos após 24 e 48 h de incubação com os antibióticos utilizados como controlo positivo dos ensaios com amostras de óleo de Neem.....	64
<b>Tabela XVI</b> - Halos de inibição médios obtidos com as diferentes amostras de óleo de Neem após 24 e 48 h de incubação .....	65
<b>Tabela XVII</b> – Comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com os diferentes óleos para cada bactéria, através de testes estatísticos de comparações múltiplas.....	68
<b>Tabela XVIII</b> – Halos de inibição médios obtidos após 24 e 48 h de incubação com os antibióticos utilizados como controlo positivo dos ensaios com formulações comerciais contendo óleo de Neem .....	71
<b>Tabela XIX</b> - Halos de inibição médios obtidos com as diferentes amostras de formulações comerciais contendo óleo de Neem após 24 e 48 h de incubação.....	72
<b>Tabela XX</b> – Comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com as diferentes formulações comerciais para cada bactéria, através de testes estatísticos de comparações múltiplas.....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Porções da planta Neem .....	10
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da AZA .....	14
<b>Figura 3</b> – Esquema da via biossintética de formação da AZA .....	16
<b>Figura 4</b> – Estruturas químicas dos principais limonóides descritos na literatura .....	20
<b>Figura 5</b> – Aspetto do óleo de Neem .....	22
<b>Figura 6</b> – Esquema ilustrativo de um equipamento de HPLC .....	26
<b>Figura 7</b> - Resposta instrumental da solução-padrão de AZA de concentração 150 µg/ml, com identificação dos sinais cromatográficos e tempos de retenção dos diferentes compostos em análise .....	55
<b>Figura 8</b> – Curva de Calibração do composto AZA–A com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R).....	57
<b>Figura 9</b> – Curva de Calibração do composto AZA–B com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R).....	57
<b>Figura 10</b> – Curva de Calibração dos compostos AZA–A+B com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R) .....	58
<b>Figura 11</b> - Cromatogramas da solução-padrão de AZA com concentração 150 µg/ml representativos dos períodos de tempo utilizados para avaliação da estabilidade (t0d - dia de preparação, t1d, t7d, t30d e t60d - um dia, uma semana, um mês e dois meses após a preparação).....	60
<b>Figura 12</b> – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem – Óleo 1 .....	62
<b>Figura 13</b> – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem – Óleo 2 .....	62
<b>Figura 14</b> – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem – Óleo 3 .....	62

**Figura 15** - Perfil de atividade antimicrobiana dos diferentes óleos de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram+ ..... 66

**Figura 16** - Perfil de atividade antimicrobiana dos diferentes óleos de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram- ..... 66

**Figura 17** - Perfil de atividade antimicrobiana das diferentes formulações comerciais contendo óleo de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram+ ..... 73

**Figura 18** - Perfil de atividade antimicrobiana das diferentes formulações comerciais contendo óleo de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram- ..... 73

# **CAPÍTULO I – Introdução**



## 1. Introdução

Desde os tempos primitivos que o homem procura na natureza recursos e os utiliza como forma de melhorar a sua condição de vida e, conseqüentemente prolongar a sua existência (da Cunha and Roque, 2009). Os produtos de origem natural, e em particular à base de plantas, apresentam-se como a principal base da designada medicina tradicional. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam, quase exclusivamente, a medicina tradicional, e em particular à base de plantas, como a única forma de fazer frente às patologias e outras condições pelas quais são afetadas (Calixto, 2000, Souza-Moreira et al., 2010, Veiga Junior et al., 2005). Este facto justifica-se pelas elevadas carências económicas associadas a estes países, mas também devido à falta de informação acerca das várias aplicações e vantagens que os produtos de síntese apresentam (da Cunha and Roque, 2009). Um dos exemplos desta situação é a Índia, que desde sempre utilizou e continua a utilizar os produtos naturais e, em particular as plantas, para fazer frente aos males que afetavam e afetam a sua população (da Cunha and Roque, 2009).

Nos últimos anos, a utilização de produtos naturais e, em particular os produtos à base de plantas, tem assumido novamente uma grande relevância, a qual tinha diminuído aquando do aparecimento em massa dos medicamentos de síntese, tendo o seu uso generalizado a todas as populações do mundo (da Cunha and Roque, 2009). Esta situação deve-se em muito ao avanço científico verificado nesta área, nomeadamente ao nível de estudos químicos e farmacológicos, que têm permitido obter, a partir das mais variadíssimas espécies de plantas, inúmeros compostos com propriedades terapêuticas e não só (Cechinel Filho and Yunes, 1998). Apesar do impulso verificado ao nível científico, os estudos científicos existentes são ainda insuficientes, uma vez que a cada dia que passa surgem novos produtos à base de inúmeras espécies que não são totalmente conhecidas, quer ao nível dos seus benefícios, quer ao nível dos seus riscos (Cechinel Filho and Yunes, 1998). Este facto assume maior relevância uma vez que, de todas as plantas conhecidas em todo o mundo, apenas 5% foram alvo de estudos fitoquímicos, valor que é ainda menor quando falamos de plantas sujeitas a estudos biológicos (Cechinel Filho and Yunes, 1998). Desta forma, a realização de estudos científicos exaustivos ao nível desta área são cruciais para que se possa garantir que os produtos naturais apresentem o máximo de segurança, qualidade e eficácia.

Atualmente, os produtos naturais, principalmente à base de plantas, têm vindo a ser utilizados nos mais variadíssimos níveis, porém as suas principais áreas de aplicação são ao nível farmacológico e cosmético. A utilização das plantas, independentemente da área de aplicação, pode ser feita de várias formas, mais precisamente de forma direta, ou após processos extrativos que permitem obter uma ou várias substâncias que revelem potencial quer a nível terapêutico, quer ao nível de outras atividades biológicas preponderantes (da Cunha and Roque, 2009).

Em todo mundo, ao longo dos anos, variadíssimas plantas têm sido alvo de estudos profundos de forma a poder tirar-se o maior proveito destas, sendo uma dessas plantas a *Azadirachta indica* A. Juss (Biswas et al., 2002, Chattopadhyay et al., 2004, Dai et al., 1999, Koriem, 2013, Morgan, 2009, Pinto and Lanças, 2010).

A *Azadirachta indica*, vulgarmente designada de Neem ou Margosa, é uma árvore utilizada desde os primórdios da civilização que apresenta um amplo espectro de aplicações ao nível terapêutico e inseticida, destacando-se, desta forma, como uma das plantas mais versáteis a nível mundial (Biswas et al., 2002, Chattopadhyay et al., 2004, Dai et al., 1999, Koriem, 2013, Pinto and Lanças, 2010). Este facto deve-se essencialmente à grande variedade de substâncias presentes em todas as partes desta planta, mas em particular a um conjunto de substâncias designadas de tetranotriterpenóides ou limonóides, dos quais se destaca a Azadiractina (AZA) como o composto de maior relevância (Pinto and Lanças, 2010).

A AZA, bem como os restantes limonóides do Neem, podem ser encontrados em todas as partes desta planta, no entanto, no caso particular da AZA, este assume a sua máxima concentração ao nível das sementes, porção que se apresenta também como a principal fonte de obtenção do óleo de Neem (Alves et al., 2009, Kumar and Parmar, 1996, Kaushik, 2002, Morgan, 2009, Prakash et al., 2002). O óleo de Neem apresenta-se como a porção menos estudada quer ao nível do seu teor em AZA e outros compostos, quer ao nível das suas propriedades. Desta forma, a realização de estudos que revelem o teor de AZA e de outros compostos presentes no óleo de Neem, bem como a perceção da sua real utilidade enquanto agente terapêutico e não só, são essenciais, assumindo-se como um factor preponderante para que este óleo possa ser usado de forma segura, e podendo retirar-se as melhores vantagens que possam advir da sua presença em supostas formulações comerciais onde seja incorporado.

## 1.1. Objetivos

Os objetivos primordiais deste estudo foram o doseamento da Azadiractina e a avaliação da atividade antimicrobiana em produtos contendo óleo de Neem. No sentido de alcançar estes objetivos, existiram objetivos específicos que foram necessários atingir, nomeadamente:

- Desenvolvimento e otimização de técnicas analíticas que permitissem a realização de análises quantitativas e/ou qualitativas de diferentes amostras de óleo de Neem.
- Doseamento, através da técnica de Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC), da Azadiractina em diferentes amostras de óleo de Neem;
- Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da Azadiractina, óleo de Neem e formulações comerciais contendo óleo de Neem sobre diferentes estirpes bacterianas.



## **CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica**



## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. *Azadirachta indica* A. Juss (Neem)

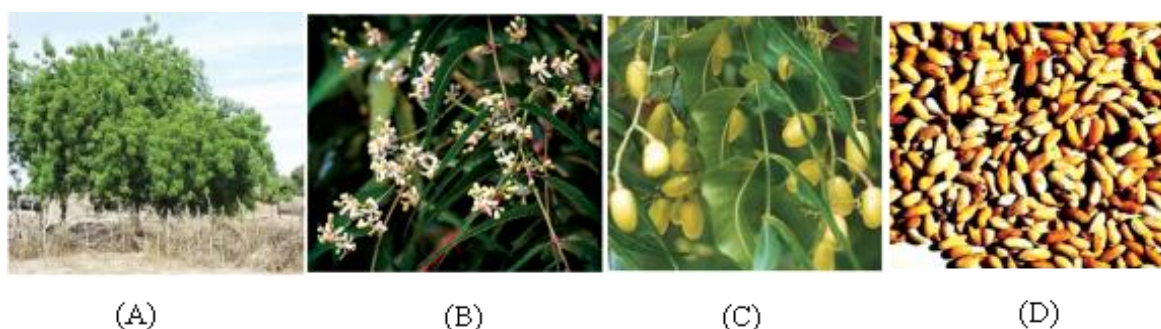
A *Azadirachta indica* é uma planta pertencente à família *Meliaceae* e ordem *Rutales*, originária do subcontinente Indiano e sudoeste da Ásia (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Hashmat et al., 2012, Morgan, 2009). Apesar da sua ocorrência se verificar essencialmente nestas regiões do globo, esta planta encontra-se difundida por todo mundo, sobretudo nos países tropicais e subtropicais, nomeadamente, nos países da América do Sul e Central, do qual é exemplo o Brasil (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Hashmat et al., 2012, Pinto and Lanças, 2010).

O Neem apresenta-se como árvore perene, de pequeno a médio porte (entre 10 a 15 m) e de crescimento rápido (Biswas et al., 2002, Hashmat et al., 2012, Morgan, 2009, Paes et al., 2011). Para além destas características, outras merecem destaque, nomeadamente a sua capacidade de sobrevivência em locais onde se verifiquem altas temperaturas (consegue suportar temperaturas até 50 °C), baixa pluviosidade anual (400-800 mm por ano), e em solos pobres e degradados (Forim et al., 2010a, Hashmat et al., 2012, Morgan, 2009). Por outro lado, o seu desenvolvimento é muito prejudicado pela presença de temperaturas baixas, nomeadamente, abaixo dos 14 °C, bem como pela ocorrência de geadas (Schmutterer, 1990, Sidhu et al., 2003).

Para além dos factos anteriormente referenciados, esta planta apresenta inúmeras outras particularidades que a tornam num alvo de interesse para a investigação. Em primeiro lugar, as características particulares dos diversos compostos ativos, nomeadamente, a variabilidade destes e das respetivas propriedades, e ainda o facto de não ser necessário destruir-se a planta para os obter, dado que se encontram, principalmente, ao nível das folhas e sementes (Barrek et al., 2004, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Hashmat et al., 2012, Kumar et al., 2010, Maity et al., 2009). Para além disso, esta planta apresenta uma alta taxa de substâncias solúveis em água, que permitem uma fácil extração das mesmas, bem como inócuas para o homem e para o ambiente, dado que são na sua maioria substâncias biodegradáveis (Barrek et al., 2004).

Desde há muito tempo, inúmeras porções desta planta (**Figura 1**), respetivamente, folhas, cascas, frutos, sementes, raízes e óleo, têm sido utilizadas com inúmeros fins,

nomeadamente para o tratamento de doenças humanas e para o controlo de pragas devido a sua ação inseticida (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010, Veitch et al., 2008a). De entre os diversos fins terapêuticos para os quais esta planta pode ser utilizada, merecem destaque os seguintes: abortivo, analgésico, anti-helmíntico, antibacteriano, antifúngico, anti-hiperglicemiante, anti-inflamatório, antiviral, antimalárico, diurético, antipirético, antiespasmódico, inseticida, antiespermatogénico, antitumoral, hipercolesterémico, hipoglicemiante, imunomodulador, entre outros (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Hashmat et al., 2012, Maity et al., 2009).



**Figura 1** – Porções da planta Neem: (A) *Azadiractha indica* A.Juss (Neem); (B) Flores de Neem; (C) Frutos de Neem; (D) Sementes de Neem (Paul et al., 2011).

Cada uma das aplicações anteriormente referenciadas é na sua maioria representativa dos compostos extraídos de cada uma das porções do Neem (Brahmachari, 2004, Paul et al., 2011). Neste sentido, normalmente os compostos obtidos a partir das folhas são descritos como sendo efetivos no tratamento da anorexia e problemas de pele, os dos frutos são extensamente usados como purgativos e emolientes, assumindo grande relevância ao nível do tratamento de problemas intestinais, urinários e outros (Maity et al., 2009). No que respeita às propriedades anti-inflamatórias e antipiréticas, estas são atribuídas a compostos obtidos a partir de folhas, sementes e óleo (Kumar et al., 2010, Maity et al., 2009). Outras propriedades, como sejam imunomoduladora, repelente de insetos, inseticida, antissética, anti-tuberculostática, anticancerígena, antiviral, antimalárica e hepatoprotetora, são associadas na sua maioria aos compostos das folhas, mais precisamente aos obtidos a partir dos extratos destas (Biswas et al., 2002, Hashmat et al., 2012, Kumar et al., 2010, Maity et al., 2009).

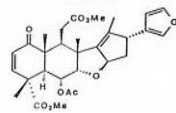
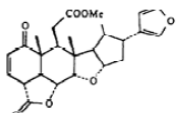
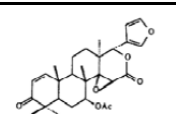
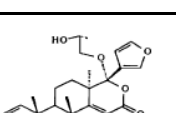
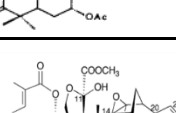
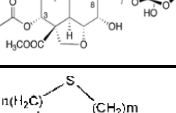
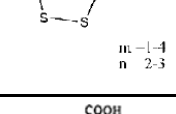
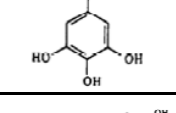
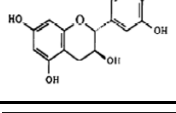
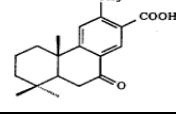
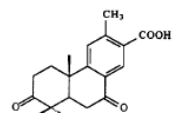
### 2.1.1. Principais compostos biologicamente ativos do Neem

O Neem apresenta uma extensa variabilidade de compostos que podem ser isolados dele. Desde o primeiro composto isolado a partir do Neem, o *nimbin*, mais de 300 compostos bioativos foram isolados sendo estes os principais responsáveis, pela sua grande variabilidade em termos de ações terapêuticas e aplicações do Neem, independentemente da porção da planta de onde possam ser obtidos (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Brahmachari, 2004, Hashmat et al., 2012, Kumar et al., 2010). Porém, as propriedades farmacológicas e outras que podem advir da utilização da maioria destes compostos são ainda desconhecidas, estabelecendo a necessidade de estudos mais exaustivos acerca dos mesmos (Bandyopadhyay and Bindu, 2011).

Os compostos ativos presentes na *Azadirachta indica* podem ser divididos em dois grandes grupos: compostos isoprenóides e compostos não isoprenóides (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010, Paul et al., 2011).

No grupo dos compostos isoprenóides incluem-se diterpenos e triterpenóides, limonóides, *azadirone* e seus derivados, *gedunin* e seus derivados, compostos tipo vilasinina, *nimbin*, salanina e AZA. Por outro lado, nos compostos não isoprenóides incluem-se proteínas (aminoácidos), hidratos de carbono (polissacarídeos), compostos sulfurosos, polifenóis, tais como flavonóides e seus glicosídeos, cumarina e taninos, compostos alifáticos, entre outros (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Hashmat et al., 2012, Kumar et al., 2010, Paul et al., 2011). Como referido anteriormente, a cada um destes compostos encontra-se associada uma determinada atividade, neste sentido, na **Tabela I** podemos ver alguns exemplos destes compostos e respetiva atividade biológica associada aos mesmos.

**Tabela I** – Compostos presentes nas diferentes porções da planta *Azadirachta indica* (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010, Paul et al., 2011).

Nome	Estrutura	Fonte	Atividade Biológica
<i>Nimbin</i>		Óleo	Espermicida
<i>Nimbolide</i>			Antibacteriano Anticancerígeno Antimalárico
<i>Gedunin</i>			Antifúngico Antimalárico
<i>Mahmoodin</i>			Antibacteriano
<i>Azadiractina</i>		Sementes	Anticancerígeno Antimalárico
Trissulfito cíclico	 $\begin{matrix} \text{S} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{n(H}_2\text{C)} \quad \quad \quad \text{(CH}_2\text{)}_m \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \end{matrix}$ $\begin{matrix} m & 1-4 \\ n & 2-3 \end{matrix}$	Folhas	Antifúngico
Ácido Gálico		Casca	Anti-inflamatório Imunomodulador
Catequina			
<i>Margolone</i>			
<i>Margolonone</i>		Antibacteriano	
<i>Isomargolone</i>			

## 2.2. Azadiractina

Como referido anteriormente, a *Azadirachta indica* contém nas suas inúmeras porções uma série de compostos bioativos e quimicamente interessantes. Porém, de entre estes compostos, destaca-se uma classe, a dos limonóides, de entre a qual se salienta a Azadiractina (AZA), como sendo o limonóide de maior interesse e o mais abundante extraído do Neem (Alves et al., 2009, Forim et al., 2010a, Kaushik, 2002, Morgan, 2009, Prakash et al., 2002).

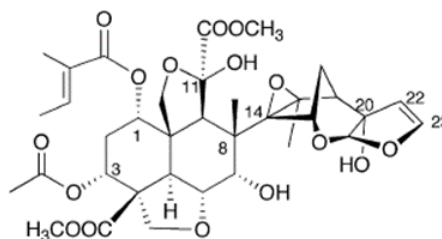
Ao longo dos anos e, principalmente, a partir da primeira vez que este composto foi isolado em 1968, ele tem sido alvo de intensa pesquisa, nomeadamente ao nível de estudos biológicos, sintéticos e estruturais (Ley et al., 2008, Prakash et al., 2002, Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a, Veitch et al., 2008b). Esta situação deve-se essencialmente às particularidades que este composto apresenta, nomeadamente, amplo espectro de ação (mesmo quando presente em quantidades diminutas), não toxicidade para mamíferos, a estrutura complexa, o que torna a sua síntese num desafio intenso, e ainda as suas propriedades biológicas únicas como biopesticida (atua influenciando a alimentação e o crescimento dos insetos e muitos outros artrópodes) (Mordue and Nisbet, 2000, Morgan, 2009, Prakash et al., 2002).

### 2.2.1. Caracterização físico-química da Azadiractina

A Azadiractina é um tetranortriterpenóide, da classe dos limonóides, com fórmula química  $C_{35}H_{44}O_{16}$ , que é extraído das sementes de Neem, encontrando-se intimamente relacionado com outros compostos extraídos das mesmas, nomeadamente, *nimbin* e *salanin* (Morgan, 2009, Prakash et al., 2002).

A primeira estrutura química da AZA foi proposta em 1976, porém constatou-se que estava incorreta (Bilton et al., 1987, Castro et al., 2014, Ley et al., 1992, Morgan, 2009, Zanno et al., 1975). Assim, apenas algum tempo depois e utilizando técnicas de NMR e análise cristalográfica por raio X, foi possível propor a estrutura da AZA que atualmente se conhece (**Figura 2**) (Bilton et al., 1987, Castro et al., 2014, Ley et al., 1992, Morgan, 2009, Zanno et al., 1975). A AZA apresenta uma estrutura extremamente complexa, da qual fazem parte dezasseis centros estéricos (sete quaternários e nove secundários), dezasseis átomos de oxigénio organizados em quatro grupos éster, dois grupos hidroxilo, um

hemiacetal, um epóxido e um grupo dihidrofurano (Castro et al., 2014, Morgan, 2009, Veitch et al., 2008a).



**Figura 2** – Estrutura química da Azadiractina –  $C_{35}H_{44}O_{16}$  (Morgan, 2009).

Devido às características da sua estrutura química, a AZA é descrita como sendo um composto altamente oxidado, com uma conformação rígida devido à presença de pontes de hidrogénio intramoleculares (Prakash et al., 2002, Veitch et al., 2007). Para além destas características, este composto apresenta um grande número de grupos funcionais reativos em posições extremamente próximas, facto que tem dificultado a sua síntese artificial (Prakash et al., 2002, Veitch et al., 2007).

Apesar de se tratar de uma substância que existe nas mais diversas porções do Neem, esta apresenta a sua máxima concentração ao nível das sementes maduras, a qual se situa entre 0,2 e 0,8% (m/m), em oposição às folhas onde se verificam concentrações diminutas deste composto (Alves et al., 2009, Mordue and Nisbet, 2000, Morgan, 2009, Prakash et al., 2002). Devido a este facto, o doseamento e a sua extração são efetuados predominantemente em amostras de semente, sendo os teores de AZA bastante variáveis, situando-se entre os 0,08 e os 6,2% (m/m) (**Tabela II**).

**Tabela II** - Teor de AZA encontrado em sementes de Neem.

Referência	Teor de Azadiractina (m/m)
Schmutterer (1990)	1%
Thejavathi et al. (1995)	0,2-0,6%
Johnson and Morgan (1997)	0,2-6,2%
Dai et al (1999)	0,16-0,27%
Deota et al. (2000)	0,11%
Schaaf et al (2000)	0,08%
Sidhu et al (2003)	0,56-0,30%
Forim et al (2010a)	0,23%
Forim et al (2010b)	0,20 -0,51%

Como referido anteriormente, a AZA é obtida naturalmente a partir das sementes de Neem, sendo extraída normalmente através de múltiplos fracionamentos, utilizando solventes adequados (Morgan, 2009). Destes processos extrativos obtém-se um pó microcristalino, que apresenta uma massa molar de 720,71 g, ponto de fusão entre 154-158 °C, uma absorção máxima na região do ultravioleta (UV<sub>máx</sub>) a  $\lambda$  217 nm (Morgan, 2009). Quando se pretende que este composto seja puro, ele tem que ser sujeito a diversos procedimentos para ser purificado, o processo mais comum é através da técnica de HPLC preparativa repetitiva, obtendo-se neste caso um pó cristalino puro, com ponto de fusão na ordem dos 160 °C (Morgan, 2009).

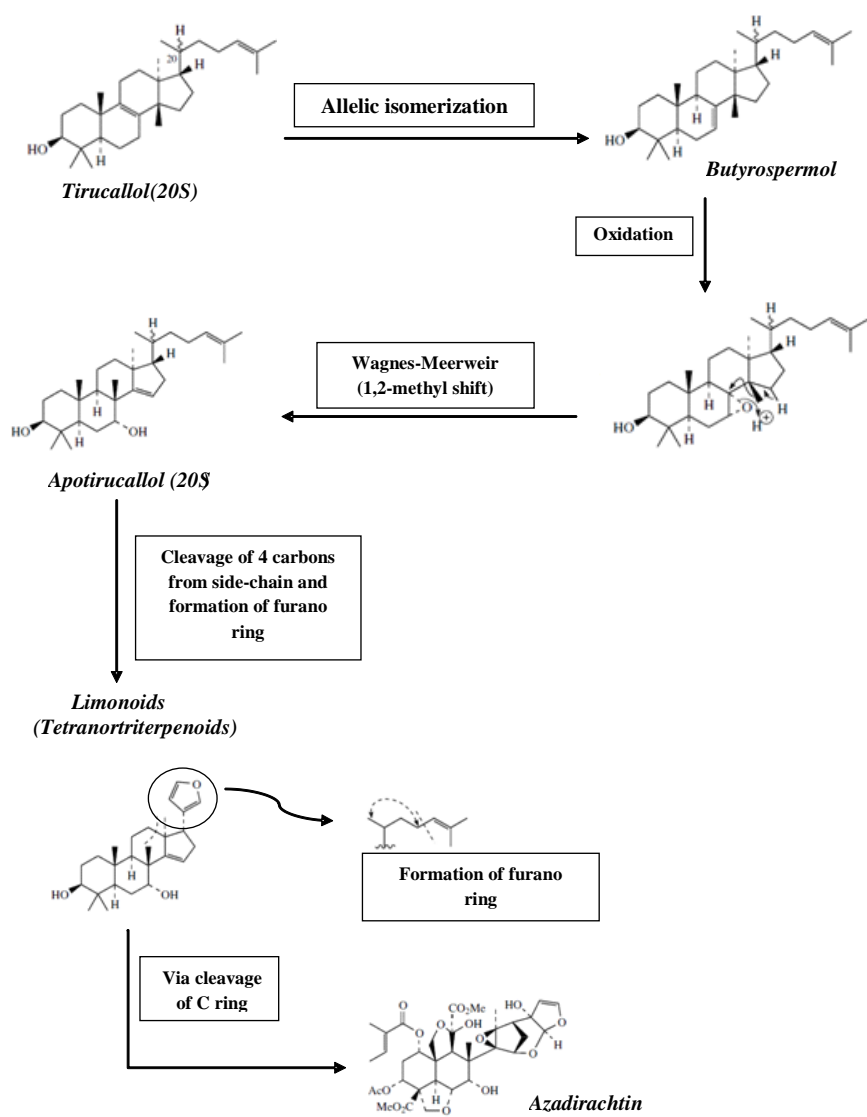
Para além das características anteriormente referenciadas, este composto apresenta outras com elevado interesse, nomeadamente o elevado grau de solubilidade em solventes orgânicos polares e em menor grau em água (Morgan, 2009, Veitch et al., 2007). Para além disso, a AZA é descrita como sendo um composto muito polar, não volátil e fotossensível (Morgan, 2009, Veitch et al., 2007).

Em termos de estabilidade da AZA esta é em muito condicionada pelas características anteriormente referenciadas. Neste sentido, verifica-se que a AZA é extremamente instável em condições ácidas, devido essencialmente à presença do seu éter enólico, bem como em condições básicas. Em termos de temperatura a AZA é extremamente instável quando sujeita a temperaturas elevadas (Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a). Porém, estudos demonstraram uma grande estabilidade do esqueleto base da AZA quando este é sujeito a elevadas temperaturas, desde que este tenha sido previamente sujeito a pirólise com ácido acético (Veitch et al., 2008a).

### **2.2.2. Biossíntese e síntese artificial da Azadiractina**

A AZA é obtida biologicamente através de uma via biossintética bastante complexa (**Figura 3**), na qual o esteróide *tirucallol* é associado como sendo o seu principal precursor (Johnson et al., 1996, Ley et al., 1993, Mordue and Nisbet, 2000). Desta forma, verifica-se que a biossíntese da AZA inicia-se com uma isomerização alélica do *tirucallol* originando o *butirospermol*, composto que é posteriormente oxidado e sujeito a rearranjo de Wagnes-Meerweir (alteração de 1,2-metilo), conduzindo por fim à formação do *apotirucallol* (Dewick, 2009, Ley et al., 1993).

Os limonóides, e em concreto os tetranotriterpenóides como a AZA, surgem a partir da clivagem dos quatro átomos de carbono terminais da cadeia lateral do *apotirucallol* (Aerts and Mordue, 1997, Dewick, 2009). Os átomos restantes que constituem a cadeia lateral deste composto sofrem ciclização e formam um anel de furano, formando uma molécula que é alvo de oxidação, conduzindo à formação de *azadirone* e *azadiradione* (Aerts and Mordue, 1997, Dewick, 2009). O terceiro anel destes últimos compostos é então clivado e sujeito a oxidação, convertendo-se assim em *C-seco-limonóides*, tais como, *salanin*. Este último composto é então alvo de oxidação e ciclização conduzindo assim á formação da AZA (Aerts and Mordue, 1997, Dewick, 2009, Hansen Dale et al., 1993).



**Figura 3** – Esquema da via biossintética de formação da AZA (Dewick, 2009)

Dadas as características particulares deste composto, das quais se destacam a instabilidade em meios ácidos e básicos, a fotossensibilidade, e a sua estrutura química, complexa (presença de um complexo de quiralidade e ligações de hidrogénio intramoleculares) tornam este composto num alvo para a ocorrência de rearranjos (Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a). Esta situação tem-se demonstrado como a principal condicionante para uma maior rapidez no desenvolvimento de um procedimento de síntese artificial deste composto com um grau de rendimento satisfatório (Ley et al., 1993, Morgan, 2009).

Devido aos constrangimentos anteriores, o seu processo de síntese demorou cerca de 20 anos a ser concluído, sendo que apenas em 2008 foi possível concluir totalmente o processo de síntese artificial da AZA (Jauch, 2008, Morgan, 2009, Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a, Veitch et al., 2008b). Um dos autores que mais se tem debruçado sobre a síntese de AZA é *Veitch et al.* (Jauch, 2008, Morgan, 2009, Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a, Veitch et al., 2008b). Veitch et al. (2007, 2008) propôs um mecanismo de síntese em que a AZA era obtida a partir de um precursor, neste caso o *vapaol*, que após sujeição a diversos processos químicos e físicos conduzia à formação da AZA (Veitch et al., 2007, Veitch et al., 2008a, Veitch et al., 2008b). Porém outros métodos de síntese foram propostos, sendo finalmente descrito um método de síntese de retrotransformação, ou seja, após a obtenção do produto final, neste caso a AZA, este pode ser novamente convertido nos seus precursores (Morgan, 2009). Assim, após longos anos de pesquisa, Ley e o seu grupo de colaboradores, propôs um mecanismo de síntese no qual a AZA era obtida em 71 etapas e com um rendimento de 0.00015% (Castro et al., 2014, Jauch, 2008, Morgan, 2009). Este longo processo de pesquisa evidenciou outras particularidades, como seja, o facto de poderem ser obtidos artificialmente outros cinco produtos que ocorrem naturalmente e são estreitamente relacionados com a AZA (Morgan, 2009).

### **2.2.3. Propriedades biológicas da Azadiractina**

A AZA tem sido extensamente estudada devido a sua atividade anticancerígena, tendo mostrado resultados extremamente positivos como quimiopreventivo, devido à capacidade de induzir efeitos antiproliferativos através de *downregulation* de proteínas envolvidas no ciclo celular e apoptose, transdução, quer pela via intrínseca ou extrínseca (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Harish Kumar et al., 2009, Harish Kumar et al., 2010, Paul et al., 2011).

A AZA induz a apoptose tanto pela via mitocondrial como pela via do recetor de morte (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Harish Kumar et al., 2009). O que se verifica com a presença da AZA é uma diminuição do rácio Bcl2/Bax, o qual é um factor preponderante, dado que o aumento deste rácio encontra-se associado à presença de células tumorais (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Binder et al., 1996). Consequentemente a esta diminuição verifica-se a ativação de uma série de factores pro-apoptóticos e a inibição de factores anti-apoptóticos, situação que é importante para o controlo do cancro (Bandyopadhyay and Bindu, 2011). Assim, devido a uma diminuição do rácio Bcl2/Bax, ocorre o aumento da Apaf 1 e caspase 3, conduzindo desta forma a uma *dowregulation* do antígeno celular nuclear, o que leva a fragmentação e condensação, os quais são indícios de apoptose (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Harish Kumar et al., 2009, Paul et al., 2011). O mecanismo pelo qual este composto exerce o seu efeito anticancerígeno é igual ao exercido pelo *nimbolide*, outro composto obtido a partir da *Azadirachta indica* (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Harish Kumar et al., 2010, Thoh et al., 2011).

Outra ação descrita para a AZA é a desempenhada sobre o TNF $\alpha$ , uma citocina pro-inflamatória que desempenha um papel preponderante nas vias de sinalização da inflamação, apoptose e carcinogénese (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Thoh et al., 2011). Neste caso, verificou-se que a AZA era capaz de inibir as atividades biológicas induzidas por esta citocina (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Thoh et al., 2011). Esta inibição é conseguida devido ao bloqueio que a AZA exerce sobre a ativação do IKK, à qual se segue a degradação da I $\kappa$ B $\alpha$  (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Thoh et al., 2011). Outros estudos relatam que AZA pode também atuar através da interação com os TNFRs e, assim, inibir a ligação do TNF de sinalização através da ativação do IKK jusante, degradação I $\kappa$ B $\alpha$ , a translocação nuclear de p65 e gene-dependente de transcrição NF- $\kappa$ B (Thoh et al., 2011, Bandyopadhyay and Bindu, 2011). Desta forma, através do bloqueio do recetor do TNF $\alpha$ , a AZA permite a ativação do NF- $\kappa$ B (induzida pela ativação de TNF $\alpha$ ), e desta forma consegue efetuar um controlo eficaz da inflamação (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Thoh et al., 2011).

Para além do seu efeito como anticancerígeno, este composto tem sido extensamente associado a resultados extremamente interessantes como antimalárico (Biswas et al., 2002, Hashmat et al., 2012, Kumar et al., 2010). Esta atividade é conseguida, devido à capacidade da AZA bloquear a formação dos microtúbulos nas fases de desenvolvimento

do parasita responsável por esta patologia (Biswas et al., 2002, Hashmat et al., 2012, Isah et al., 2003, Kumar et al., 2010, Morgan, 2009).

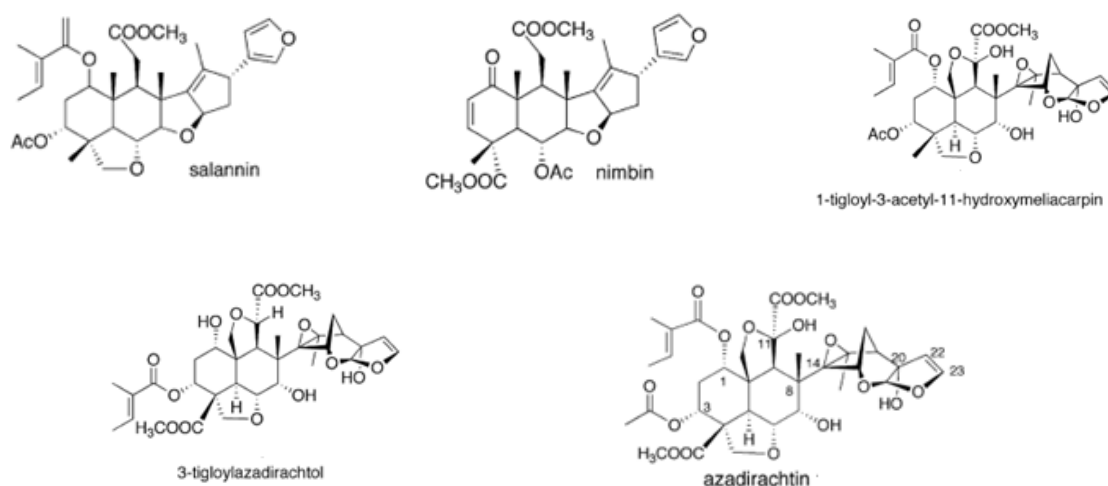
Apesar dos seus usos para terapêutica humana serem de elevada relevância, este composto, assim como outros obtidos a partir da *Azadirachta indica*, tem desde a sua descoberta sido utilizados como inseticidas, destacando-se este uso como a principal aplicação destes compostos (Morgan, 2009). Desde a descoberta da atividade pesticida bem como a sua correlação com a AZA, como principal responsável por esta propriedade, a investigação sobre AZA tem aumentado drasticamente (Ambrosino et al., 1999).

A AZA apresenta determinadas características que permitem que se destaque como um excelente inseticida, mais precisamente um biopesticida, das quais se destacam o seu amplo espectro de ação, o facto de não apresentar toxicidade para o homem e o facto de não ser agressivo para o meio ambiente (Johnson and Morgan, 1997, Morgan, 2009, Prakash et al., 2002). Os seus efeitos sobre os insetos são variados, podendo afetar a ingestão ou mesmo o processo de crescimento, podendo resultar da ingestão da AZA ou contato direto com a mesma (Morgan, 2009). O ação primordial tem sido associado à similitude deste composto com o ecoesteróide, o que conduz a um comprometimento do processo de crescimento, podendo mesmo conduzir à morte do organismo (Morgan, 2009). Porém este efeito, não pode ser considerado como válido, dado que, efetivamente as estruturas não apresentam qualquer tipo de similitude (Morgan, 2009, Ruscue, 1972). Desta forma, a principal ação descrita para AZA como inseticida é a capacidade de reduzir a ingestão de alimento pelos insetos, ou seja, através de uma ação supressora de apetite (Morgan, 2009, Prakash et al., 2002). Para além deste grande efeito, outros têm sido atribuídos à presença de AZA, nomeadamente, repelir as espécies adultas, o que conduz à diminuição de ovos, impedindo assim a proliferação dos insetos (Morgan, 2009, Prakash et al., 2002).

### **2.3. Outros limonóides**

Os limonóides, mais precisamente os compostos triterpenóides, como referido anteriormente, são dos compostos mais comuns ao nível das mais diversas porções que constituem a árvore de Neem (sementes, frutos, flores, folhas, galhos, cascas e raízes) (Melwita and Ju, 2010, Morgan, 2009). Estão descritos na literatura, inúmeros limonóides sendo os mais descritos a Azadiractina-A (AZA), *salanin*, *nimbin*, Azadiractina-B (3-

*tigloylazadirachtol*) e Azadiractina-D (*1-tigloyl-3-acetyl-11-hydroxymeliacarpin*) (**Figura 4**) (Melwita and Ju, 2010, Morgan, 2009).



**Figura 4** – Estruturas químicas dos principais limonóides descritos na literatura (Morgan, 2009)

Em 1996, *Remkold et al.*, introduziu a designação de Azadiractina A, B, C e D para alguns dos limonóides mais frequentes, descrevendo estes compostos como isómeros da AZA (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Morgan, 2009). Porém, estudos posteriores descreveram com maior exatidão as estruturas químicas destes compostos e revelaram que estas designações e a identificação como isómeros foram erradamente atribuídas, uma vez que se tratam de compostos que não pertencem ao mesmo grupo de composto e desta forma não se tratam de isómeros (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Morgan, 2009).

A Azadiractina-A (AZA-A) e Azadiractina-B (AZA-B) são dois compostos regularmente avaliados e analisados em simultâneo, dado a sua estreita relação e frequência, uma vez que se tratam de dois dos limonóides mais comuns presentes no Neem (Forim et al., 2010a, Morgan, 2009). A AZA-A é idêntica a AZA, desta forma este composto é designado normalmente pelo nome de Azadiractina (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Grimalt et al., 2011, Hull Jr et al., 1993, Melwita and Ju, 2010, Morgan, 2009). Por outro lado, após anos de pesquisa Kraus et al (1986), descreveu com rigor a estrutura da AZA-B, atribuindo-lhe o nome de *3-tigloylazadirachtol*, nome que prevalece (Klenk et al., 1986, Morgan, 2009). Apesar disto, regularmente este composto é ainda designado por AZA-B (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Hull Jr et al., 1993, Morgan, 2009, Melwita and Ju, 2010).

Outros limonóides estão presentes nas diferentes porções do Neem, mas em quantidades diminutas, muitos dos quais também foram designados por Azadiractina (Azadiractina C, D, E, F, G, e K). Porém outros estudos sobre estas estruturas também revelaram que estes não se tratam de isômeros da AZA, permitindo atribuir-lhes nomes mais corretos de acordo com a sua real estrutura química (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Morgan, 2009).

## **2.4. Óleo de Neem**

O óleo de Neem foi isolado pela primeira vez em 1968, e desde então vários autores têm-se debruçado sobre o seu estudo (Barrek et al., 2004). O óleo de Neem é obtido a partir das sementes de Neem, as quais apresentam altos níveis de óleo, rondando os 30 a 50% de óleo por semente (Barrek et al., 2004, Kaushik, 2002, Kumar and Parmar, 1996).

Os métodos de obtenção do óleo de Neem a partir das sementes são diversos, de entre os quais se destaca a extração mecânica, a extração por fluído supercrítico e a extração com solventes (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008). O método de extração mecânico é o método mais frequentemente utilizado, contudo apresenta alguns constrangimentos, nomeadamente, o preço baixo associado ao óleo obtido, situação que ocorre devido a uma maior percentagem de água e metais contrapondo-se à quantidade reduzida de AZA e à turbidez que o óleo apresenta (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008). O outro método comum para a obtenção de óleo de Neem é através de extração por fluído supercrítico, esta técnica permite obter um óleo com um elevado grau de pureza, porém não é estabelecida como uma técnica de rotina dado que esta associada a custos elevados (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008). De entre os métodos mais comuns, a extração recorrendo a solventes apresenta-se como o método com o maior número de vantagens em relação às técnicas anteriores (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008). De entre as vantagens descritas para este método destacam-se maior rendimento do processo extrativo e menor turbidez do óleo comparativamente ao método de extração mecânica (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008). Por outro lado, está associado a menores custos relativamente ao método de extração por fluído supercrítico (Awolu et al., 2013, Forim et al., 2010b, Liauw et al., 2008).

O óleo de Neem caracteriza-se por ser um óleo de cor amarelo pálido, transparente (**Figura 5**), que apresenta um sabor amargo e odor desagradável (Awolu et al., 2013, Chinnasamy et al., 1993, Rukmini, 1987). O sabor amargo e odor desagradável são características que inviabilizam a utilização do óleo de Neem por via oral (Awolu et al., 2013, Chinnasamy et al., 1993, Rukmini, 1987). Estas particularidades do óleo de Neem devem-se, essencialmente, à grande variedade de compostos amargos presentes no óleo, cerca de 2% (Rukmini, 1987). De entre os diversos compostos amargos presentes no óleo de Neem destaca-se o *nimbidin*, composto que representa 1,4% da totalidade dos compostos amargos do óleo (Chinnasamy et al., 1993, Rukmini, 1987). A característica amarga deste composto deve-se à presença de enxofre que resulta da formação do ácido nimbidinia (composto que contém enxofre), aquando do processo de hidrólise do *nimbidin* (Chinnasamy et al., 1993, Rukmini, 1987). Para além deste composto, outros compostos amargos podem ser destacados, nomeadamente *nimbinin* (0,01%), *nimbin* (0,12%) e *nimbidiol* (0,5%) (Chinnasamy et al., 1993, Rukmini, 1987).



**Figura 5** – Aspeto do óleo de Neem.

Para além dos compostos anteriormente referenciados responsáveis pelo sabor amargo e odor desagradável, o óleo de Neem é rico em ácidos gordos e apresenta como o seu principal constituinte ativo a Azadiractina (Barrek et al., 2004, Biswas et al., 2002, Kumar et al., 2010, Melwita and Ju, 2010). A qualidade da grande parte dos óleos de Neem é representada pela percentagem de AZA, a qual é condicionada pela qualidade das sementes utilizadas na extração, bem como pelo processo extrativo (Melwita and Ju, 2010). O teor de AZA presente no óleo de Neem é variável, podendo apresentar valores quase indetetáveis até valores a rondar os 4000 ppm (Govindachari et al., 1996, Forim et al., 2010b, Melwita and Ju, 2010, Kumar and Parmar, 1996, Warra, 20012).

O óleo de Neem tem associado a si uma grande diversidade de propriedades, que são características de cada composto presente nele (**Tabela I**), destacando-se atividades como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, espermicida, antimalárica, inseticida entre

outras (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010, Paul et al., 2011).

### 2.4.1. Aspectos toxicológicos do óleo de Neem

Apesar da grande variedade de aplicações do óleo de Neem, a toxicidade deste para os animais e humanos tem de ser tida em conta, dado que vários estudos têm relatado toxicidade em diversos animais (**Tabela III**) (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010).

**Tabela III** – Toxicidade e efeitos adversos associados ao óleo de Neem (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010).

<b>Toxicidade/efeito adversos</b>	<b>Animal onde se manifesta a toxicidade</b>
<b>Toxicidade letal</b>	Tilápia e carpa
<b>Toxicidade aguda</b>	Rato e coelho
<b>Hipoglicemia severa</b>	Rato
<b>Vômitos, diarreia, sonolência, leucocitose, acidose metabólica e encefalopatia.</b>	Homem
<b>Espermicida</b>	Macaco e Homem
<b>Antifertilidade</b>	Macaco, babuínos e roedores

No caso concreto dos humanos, os efeitos tóxicos são raros, porém alguns estudos descrevem efeitos adversos advindos da utilização de óleo de Neem, nomeadamente vômitos, diarreia, sonolência, encefalopatia (em particular em latentes e crianças), bem como leucocitose e acidose metabólica (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010). Estes efeitos são em norma atribuídos em grande parte à presença de substâncias tóxicas e aflatoxinas presentes no óleo de Neem (Biswas et al., 2002). Apesar dos efeitos tóxicos referenciados, estudos verificaram que a aplicação única de óleo numa percentagem de 1% não produz efeitos adversos graves quer em humanos quer em animais (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010).

A DL 50 (dose letal mediana) do óleo de Neem é variável, apresentando valores diferentes entre espécies (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Kumar et al., 2010). No caso concreto, da sua principal substância ativa a AZA, a DL 50 sobre insetos varia entre 1 a 4 µg por grama de inseto (Barrek et al., 2004). Desta forma é necessária particular

atenção no consumo e utilização de óleo de Neem por parte das populações humanas, quer para uso próprio quer para aplicação em animais.

Vários autores têm investigado vários mecanismos de atuação do óleo de Neem no sentido de explicar os possíveis efeitos adversos que podem advir da utilização deste produto (Biswas et al., 2002). Um dos mecanismos propostos, indica que o óleo de Neem atua através da desacoplação da fosforilação oxidativa mitocondrial, conduzindo à inibição da cadeia respiratória. Para além disso atua reduzindo os níveis intramitocondriais da acetilCoA e ésteres de CoA ácido – solúveis, bem como o teor de ATP mitocondrial (Biswas et al., 2002).

## **2.5. Doseamento de compostos ativos do Neem**

A análise quantitativa e qualitativa de compostos ativos presentes nas plantas são parâmetros essenciais para a utilização segura e eficaz dos mesmos. Para efetuar este tipo de análise pode-se recorrer às mais diversas técnicas analíticas, destacando-se as técnicas cromatográficas, como técnicas de eleição, uma vez que permitem a análise laboratorial de misturas complexas devido à capacidade de separar, identificar e quantificar os diversos compostos que possam constituir as mesmas (Kupiec, 2004a).

A cromatografia destaca-se como um método físico-químico que se baseia na capacidade dos diferentes compostos de uma mistura complexa migrarem diferencialmente devido às diferentes interações verificadas entre duas fases imiscíveis designadas de fase móvel (FM) e fase estacionária (FE) (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004a, Kupiec, 2004b, McPolin, 2009). A fase móvel apresenta-se como um fluído que se desloca através da designada fase estacionária, a qual se apresenta como sendo uma fase fixa e com uma extensa área superficial (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004a, Kupiec, 2004b, McPolin, 2009). Existem diversos métodos cromatográficos descritos, sendo estes classificados de acordo com diversos critérios, nomeadamente, quanto ao mecanismo de separação, ao sistema cromatográfico, e ao tipo de fase utilizada (Kupiec, 2004a, Kupiec, 2004b, McPolin, 2009).

No caso do Neem, a substância mais analisada é a AZA, porém outras substâncias presentes na planta são alvo de análise (Johnson and Morgan, 1997, Sidhu et al., 2003). Para este efeito utilizam-se as mais variadas técnicas, destacando-se as técnicas cromatográficas como as principais técnicas utilizadas para a quantificação e identificação

destas substâncias, e em particular da AZA (Prakash et al., 2002). Dai et al (1999,2001) desenvolveu um método colorimétrico, utilizando vanilina, que pode ser usado para determinar a presença da AZA bem como de outros limonóides, porém o conteúdo de AZA não pode ser determinado separadamente (Dai et al., 1999, Dai et al., 2001). Outra técnica também descrita para determinação de AZA, foi a utilizada por Schutz et al. (1997) e outros autores que efetuaram a determinação de AZA através da técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Hemalatha et al., 2001, Schütz et al., 1997).

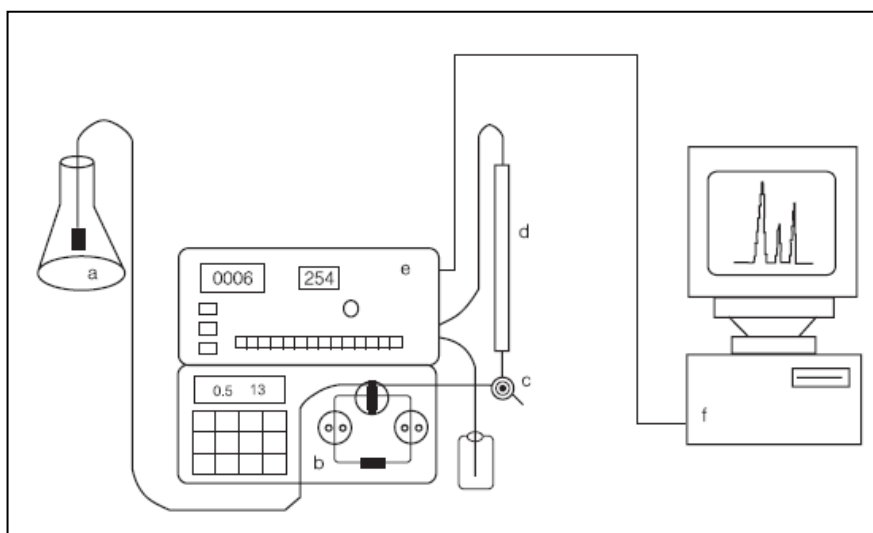
### **2.5.1. Análise cromatográfica da Azadiractina em diferentes amostras de Neem**

No caso da AZA, a Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC) destaca-se como a principal técnica cromatográfica utilizada (Prakash et al., 2002). Porém, outras técnicas cromatográficas também são vulgarmente utilizadas para o mesmo fim, nomeadamente a Cromatografia Gasosa (GC) e a Cromatografia em Camada Fina (TLC), entre outras (Alves et al., 2009, Kaushik, 2002). Ermel et al. (1984) utilizou TLC associada com fluorescência para determinação de AZA presente em sementes de *Azadirachta indica* (Kaushik, 2002). Por outro lado, Johnson e Morgan (1997), Huang e Morgan (1990) e Ambrosino et al. (1990) recorreram à Cromatografia de Fluido Supercrítico (SFC) para efetuar a determinação da AZA (Ambrosino et al., 1999, Huang and Morgan, 1990, Johnson and Morgan, 1997, Kaushik, 2002).

A Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC) é um tipo de cromatografia em coluna geralmente utilizada em análise bioquímica para separar, identificar e quantificar compostos ativos (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Esta técnica cromatográfica baseia-se na utilização de colunas de dimensões reduzidas, em que uma fase móvel no estado líquido elui sobre uma fase estacionária que se localiza no interior da referida coluna (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). A fase estacionária que reveste as colunas neste tipo de técnica necessita de apresentar características adequadas para que, possa resistir a altas pressões utilizadas para a separação dos compostos de uma mistura e análise dos mesmos (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009).

Um equipamento de HPLC é constituído normalmente por um reservatório para fase móvel, uma bomba, um injetor de amostras, uma coluna, um detetor e um *software*

informático de aquisição e integração de dados (**Figura 6**) (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). O componente base deste equipamento é a coluna, uma vez que esta é a principal responsável pela separação dos diversos compostos que constituem uma mistura alvo de análise (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). O processo de análise cromatográfica inicia-se com injeção da amostra através do injetor, para a coluna, onde ocorre a separação dos componentes da amostra pela eluição ao longo da coluna da fase móvel (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). A detecção dos diferentes compostos eluídos, depende do detetor utilizado, sendo que a resposta que se verifica perante o detetor é apresentada no sistema de aquisição e integração de dados pelo designado cromatograma (Degani et al., 1998, Kupiec, 2004b, Malviya et al., 2010, McPolin, 2009).



**Figura 6** – Esquema ilustrativo de um equipamento de HPLC. a) reservatório para fase móvel; b) bomba; c) injetor de amostras; d) coluna; e) detetor; f) *software* informático de aquisição e integração de dados (Degani et al., 1998).

A técnica de HPLC apresenta vários subtipos que são diferenciados através do revestimento das colunas utilizado, ou seja, da fase estacionária pela qual são revestidas (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Neste sentido, os tipos de HPLC vulgarmente utilizados são a HPLC de fase normal (NP-HPLC) ou de fase reversa (RP-HPLC) (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009).

A técnica NP-HPLC utiliza uma coluna revestida por uma fase estacionária de natureza polar, normalmente sílica, associada a uma fase móvel de natureza não polar (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Assim, verifica-se que, componentes menos polares

serão os primeiros a eluir contrariamente aos polares, que ficam retidos na fase móvel (apolar) (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Por outro lado, a técnica RP-HPLC utiliza uma coluna revestida por uma fase estacionária de natureza apolar, associada a uma fase móvel de natureza polar (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Esta técnica baseia-se nas interações hidrofóbicas, que são obtidas a partir das forças de repulsão que se verificam entre a fase móvel, o composto (apolar), e a fase estacionária apolar (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Assim, verifica-se que componentes mais polares serão os primeiros a eluir contrariamente aos apolares, que ficam retidos na fase móvel (polar) (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009).

À técnica de HPLC encontram-se associados detetores, que são responsáveis pela conversão das moléculas que chegam ao local de deteção em sinal elétrico (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009). Estes podem ser de diversos tipos (por exemplo, detetores UV-Vis, de matriz de díodos (DAD), dependendo a sua escolha essencialmente das propriedades físico-químicas da amostra sobre a qual recai a análise (Malviya et al., 2010, McPolin, 2009, Morgan, 2009).

No caso concreto da AZA, dado que esta é uma substância não volátil e também muito polar, a técnica de HPLC de fase reversa associada a detetores UV-Vis, de matriz de díodos (DAD), apresenta-se como o método de eleição para efetuar a identificação e quantificação desta substância (Morgan, 2009). Porém, é de salientar o facto de o comprimento de onda onde maioritariamente esta substância absorve ser muito curto e muito semelhante a um grande número de outros compostos (Morgan, 2009).

Esta técnica, e em particular na identificação e quantificação da AZA, pode ser aplicada às diversas porções da planta, bem como às mais diversas formulações comerciais à base deste composto, diferindo apenas nas condições cromatográficas utilizadas - tipo de coluna, fluxo, método de deteção, fase móvel, entre outras, bem como na forma de preparação das respetivas amostras a testar (Kaushik, 2002, Morgan, 2009). Desta forma, na **Tabela IV** encontra-se um resumo de estudos sobre o doseamento de AZA (AZA-A) nas mais diversas porções de Neem utilizando HPLC, onde se descrevem as condições cromatográficas utilizadas em cada um deles. Nesta tabela, encontram-se também alguns estudos que descrevem as condições cromatográficas utilizadas para o doseamento de *3-tigloylazadirachtol* (AZA-B), dado que se trata de um composto intimamente relacionado com a AZA e avaliado muitas vezes em simultâneo.

**Tabela IV** – Resumo de estudos sobre doseamento de AZA (AZA-A) e 3-tigloylazadirachtol (AZA-B) utilizando HPLC.

Referência	Amostra	Coluna	Fase Móvel (v/v)	Fluxo (ml/min)	Tipo de Eluição	Tempo de Retenção (min)	Deteção (nm)
Hull Jr. et al (1993)	Formulações comerciais	RP-C8 (150 x 4,6 mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (28:72)	1	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-215
Sundaram et al (1993)	Formulações comerciais e óleo	RP-C18 (250x4,6mm)	Inicialmente ACN:H <sub>2</sub> O (20:80) em gradiente aumento linear do ACN para 35% por 22,5 min ACN:H <sub>2</sub> O (40:60)	1	Gradiente	- <sup>a</sup>	UV-210
Thejavathi et al (1995)	Sementes	C18 (150x3,9 mm)	isocrático durante 5 min, em gradiente até 100% de ACN em 3 min (20% por min)	- <sup>a</sup>	Gradiente	- <sup>a</sup>	UV-217
Kumar et al (1996)	Óleo	RP (150x6 mm)	MetOH:H <sub>2</sub> O (70:30)	1	Isocrático	7,13 (AZA-A)	UV-214 e 250
Johnson et al (1997)	Sementes	RP (250 x4,6mm)	0 aos 15 min – ACN:H <sub>2</sub> O (32:68); 15 aos 20, ACN aumenta 32 para 55%; 20 aos 55 ACN mantem os 55%	1	Gradiente	- <sup>a</sup>	UV-217
Dai et al (1999)	Sementes	RP (250x4,6mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (40:60)	1	Isocrático	10,2 (AZA-A)	UV-214
Ramesh et al (1999)	Óleo	RP-C18 (150 x 4,6 mm)	MetOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:15:50)	1	Isocrático	7,0 (AZA-A) 6,0 (AZA-B)	- <sup>a</sup>
Deota et al (2000)	Sementes	RP-C18 (3.9× 300 mm)	MetOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	1	Isocrático	6,9 (AZA-A)	UV-217
Schaaf et al (2000)	Sementes e calos	RP - C18 (100 x4,6mm)	H <sub>2</sub> O:ACN:0,1% TFA	0,5	Gradiente	15 -18 (AZA-A)	- <sup>a</sup>
Kaushik (2002)	Sementes	RP-C18 (150 x 3,9 mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (40:60)	1	Isocrático	2,8(AZA-A)	UV-214
Sharma et al (2003)	Sementes	RP-C18 (250 x 4 mm)	MetOH:H <sub>2</sub> O (50:50)	0,75	Isocrático	13,9 (AZA-A) 16,8 (AZA-B)	UV-217
Sidhu et al (2003)	Sementes	C8 (250 x 4,6 mm)	ACN: MetOH:H <sub>2</sub> O (23:25:55)	1	Isocrático	19,2(AZA-A) 20,2 (AZA-B)	UV-220
Barrek et al (2004)	Óleo	C18 (250 × 3mm)	ACN: H <sub>2</sub> O (16% até 100% de ACN em gradiente em 40 min)	0.4	Gradiente	21,3 (AZA-A) 21,9 (AZA-B)	UV-215
Alves et al (2009)	Folhas	RP-C18 (250 x 4,6 mm)	H <sub>2</sub> O: ACN (60:40)	1	Isocrático	7,9 (AZA-A) 8,8 (AZA-B)	UV-217
Forim et al (2010)	Folhas, calos, flores e frutas	RP-C18 (150 x 4,6mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (40:60)	0,4	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-217
Forim et al (2010)	Sementes/ Óleo	RP-C18 (150 x 4,6 mm)	ACN/MetOH/THF/H <sub>2</sub> O (34:4:1:61)	0,8	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-217
Forim et al (2010)	Sementes	RP-C18 (150 x 4,6 mm)	ACN:MetOH:THF:H <sub>2</sub> O (34:4:1:61)	0,4	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-217
Forim et al (2010)	Óleo	RP-C18 (150 x 4,6 mm)	ACN:MetOH:THF:H <sub>2</sub> O (36,75:7,35:4,9:51)	0,8	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-217
Melwita et al (2010)	Óleo	C18 (250 x 4.6 mm)	MetOH:H <sub>2</sub> O (50:50)	1	Isocrático	- <sup>a</sup>	UV-215
Saxena et al (2010)	Sementes	RP-C18 (150 x 3,9 mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (60:40)	1	Isocrático	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Jadeja et al (2011)	Sementes	RP-C18 (250 x 4.6 mm)	ACN:H <sub>2</sub> O (35:65)	1	Isocrático	18,6(AZA-A)	UV-217

RP (*reverse phase*) ACN (acetonitrilo); H<sub>2</sub>O (água); MetOH (Metanol); THF (tetrahidrofurano); AZA-A (azadiractina); AZA-B (3-tigloylazadirachtol); UV (ultravioleta); <sup>a</sup> não mencionado.

Em diferentes estudos já realizados sobre a temática (**Tabela IV**), pode-se verificar que o método de eluição isocrático é o mais difundido, estando associado na sua maioria a tempos de retenção menores (Alves et al., 2009, Deota et al., 2000, Kaushik, 2002, Kumar

and Parmar, 1996, Ramesh and Balasubramanian, 1999, Sharma et al., 2003, Sidhu et al., 2003). No estudo realizado por Barrek et al. (2004) foi utilizado um método de eluição por gradiente e uma coluna C18, 250x4,6 mm, e neste caso os tempos de retenção para a AZA foram na ordem dos 21,3 min (Barrek et al., 2004). Por outro lado, no estudo realizado por Kaushik et al. (2000), foi utilizado um método de eluição isocrática e uma coluna C18, 150x3,9 mm, e neste caso o tempo de retenção foi muito mais baixo (2,8 min) comparativamente ao obtido por Barrek et al. (2004) (Barrek et al., 2004, Kaushik, 2002). Por outro lado, no que respeita ao tipo de coluna os tempos de retenção também são variáveis, mesmo dentro do mesmo método de eluição. Neste sentido, em oposição ao estudo realizado por Kaushik (2000), Dai et al (1999) utilizou o mesmo método de eluição, ou seja, isocrático, mas uma coluna de dimensões superiores (C18, 250x4,6 mm), tendo-se verificado um tempo de retenção para a AZA cerca de três vezes maior (10,2 min) comparativamente ao descrito por Kaushik (2002) (Dai et al., 1999, Kaushik, 2002). Desta forma, pode-se inferir que a utilização de um sistema em que seja utilizado um tipo de eluição isocrática associado a uma coluna de menores dimensões conduz a análises menos morosas, e desta forma associada a menores custos. No entanto, a escolha do tipo de eluição, deve ter sempre em conta o tipo de amostra em causa bem como, a sua estabilidade (Sarais et al., 2008, Schaaf et al., 2000).

Em termos de fase móvel utilizada para a análise cromatográfica de AZA por HPLC, os diferentes estudos já realizados descrevem diversos tipos de fase móvel, sendo que se destacam o acetonitrilo, o metanol e a água como componentes presentes em grande parte destas. A fase móvel mais utilizada nos diversos estudos é a constituída por água e acetonitrilo em porções 60:40 (v/v) (Alves et al., 2009, Barrek et al., 2004, Dai et al., 1999, Forim et al., 2010a, Hull Jr et al., 1993, Kaushik, 2002, Schaaf et al., 2000, Sundaram and Curry, 1993, Thejavathi et al., 1995). Uma outra condição essencial na determinação de AZA é o comprimento de onda ao qual é efetuada a deteção, neste caso, verifica-se que este pode ser variável (214-250 nm), porém, a maioria dos estudos efetuam a deteção de AZA aos 217 nm (Alves et al., 2009, Deota et al., 2000, Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010c, Forim et al., 2010b, Johnson and Morgan, 1997, Sharma et al., 2003, Thejavathi et al., 1995).

Quanto ao tipo de amostras de Neem utilizadas no doseamento de AZA, elas são variadas, sendo que se verifica a predominância de amostras obtidas a partir das sementes,

mais precisamente extratos hidroalcoólicos obtidos destas porções (Dai et al., 1999, Deota et al., 2000, Forim et al., 2010c, Forim et al., 2010b, Johnson and Morgan, 1997, Kaushik, 2002, Schaaf et al., 2000, Sharma et al., 2003, Sidhu et al., 2003, Thejavathi et al., 1995). Por outro lado, o óleo de Neem apresenta-se como uma das porções do Neem menos estudada ao nível do teor em AZA, pelo que o teor efetivo de AZA presente nesta amostra ainda não é totalmente conhecido, sendo muitas vezes estimado a partir do teor de AZA presente nas sementes, dado que esta é a porção de onde se extrai o óleo. Existem ainda estudos em que o alvo da análise são amostras de formulações comerciais contendo esta substância (Hull Jr et al., 1993, Sundaram and Curry, 1993).

## **2.6. Atividade antimicrobiana do Neem**

A atividade antimicrobiana da planta Neem tem sido extensamente avaliada durante os últimos anos por diversos autores utilizando métodos microbiológicos, sendo que os resultados obtidos têm sido muito diversificados.

O estudo da atividade antimicrobiana do Neem e, em particular da atividade antibacteriana, envolve uma diversidade de bactérias Gram+ e Gram-, com resultados muito distintos. Neste sentido, em inúmeros estudos foram demonstrados resultados positivos da ação de extratos de folhas e cascas de sementes de Neem sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Ahmad and Beg, 2001, Asif, 2012, Gajanan, 2012, Grover et al., 2011, Gualtieri et al., 2008, Jahan et al., 2007, Koonan and Budida, 2011, Kumar et al., 2012, Maragathavalli et al., 2012, Rathod et al., 2012, Oyinbo et al., 2013, Sarmiento et al., 2011, Vinoth et al., 2012, Upadhyay et al., 2010). Porém, em outros estudos, também identificaram resultados positivos, mas em menor número, sobre outras bactérias, nomeadamente, *Bacillus pumillus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, entre outras (Asif, 2012, Atawodi and Atawodi, 2009, Grover et al., 2011, Koonan and Budida, 2011, Maragathavalli et al., 2012, Mehrotra et al., 2010, Zhang et al., 2010).

Dos diversos estudos analisados, foi possível ainda verificar que em termos das bactérias mais frequentes ao nível da pele, quer da flora normal ou patologias associadas à mesma, dos quais são exemplo *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, os extratos de Neem apresentaram resultados positivos bastante satisfatórios (Gajanan, 2012, Ki and Rotstein, 2008, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986). Para além disso, ao nível da

atividade antimicrobiana específica das folhas de Neem, esta foi relatada *in vitro* sobre vários microrganismos, nomeadamente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Vibrio cholerae* (Atawodi and Atawodi, 2009).

Contrariamente aos resultados positivos obtidos sobre as bactérias anteriormente referenciadas, existem também descritos resultados negativos dos extratos obtidos a partir do Neem sobre diversas bactérias, nomeadamente, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella dysenteriae*, *Staphylococcus paratyphi* e *Streptococcus mutans* (Aarati et al., 2011, Atawodi and Atawodi, 2009, Grover et al., 2011, Koonan and Budida, 2011).

Um estudo em que se verificou a atividade diferencial de bactérias sob ação de extratos de Neem obtidos utilizando diferentes solventes e em diferentes concentrações foi o realizado por Rathod et al. (2012) (Rathod et al., 2012). Neste estudo foram avaliadas quatro bactérias, nomeadamente, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, sob ação de extratos etanólicos e aquosos de folhas e cascas de Neem (Rathod et al., 2012). No caso dos extratos de folhas de Neem, verificou-se que os extratos etanólicos eram os mais efetivos sobre os microrganismos testados, sendo que os resultados obtidos com extratos aquosos eram na sua maioria de menor efetividade (Rathod et al., 2012). Ao nível da concentração destaca-se o facto de os extratos aquosos em concentrações mais baixas (5 µg/ml) não serem efetivos contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. subtilis*, e ainda a alta atividade dos extratos etanólicos em concentrações mais elevadas (250 µg/ml). No caso dos extratos de casca, os resultados foram semelhantes, ou seja, os extratos aquosos foram menos efetivos que os etanólicos, tendo estes últimos a sua máxima ação em concentrações mais elevadas (Rathod et al., 2012).

Para além dos efeitos antibacterianos, os extratos de Neem têm sido descritos como tendo atividade sobre diversos tipos de fungos, nomeadamente do género *Trichophyton*, bem como alguma atividade antiviral, do qual é exemplo a exercida sobre o vírus da Dengue tipo 2 (Asif, 2012, Atawodi and Atawodi, 2009, Parida et al., 2002). Contrariamente aos resultados positivos obtidos sobre os microrganismos anteriormente referenciados, existem também descritos resultados negativos dos extratos obtidos a partir do Neem sobre a levedura *Candida albicans*; porém, o extrato de éter de petróleo do óleo de Neem contraria estes resultados uma vez que demonstrou atividade contra este microrganismo (Aarati et al., 2011, Ahmad and Beg, 2001, Grover et al., 2011, SaiRam et al., 2000).

No caso do óleo de Neem as informações sobre a sua atividade antimicrobiana e em particular a antibacteriana, são escassas; contudo, os estudos existentes sobre esta temática mostraram atividade antibacteriana sobre bactérias Gram+ e Gram-, bem como sobre estirpes bacterianas resistentes à estreptomomicina. Na **Tabela V**, encontram-se os principais resultados de alguns estudos realizados sobre a atividade antimicrobiana do óleo de Neem.

**Tabela V** – Resumo de artigos sobre atividade antimicrobiana do óleo de Neem.

Referência	Amostras	Microrganismos Avaliados	Resultados Relevantes	
Rao et al (1986)	Óleo	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. pyogenes</i> .	• <i>In vitro</i> , apresenta atividade positiva a uma concentração de 1.5-6.0% sobre os organismos <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. pyogenes</i> .	
Sairam et al (2000)	Extrato de éter de petróleo do óleo e óleo	<i>E. coli</i> ; <i>S. typhi</i> ; <i>S. dysenteroides</i> ; <i>P. vulgaris</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. faecalis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>C. albicans</i> .	• Extrato a 2 mg / ml, apresenta atividade positiva mais evidente do que o óleo. • Extrato tem atividade positiva contra <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> , bactérias sobre as quais o óleo de Neem não apresenta atividade, e sobre a levedura <i>C. albicans</i> .	
Jahan et al (2007)	Óleo	<i>S. aureus</i> ; <i>S. typhi</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> .	• Atividade positiva sobre as quatro bactérias testadas.	
Upadyay et al (2010)	Óleo	<i>E. coli</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>S. pneumoniae</i> .	• Atividade positiva sobre todas as bactérias testadas, destacando-se o <i>B. cereus</i> com halos de inibição médios de 45,63±0,23 mm.	
Asif (2012)	Óleo	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>S. typhimurium</i> ; <i>P. vulgaris</i> .	• Atividade positiva sobre as bactérias <i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> . Destacam-se os microrganismos <i>B. cereus</i> e <i>P. mirabilis</i> com atividade mais significativa. • Atividade negativa sobre a bactéria <i>P. vulgaris</i> .	
Oyinbo et al (2013)	Óleo com três concentrações diferentes: 5,10 e 15 mg/ml	<i>B. macerans</i> ; <i>B. lentus</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>S. aureus</i> .	• Atividade positiva sobre <i>S. marcescens</i> .	
			5 mg/ml	• Atividade negativa contra <i>B. lentus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. aureus</i> .
			10 mg/ml	• Atividade positiva sobre <i>S. marcescens</i> e <i>S. aureus</i> . • Atividade negativa sobre <i>B. lentus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. macerans</i> .
15 mg/ml	• Atividade positiva sobre <i>B. subtilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. macerans</i> . • Atividade negativa sobre <i>B. lentus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .			

Da análise da **Tabela V**, pode-se verificar que as bactérias mais descritas como sendo suscetíveis ao óleo de Neem e seus extratos são *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Asif, 2012, Jahan et al., 2007, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010). Por outro lado, é ainda de salientar que, dependendo da concentração de óleo de Neem testada, podem ocorrer variações quanto aos microrganismos suscetíveis ao óleo ou aos seus extratos (Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000). De entre as bactérias mais descritas como suscetíveis é de salientar os valores médios do halo de inibição alcançados pelo *B. cereus* ( $45,63 \pm 0,23$  mm) no estudo desenvolvido por Upadhyay et al. (2010) (Upadhyay et al., 2010).

Um facto que também merece destaque é a maior eficácia verificada por Sairam et al (2000) do extrato de éter de petróleo do óleo de Neem comparativamente ao óleo de Neem propriamente dito, sendo que se verificou que o extrato, *in vitro*, a 2 mg/ml, tinha uma atividade antimicrobiana mais forte do que o óleo, apresentando atividade sobre a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae*, bactérias sobre as quais o óleo de Neem não tinha apresentado atividade (SaiRam et al., 2000).

Apesar da existência de alguns estudos sobre atividade antimicrobiana do óleo de Neem, verifica-se que estes são em número reduzido e alguns já com alguns anos, tornando-se premente a necessidade da realização de estudos mais profundos sobre este produto, para que se percebam todas as suas potencialidades.



## **CAPÍTULO III – Material e Métodos**



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Amostras

Três óleos de Neem (*Azadirachta indica*) de proveniências diferentes, dois originários da Índia e um originário do Brasil foram sujeitos a análise (**Tabela VI**). Além disso, foram avaliadas três formulações comerciais (três cremes hidratantes da marca *Gluck Neem* da empresa *M&M Biotechnology*) que apresentavam na sua composição óleo de Neem (**Tabela VII**). Como referência e padrão de trabalho foi utilizado um padrão adquirido comercialmente (*E.I.D. - Parry (India) Limited*) de AZA (A+B), a qual apresentava um grau de pureza de 92,35%, e onde estavam presentes 70,33% de AZA-A e 22,02% de AZA-B.

**Tabela VI** – Identificação das amostras de óleo analisadas.

Identificação das amostras de óleo	Correspondência
Óleo 1	Óleo da Índia 1
Óleo 2	Óleo da Índia 2
Óleo 3	Óleo do Brasil

**Tabela VII** - Identificação das amostras de formulações comerciais utilizadas neste estudo.

Identificação das amostras de creme	Amostra	Correspondência
Creme hidratante B		Amostra 1
Creme hidratante C		Amostra 2
Creme hidratante P		Amostra 3

### 3.2. Preparação de solução *stock* de Azadiractina

Para a preparação da solução *stock* de AZA foi rigorosamente pesada uma determinada massa de padrão de AZA (A+B), a qual foi posteriormente dissolvida num volume rigoroso de ACN. Neste sentido, no caso da solução *stock* a utilizar na preparação de soluções-padrão, foram pesados 1,5 mg de padrão de AZA (A+B) e dissolvidos em 3 ml de ACN, obtendo-se uma solução com uma concentração final de 0,5 mg/ml. Por outro lado, no caso da solução *stock* utilizada para efetuar adição de padrão nas amostras em análise, foram pesados 7,0 mg de padrão de AZA (A+B) e dissolvidos em 7 ml de ACN, obtendo-se uma solução com uma concentração final de 1,0 mg/ml. A solução *stock*, independentemente do fim para o qual se destinava, foi alvo de filtração utilizando um filtro de seringa de *nylon* de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ , e armazenada a -20 °C.

### 3.3. Preparação de soluções-padrão de Azadiractina

As diferentes soluções-padrão de AZA, com concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{g/ml}$ , foram preparadas por diluição da solução *stock* de concentração 0,5 mg/ml em ACN, de acordo com os volumes indicados na **Tabela VIII**. Assim como a solução *stock*, estas soluções foram alvo de filtração utilizando um filtro de seringa de *nylon* de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$  e armazenadas a -20 °C.

**Tabela VIII** – Volumes utilizados na preparação das diferentes soluções-padrão de AZA.

Concentração AZA Padrão ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume total ( $\mu\text{l}$ )	Volume solução <i>stock</i> ( $\mu\text{l}$ )	Volume solvente (ACN) ( $\mu\text{l}$ )
5	1000	10	990
10	1000	20	980
25	1000	50	950
50	1000	100	900
100	1000	200	800
150	1000	300	700
200	1000	400	600
250	1000	500	500
300	1000	600	400

### **3.4. Preparação de amostras para análise cromatográfica**

Dadas as características inerentes às amostras em análise, estas necessitaram de ser alvo de alguns procedimentos extrativos de forma a tornarem-se aptas para análise cromatográfica por HPLC. Desta forma, em seguida descrevem-se os diferentes procedimentos adotados para as diversas amostras em estudo.

#### **3.4.1. Amostras de óleo de Neem**

Foram preparadas quatro amostras de cada um dos óleos em análise, sendo que em duas delas foi efetuada adição de padrão (ensaios de recuperação).

Para a preparação das diferentes amostras de óleo foi pesado rigorosamente cerca de 1 g de óleo, no caso do óleo 2, e 4,5 g de óleo, no caso dos óleos 1 e 3, para um tubo Falcon de 15 ml. Em seguida, adicionou-se 500 µl de ACN ou 500µl de solução *stock* de AZA 1,0 mg/ml, conforme se tratava de uma amostra sem adição de padrão ou com adição de padrão respetivamente. Cada mistura foi então sujeita a agitação com vortex à velocidade máxima durante 45 s.

Após a agitação descrita, foram adicionados à mistura 4ml de ACN, no caso do óleo 2, e 1 ml de ACN, no caso dos óleos 1 e 3, sendo de seguida a mistura alvo de agitação manual durante 2 min. Procedeu-se à centrifugação de cada mistura a 3700 rpm durante 10 minutos, após a qual se recolheu o sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo Falcon. Cada sobrenadante recolhido foi congelado (-20 °C) e armazenado durante um período mínimo de 24 h antes da análise por HPLC. Antes da sua injeção no HPLC, cada sobrenadante foi sujeito a filtração através de filtros de seringa de *nylon* de porosidade 0,2 µm, sendo de seguida alvo de uma diluição em ACN, 1:3 (óleo 1), 1:5 (óleo 2) ou 1:10 (óleo 3), após a qual as amostras foram sujeitas a análise cromatográfica.

### **3.5. Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC)**

#### **3.5.1. Equipamento**

Para a realização da análise por HPLC, foi utilizado o equipamento Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite equipado com uma bomba quaternária

HTA L-2130, série Lachrom Elite; desgaseificador de solventes por vácuo, em linha; injetor automático (autosampler) L-220, série LaChrom Elite; forno de colunas L-2300, série LaChrom Elite e detetor DAD (Diode Array Detector) L-2455, série LaChrom Elite. A recolha e tratamento dos dados cromatográficos obtidos foi efetuada através de *software* informático acoplado ao sistema cromatográfico que, neste caso, se tratava do *software* EZChrom Elite, série Lachrom Elite.

### **3.5.2. Condições cromatográficas**

Para deteção e análise das soluções-padrão de AZA (A+B) e das diferentes amostras foi adaptado o método de Ramesh et al (1999). Para este efeito, foi utilizada uma coluna LiChroCART® 250-4 (Merck) de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, com fase estacionária LiChrospher®, RP-18 constituída por partículas esféricas de 5µm de diâmetro. A temperatura da coluna foi mantida constante a 25 °C. A eluição foi do tipo isocrático, sendo a fase móvel constituída por uma mistura de água (H<sub>2</sub>O), acetonitrilo (ACN) e metanol (MetOH), numa proporção de 35MetOH:15ACN:50H<sub>2</sub>O, a um fluxo de 1,0 ml/min. Para os padrões e para as amostras o volume de injeção correspondeu a 20 µL. A deteção UV/DAD foi efetuada a um comprimento de onda de 215 nm. Cada corrida foi efetuada num tempo total de 20 min, no caso das soluções-padrão de AZA, e de 60 min no caso das amostras de óleo de Neem.

### **3.5.3. Validação do método analítico**

O procedimento de validação de um método analítico é crucial para que os resultados experimentais obtidos sejam os mais fiáveis possíveis. Neste sentido, este apresenta como objetivo primordial avaliar e demonstrar que o método que se pretende utilizar é o mais adequado para satisfazer os objetivos experimentais pretendidos (Chasin et al., 1998, Kazusaki et al., 2012, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

A metodologia de validação engloba a determinação de uma série de parâmetros analíticos definidos de acordo com a finalidade do método analítico (Chasin et al., 1998, Kazusaki et al., 2012, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). No presente caso está-se perante um método de doseamento pelo que parâmetros como a linearidade, limiares analíticos e precisão são fundamentais (Kazusaki et al., 2012). Porém outros

parâmetros podem ser realizados de forma a tornar o método o mais fiável possível (Kazusaki et al., 2012).

### 3.5.3.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico é definida como a capacidade de um método em induzir resultados linearmente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma gama de concentrações analíticas específicas (Chasin et al., 1998, Kazusaki et al., 2012, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Esta pode ser obtida através de processos de padronização interna ou externa, sendo, normalmente representada graficamente através de expressões matemáticas (Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010).

#### 3.5.3.1.1. Curva de calibração

A curva de calibração consiste em determinar a resposta de um equipamento a várias concentrações de analito conhecidas, ou seja, a correlação entre o sinal emitido pelo equipamento (área do pico) e as diferentes concentrações da substância alvo de quantificação (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

Esta relação é expressa normalmente através de uma equação de reta ( $y = ax + b$ ), designada vulgarmente de curva de calibração (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ribani et al., 2004, Ravichandran et al., 2010). Esta reta deverá ser definida no mínimo com cinco pontos, os quais não incluam o ponto zero da curva, ou seja, cinco concentrações diferentes de analito (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

Para além da equação da recta, através dos pontos da reta, é possível calcular o respetivo coeficiente de correlação, **R** (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Este é descrito como um indicador de avaliação da qualidade da curva de calibração obtida, sendo que para que esta seja considerada de boa qualidade, o valor do coeficiente de correlação deverá ser o mais próximo possível de 1 (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Este facto justifica-se dado que, quanto mais próximo o **R** for de 1, menor será a dispersão dos pontos, bem como a incerteza dos coeficientes de regressão (**a** e **b**) (Brito et al., 2003,

Chasin et al., 1998, Ribani et al., 2004, Ravichandran et al., 2010). Assim, caso se verifique um valor de **R** superior a 0,999, considera-se que existe um ajuste ideal dos dados à respetiva reta (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

No presente estudo, este parâmetro foi avaliado através da construção de uma curva de calibração para os compostos AZA-A, AZA-B e AZA-A+B, sendo analisadas para a construção das curvas as soluções-padrão preparadas a partir da solução *stock* com concentração 0,5 mg/ml de AZA, já anteriormente referenciadas (3.3. *Preparação das soluções-padrão de Azadiractina*).

### 3.5.3.1.2. Sensibilidade

A sensibilidade define-se como a capacidade de um método distinguir duas concentrações de analito com ordens de grandeza muito próximas (Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

O valor de sensibilidade é obtido a partir do coeficiente angular (**a**) da curva de calibração, ou seja o ângulo de inclinação ou declive da reta (Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Desta forma, verifica-se que quanto maior o valor do coeficiente angular, maior é a sensibilidade atribuída ao método analítico (Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Esta situação justifica-se pelo facto que, quanto maior for o declive da reta, ocorre uma maior variação do sinal (**y**) obtido em função de variações mínimas de concentração do analito (**x**) (Ribani et al., 2004, Ravichandran et al., 2010).

### 3.5.3.2. Limiares analíticos

Entre os parâmetros de validação de desempenho dos métodos analíticos são de extrema importância os que avaliam a capacidade dos mesmos para detetar e quantificar os analitos. De entre estes, salientam-se os limiares analíticos, mais especificamente o limite de deteção (**LD**) e o limite de quantificação (**LQ**).

O limite de deteção (**LD**) é definido como a menor concentração ou massa de analito que consegue ser detetada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Por outro lado, o limite de quantificação (**LQ**) é definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada por um método analítico com uma precisão e exatidão

aceitáveis (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

Estes parâmetros de validação podem ser determinados através de diferentes métodos, nomeadamente através do rácio sinal/ruído, do desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular, ou através de processos estatísticos (Brito et al., 2003, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). O método mais comum é através da determinação do rácio sinal/ruído.

A determinação do rácio sinal/ruído é realizada através da comparação dos resultados obtidos para amostras com concentrações conhecidas da substância em análise com os resultados obtidos para 10 medidas do branco (Brito et al., 2003, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Através desta comparação é possível estabelecer o mínimo de substância que pode ser detetada com fiabilidade (Brito et al., 2003, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Valores de rácio de 3 e 10 são valores normalmente aceites para a estimativa do **LD** e **LQ**, respetivamente (Brito et al., 2003, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). No presente caso, o **LD** e o **LQ** foram determinados segundo este método.

### **3.5.3.3. Precisão**

A precisão tem como função avaliar a proximidade entre as várias medições efetuadas para uma mesma amostra (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Este parâmetro é expresso através do desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (**CV**) de diversas medições, podendo ser avaliada em diversas condições, nomeadamente, repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). No presente estudo, a precisão foi avaliada em duas condições, repetibilidade e precisão intermédia.

#### **3.5.3.3.1. Repetibilidade**

A repetibilidade de um método analítico expressa a concordância entre os resultados obtidos, mantendo determinadas condições, nomeadamente, o procedimento experimental, condições do instrumento, o local de realização e repetições num curto intervalo de tempo (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Esta concordância é avaliada através do coeficiente de variação (**CV**) de uma série de réplicas consecutivas de uma mesma amostra (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran

et al., 2010, Ribani et al., 2004). Desta forma, apesar de não existirem valores tabelados, são considerados como aceitáveis valores inferiores a 10%, sendo que o método é considerado de elevada precisão se os valores se situarem abaixo de 5% (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

Este parâmetro pode ser avaliado da seguinte forma: no mínimo, seis determinações para uma única concentração em análise ou, no mínimo, nove determinações com três réplicas dentro do intervalo de três concentrações diferentes (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Neste caso, efetuaram-se seis determinações consecutivas de três níveis de concentração (10, 150 e 300 µg/ml AZA) no mesmo dia, no mesmo equipamento de análise e pelo mesmo operador, sendo posteriormente avaliado o coeficiente de variação (**CV**) das diferentes determinações para cada nível de concentração.

### **3.5.3.3.2. Precisão intermédia**

A precisão intermédia avalia a influência de variações na realização do método analítico, nomeadamente, diferentes dias, operadores, equipamentos ou combinação de várias alterações (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Este parâmetro tem como objetivo verificar que, num mesmo local de realização do método, os resultados não são influenciados por variações que possam ocorrer nesse local (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

O número de ensaios necessários para realizar este tipo de análise é igual ao recomendado para a repetibilidade, ou seja, no mínimo, seis determinações para uma única concentração em análise ou, no mínimo, nove determinações com três réplicas dentro do intervalo de três concentrações diferentes (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Porém, ao contrário do que se verifica com a repetibilidade em que as determinações são efetuadas sem ocorrerem variações nas condições do método analítico, neste caso devem ocorrer variações, sendo a mais comum a avaliação em dias diferentes, mantendo as restantes condições constantes (operadores, equipamento,...) (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

Este parâmetro pode ser expresso através da estimativa do coeficiente de variação (CV) das diferentes determinações efetuadas (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004). Desta forma, assim como o verificado com a repetibilidade, apesar de não existirem valores tabelados, são considerados como aceitáveis valores de coeficiente de variação inferiores a 10%, sendo que o método é considerado de elevada precisão se forem verificados valores abaixo de 5% (Brito et al., 2003, Chasin et al., 1998, Ravichandran et al., 2010, Ribani et al., 2004).

No presente estudo, para efetuar a avaliação da precisão intermédia foram realizadas três determinações, em dias diferentes, de três níveis de concentração (10, 150 e 300 µg/ml AZA), sendo posteriormente avaliado o CV para cada nível de concentração.

#### **3.5.3.4. Estabilidade**

Para que a partir do método analítico se obtenham resultados que possam ser considerados fiáveis e reprodutíveis, todos os intervenientes no mesmo, nomeadamente, padrões, amostras e reagentes, devem ser estáveis por um período considerável (Ribani et al., 2004). Dependendo da necessidade dos mesmos, este período é variável, podendo ser por exemplo de um dia, uma semana, um mês ou mesmo um período de tempo ainda maior (Ribani et al., 2004).

A estabilidade, tanto de padrões como das próprias amostras, é normalmente avaliada em dois parâmetros, tempo e temperatura (Ribani et al., 2004). A determinação da estabilidade torna-se essencial de forma a determinar o tempo pelo qual se pode armazenar o padrão ou as amostras sem que ocorra degradação dos mesmos (Ribani et al., 2004). No caso da temperatura, a avaliação da estabilidade permite determinar a forma correta de armazenamento e as condições de temperatura de análise, caso não existam descritas estas características (Ribani et al., 2004).

Dada a existência de informação sobre a estabilidade do padrão de AZA utilizado neste trabalho em termos de temperatura, apenas foi efetuada a avaliação da estabilidade em termos de tempo. Desta forma, no sentido de conhecer a estabilidade do padrão de AZA e as condições em que se verificava a sua degradação, uma solução-padrão de AZA concentração 150 µg/ml, foi avaliada no decorrer de dois meses, procedendo-se à sua análise no dia de preparação e um dia, uma semana, um mês e dois meses após a sua preparação.

### 3.5.3.5. Exatidão

A exatidão entende-se como a concordância verificada entre os resultados estimados a partir do método analítico em utilização e os valores considerados como referência (Brito et al., 2003, Ribani et al., 2004). Este parâmetro pode ser avaliado recorrendo a diferentes metodologias (Brito et al., 2003, Ribani et al., 2004). Uma dessas metodologias é a adição de padrão que é vulgarmente utilizada quando é impossível preparar uma amostra da matriz sem estar presente a substância em estudo (Freire et al., 2008, Ribani et al., 2004). Sendo esta a situação que se verifica no presente estudo, a metodologia da adição de padrão foi usada para a determinação da exatidão do método analítico.

Nesta metodologia, às amostras, que contêm a substância em análise mas em quantidades não conhecidas, são adicionadas quantidades pré-estabelecidas e conhecidas da substância em análise, em diferentes níveis de concentração, (pelo menos três níveis), antes do procedimento de extração das amostras que contêm a substância mas em quantidades não conhecidas (Freire et al., 2008, Ribani et al., 2004). Após a análise das diferentes amostras (com adição e sem adição de padrão), as quantidades obtidas após análise devem ser medidas em relação às quantidades adicionadas. Esta relação pode ser posteriormente definida através do cálculo da percentagem de recuperação utilizando a **equação (I)**. A percentagem de recuperação traduz o rendimento do método analítico, ou seja, a massa do analito presente na amostra após extração e análise instrumental (Ribani et al., 2004).

$$\% \text{ recuperação} = \frac{m_{\text{amostra+padrão}} - m_{\text{amostra}}}{m_{\text{padrão}}} \times 100 \quad \text{Equação (I)}$$

Os valores aceitáveis para a percentagem de recuperação são variáveis, dependendo do tipo de matriz em causa (Ribani et al., 2004). Neste sentido, alguns autores definem como um intervalo aceitável de percentagem de recuperação para análise de resíduos 80-120%±20% (Ribani et al., 2004, Tolosa et al., 1996). Por outro lado, no caso de matrizes complexas, alguns autores definem um intervalo diferente, nomeadamente 70-30%±15% (Ribani et al., 2004, Tolosa et al., 1996).

A exatidão do método utilizado neste trabalho foi determinada, como referido anteriormente, por meio de ensaios de adição de padrão, utilizando apenas um nível de

concentração (adição de 0,5 mg de padrão de AZA a cada amostra de óleo), dado o custo elevado da substância pura. Cada análise foi realizada em triplicado. Posteriormente, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação para cada uma das amostras de óleo em estudo.

### **3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem**

#### **3.6.1. Microrganismos e meios de cultura**

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras contendo óleo de Neem anteriormente referenciadas foram testadas diversas bactérias Gram- e Gram+. No que concerne às bactérias Gram-, foram utilizadas as seguintes estirpes: *Enterobacter aerogenes* (DSM 30053), *Escherichia coli* (DSM 1576), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (DSM 681), *Proteus mirabilis* (DSM 4479), *Proteus vulgaris* (DSM 2140), *Providencia rettgeri* (DSM 4542) e *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1128). Por outro lado, no que respeita às bactérias Gram+, foram testadas as seguintes estirpes: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (DSM 347), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Micrococcus luteus* (DSM 1790), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 346), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 1798) e *Streptococcus pyogenes* (DSM 11728). Todas as bactérias foram adquiridas sob a forma de cultura liofilizada à coleção de culturas alemã DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*), excetuando a bactéria *Bacillus cereus* que foi adquirida sob a mesma forma mas à coleção americana ATCC (*American Type Culture Collection*).

Para o crescimento dos vários microrganismos foram utilizados meios de cultura adequados aos organismos testados e aos ensaios realizados, nomeadamente, os meios de cultura sólidos *Nutrient Agar* (NA) e *Mueller-Hinton*, e o meio líquido *Nutrient Broth* (NB) (*Anexo I-Composição dos meios de cultura utilizados*). Os diversos meios de cultura foram reconstituídos de acordo com as indicações do fabricante e esterilizados por autoclavagem a 121 °C, durante 15 min. O meio de cultura *Nutrient Agar* foi preparado por adição de 1,75 % (m/v) de agar ao meio *Nutrient Broth*.

### **3.6.2. Crescimento e manutenção das culturas microbianas**

Após aquisição das culturas microbianas, que vinham acondicionadas em ampolas individualizadas, o primeiro passo consistiu na abertura das ampolas e reconstituição da cultura liofilizada através da adição de 0,5 ml de meio de cultura NB. Posteriormente, retirou-se 100 µl desta suspensão e inoculou-se duas placas de meio nutritivo NA. Em seguida, incubaram-se as culturas numa estufa, a 37 °C e durante o tempo adequado para cada uma das bactérias em estudo.

Após crescimento e verificação da pureza das culturas em meio sólido por análise da morfologia colonial e morfologia celular (coloração de Gram), as diferentes bactérias foram criopreservadas a -80 °C em tubos de congelamento de 2 ml com tampa roscada contendo meio NB com 15% (v/v) de glicerol (agente crioprotetor). Para isso, recolheu-se a biomassa das culturas em meio NA e ressuspendeu-se na mistura NB+15% glicerol até se obter uma suspensão concentrada de cada uma das bactérias em estudo. Foram preparados três tubos de congelamento para cada bactéria que foram subsequentemente armazenados numa câmara a -80 °C (culturas *stock*).

Sempre que necessário, procedeu-se ao descongelamento das bactérias retirando um pouco de cultura congelada para uma placa contendo meio NA. As placas inoculadas foram incubadas nas condições adequadas a cada organismo e utilizadas durante uma semana, período ao fim do qual as culturas foram repicadas para meio fresco.

### **3.6.3. Determinação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em poço**

Para a determinação da atividade de antimicrobiana do óleo de Neem e de formulações comerciais à base de óleo de Neem, bem como da AZA pura, foi utilizado o método de difusão em poço. No método de difusão em poço, ocorre remoção do meio de cultura sólido através do auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro que permite a obtenção de poços nos quais é possível a colocação das diferentes amostras.

Desta forma, o meio sólido *Muller-Hinton* previamente preparado foi uniformemente distribuído em placas de Petri, colocando-se em cada uma delas 25 ml de meio. Este procedimento foi realizado de modo a assegurar-se que a camada de meio presente em cada uma das placas apresentava uma profundidade uniforme e reproduzível entre elas.

A partir de culturas puras das diferentes estirpes bacterianas em estudo em meio NA, foram recolhidos inóculos de cada uma delas com o auxílio de ansas estéreis, sendo em seguida a biomassa de cada microrganismo ressuspensa em tubos contendo solução salina (0,85% NaCl m/V). Cada suspensão foi preparada de modo a obter-se um valor de absorvância a 610 nm de 0,2, ou seja, o correspondente a aproximadamente  $10^8$  UFC/ml.

Com uma zaragatoa estéril, a suspensão bacteriana previamente preparada foi distribuída pela superfície do meio sólido *Muller-Hinton* de cada uma das placas e deixada em repouso à temperatura ambiente durante algum tempo. Após este período de tempo, o meio sólido foi perfurado utilizando para o efeito pipetas de Pasteur de vidro estéreis de forma a obter-se poços com um diâmetro de cerca de 5mm. Em cada um dos poços foram introduzidos 100 µl de cada uma das amostras de óleo, cremes ou AZA pura. Como controlo positivo, foram utilizados discos impregnados com antibióticos (ATB) que estão descritos na literatura como tendo atividade antimicrobiana sobre as bactérias testadas (**Tabela IX**). O teste foi realizado em triplicado para cada um dos microrganismos em estudo. As diversas placas foram equilibradas à temperatura ambiente durante 15min, período ao fim do qual foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24-48 h. No caso dos organismos *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*, a incubação foi realizada em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela IX** – Antibióticos utilizados como controlo positivo para cada um dos microrganismos em estudo.

<b>Antibiótico</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Ampicilina 10µg</b>	<i>Escherichia coli</i> (DSM 1576)
	<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 2140)
	<i>Providencia rettgeri</i> (DSM 4542)
<b>Ciprofloxacina 5µg</b>	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (DSM 347)
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (DSM 30053)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (DSM 681),
	<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 4479)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 1128)
<b>Vancomicina 30µg</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 2570)
	<i>Micrococcus luteus</i> (DSM 1790)
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 346)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 1798)
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 11728)

O método de difusão em poço avalia a difusão das diferentes substâncias sob análise no meio sólido a partir de um poço. Assim, após 24 e 48h de incubação, foi efetuada a medição do halo de inibição (em mm) formado a partir de cada poço. Foram consideradas como possuidoras de atividade antimicrobiana as amostras que, quando aplicadas sobre o meio de cultura contendo as respectivas suspensões bacterianas, apresentavam um halo de inibição (uma zona mais clara em volta do poço) igual ou superior a 5 mm de diâmetro, ou seja, superior ao diâmetro do poço.

### **3.7. Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada através do software estatístico SPSS (versão 22.0 para Windows®) e do *software* Microsoft Excel (Microsoft Office 2013®).

No caso da análise cromatográfica foi realizado previamente um modelo de regressão linear para a solução-padrão de AZA, relacionando a área média dos picos de AZA obtidos por HPLC e a concentração de substância em cada solução-padrão. Tendo como base o modelo anterior, e de acordo com a área do pico obtido para cada uma das amostras, foi determinada a concentração e subsequentemente a massa de AZA presente em cada amostra teste (amostras de óleo de Neem). Todas as amostras e padrões foram analisados em triplicado, sendo calculado o desvio-padrão das determinações em cada um dos casos. Foram também calculados vários parâmetros de validação do método analítico utilizado, incluindo o declive, a ordenada na origem, o coeficiente de correlação (**R**), os limites de detecção (**LD**) e quantificação (**LQ**), a precisão e a exatidão, de modo a avaliar a qualidade do modelo em causa.

Por outro lado, no que respeita à análise estatística da atividade antimicrobiana foi efetuada uma análise descritiva dos resultados, tendo como base os valores dos halos de inibição (variável quantitativa). Assim, foram calculados os seguintes parâmetros: média e desvio-padrão. De forma a efetuar uma comparação entre as diferentes amostras, neste caso estamos perante 3 amostras emparelhadas, foram aplicados os seguintes testes: ANOVA ou Kruskal-Wallis, caso se tratasse de uma distribuição normal ou não, respetivamente. Após a verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das diferentes amostras, foram realizados testes estatísticos para verificar entre que amostras se verificavam essas diferenças. Para isso,

foram realizados testes de comparações múltiplas (*Tukey* no caso de grupos de dimensões iguais e homogeneidade de variâncias, *Gabriel* no caso de grupos de dimensões pouco diferentes e homogeneidade de variâncias, e *Games-Howel* no caso de grupos de dimensões diferentes e sem homogeneidade de variâncias).



## **CAPÍTULO IV – Resultados**



## 4. Resultados

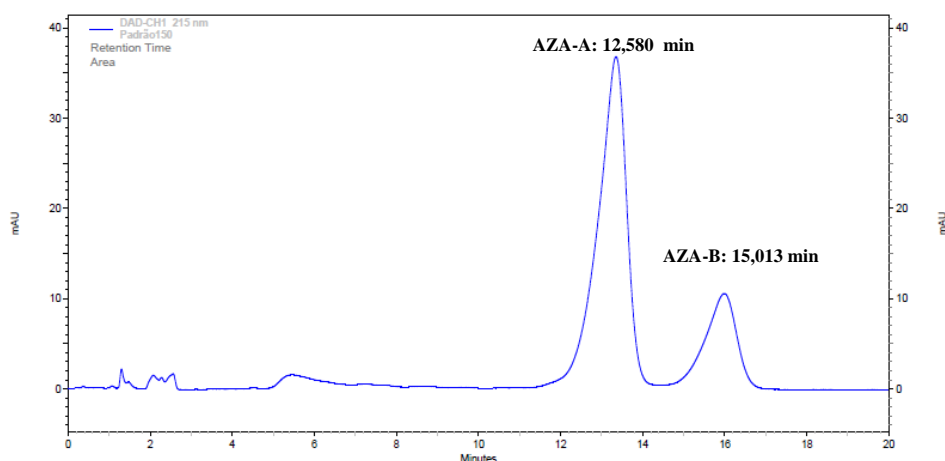
### 4.1. Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC)

#### 4.1.1. Validação do método analítico

##### 4.1.1.1. Linearidade

A linearidade do método analítico em causa foi avaliada através da construção de uma curva de calibração para a AZA. Dado que o padrão comercial não apresentava apenas AZA, ou seja, AZA-A, mas também *3-tigloylazadirachtol* (AZA-B), foi construída uma curva de calibração para cada um dos compostos e uma para o somatório dos dois compostos. Neste sentido, foram preparadas diferentes soluções-padrão de AZA a partir de diluições da solução *stock* de concentração 0,5 mg/ml, de acordo com os volumes indicados na **Tabela VIII**.

Na **Figura 7** pode observar-se um exemplo de um cromatograma obtido para a solução-padrão de AZA de concentração 150 µg/ml, onde se evidenciam os sinais cromatográficos relativos a cada composto em estudo, assim como os respetivos tempos de retenção.



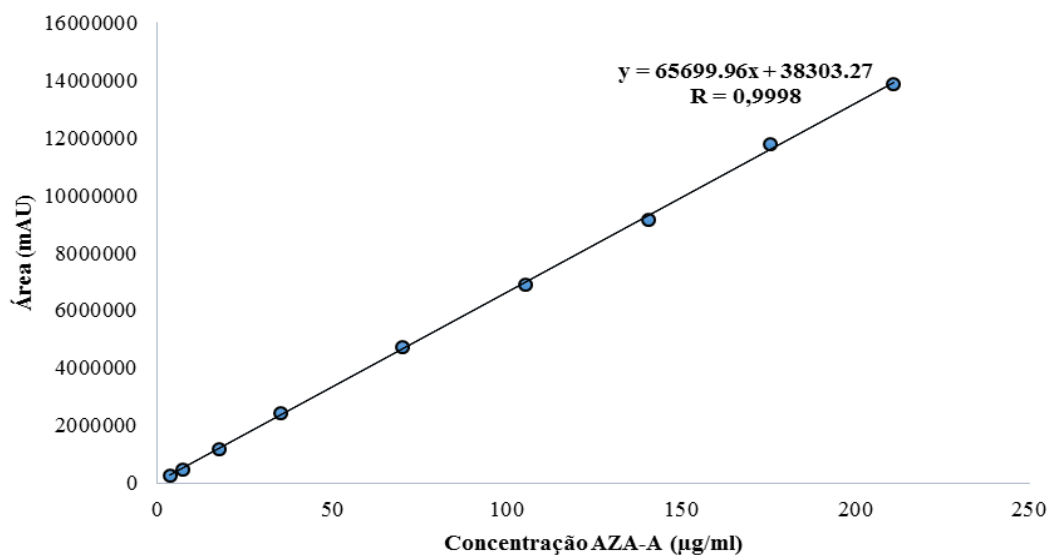
**Figura 7** – Resposta instrumental da solução-padrão de AZA de concentração 150 µg/ml com identificação dos sinais cromatográficos e tempos de retenção dos diferentes compostos em análise.

Os tempos de retenção foram de, aproximadamente, 12 min para o composto AZA-A e 15 min para o composto AZA-B. Na **Tabela X** encontram-se registados os valores médios de área dos compostos AZA-A, AZA-B e AZA-A+B obtidos após análise das diferentes soluções-padrão, assim como os respetivos desvios padrão e coeficientes de variação (**CV**).

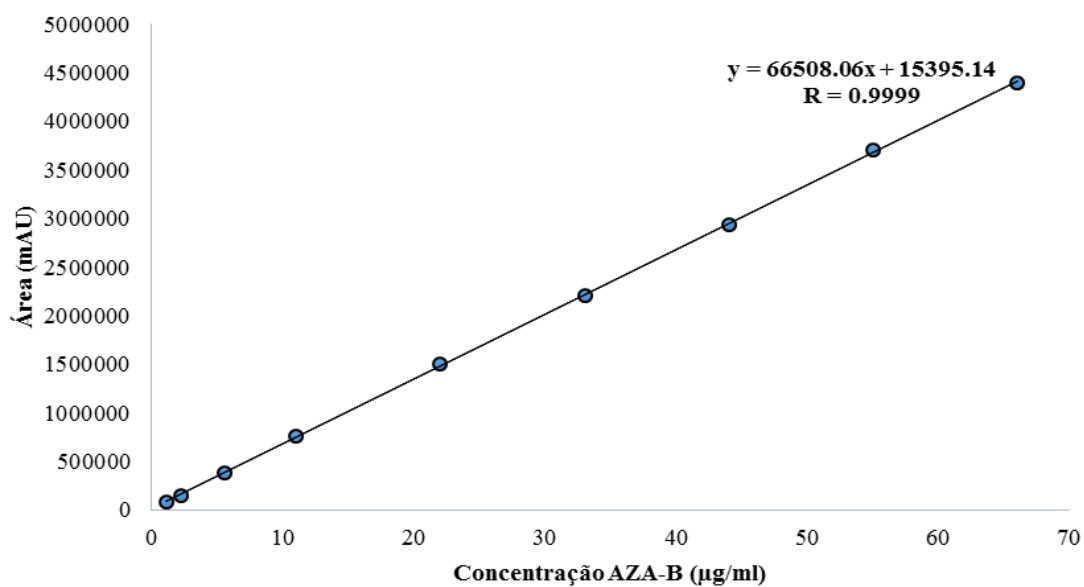
**Tabela X** - Valores médios de área, desvio padrão e coeficiente de variação (**CV**) determinados para os compostos Azadiractina-A, B e A+B nas diferentes soluções-padrão de AZA (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml).

Concentração Padrões de AZA (µg/ml)	5	10	25	50	100	150	200	250	300
<b>AZA-A</b>									
Concentração AZA-A (µg/ml)	3,52	7,03	17,58	35,16	70,33	105,49	140,66	175,82	210,99
Área Média (mAU)	249902,67	458677,33	1195605,67	2415586,00	4732632,33	6904374,67	9156074,67	11747442,00	13849826,67
Desvio-padrão	11494,97	1130,50	20963,71	3437,77	56868,07	54563,46	145180,60	7698,28	207416,33
CV (%)	4,60	0,25	1,75	0,14	1,20	0,79	1,59	0,83	1,50
<b>AZA-B</b>									
Concentração AZA-B (µg/ml)	1,10	2,20	5,50	11,01	22,02	33,03	44,04	55,05	66,06
Área Média (mAU)	78007,00	179612,33	380799,00	765499,67	1498824,00	2199387,67	2938171,33	3700059,33	4391327,67
Desvio-padrão	2644,21	796,50	6863,62	1826,97	5406,54	8090,69	792,31	13164,34	21694,91
CV (%)	3,39	0,53	1,80	0,24	0,36	0,36	0,03	0,36	0,49
<b>AZA-A + B</b>									
Concentração AZA-A+B (µg/ml)	4,62	9,23	23,09	46,17	92,35	138,52	184,70	230,09	277,05
Área Média (mAU)	314451,00	609731,00	1561256,00	3178755,00	6276819,00	9163420,00	12258417,00	15570631,00	18057325,00
Desvio-padrão	13248,74	1380,22	27766,71	4127,23	61626,08	51707,45	144547,82	106633,78	218614,15
CV (%)	4,21	0,26	1,78	0,13	0,98	0,56	1,18	0,68	1,21

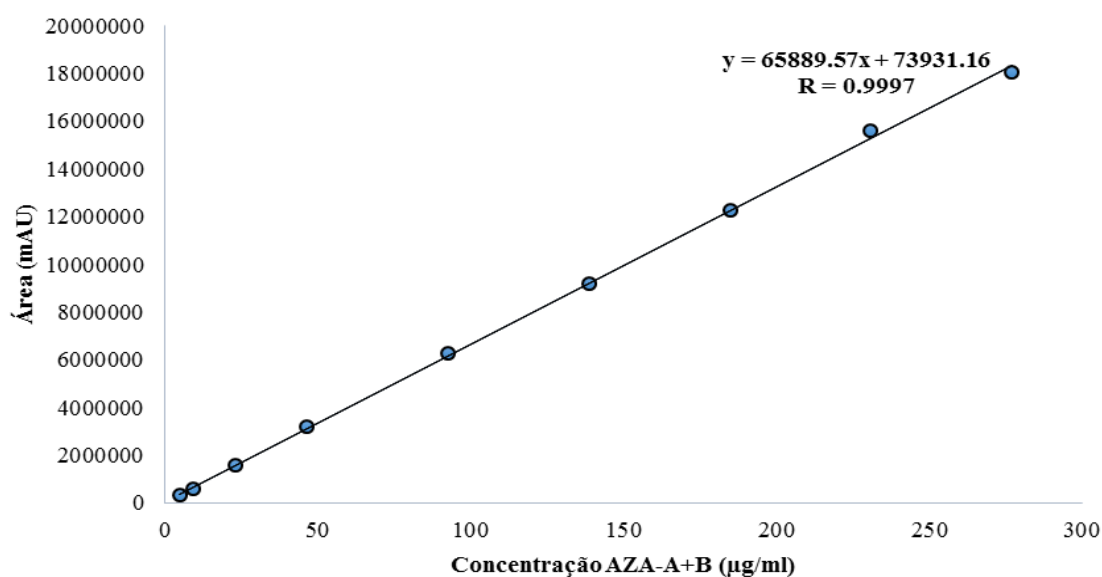
Nas **Figuras 8, 9 e 10** encontram-se as curvas de calibração, bem como as respetivas equações de reta e coeficientes de correlação (**R**) obtidas para os compostos AZA-A, AZA-B e AZA-A+B, tendo como base os valores apresentados na **Tabela X**.



**Figura 8** – Curva de Calibração do composto AZA–A com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R).



**Figura 9** – Curva de Calibração do composto AZA–B com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R).



**Figura 10** – Curva de Calibração dos compostos AZA–A+B com indicação da equação da reta e coeficiente de correlação (R).

Através da análise dos diferentes coeficientes de correlação (R), concluiu-se que estes se encontravam acima de 0,999 em todos os casos, pelo que as diferentes curvas de calibração foram consideradas de boa qualidade, bem como se verificou um ajuste ideal dos dados à respetiva curva.

Em termos de sensibilidade, observou-se que esta variava ligeiramente entre cada um dos compostos e o seu somatório. Neste sentido, verificou-se que os valores de sensibilidade eram, respetivamente, 65699,96; 66508,06 e 65889,57, para os compostos AZA-A, AZA-B e AZA-A+B.

#### 4.1.1.2. Limiares analíticos

Os limites de deteção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos diferentes compostos foram estimados a partir de 10 injeções de branco e da determinação do rácio sinal/ruído, tal como já referido anteriormente (secção 3.5.3.2.). A **Tabela XI** contém os limiares analíticos calculados para os compostos AZA-A e AZA-B.

Pela análise da **Tabela XI**, e observando os valores de concentração dos padrões mais baixos, é possível verificar que tanto os limites de deteção como de quantificação são inferiores aos valores de concentração do primeiro padrão para todos os compostos. Esta

situação encontra-se em conformidade com os requisitos para a determinação deste limiar analítico.

**Tabela XI** - Valores dos limiares analíticos (LD e LQ).

Composto	LD (µg/ml)	LQ (µg/ml)
AZA-A	0,40	0,71
AZA-B	0,23	0,53

#### 4.1.1.3. Precisão

A precisão do presente método analítico foi avaliada em dois parâmetros, nomeadamente, repetibilidade e precisão intermédia. Tal como já referido (secção 3.5.3.3.), a avaliação da repetibilidade e da precisão intermédia foi efetuada em padrões de AZA de 3 níveis de concentração diferentes (10, 150 e 300 µg/ml). Os resultados expressos pelo CV (%) obtidos para os dois parâmetros encontram-se presentes na **Tabela XII**.

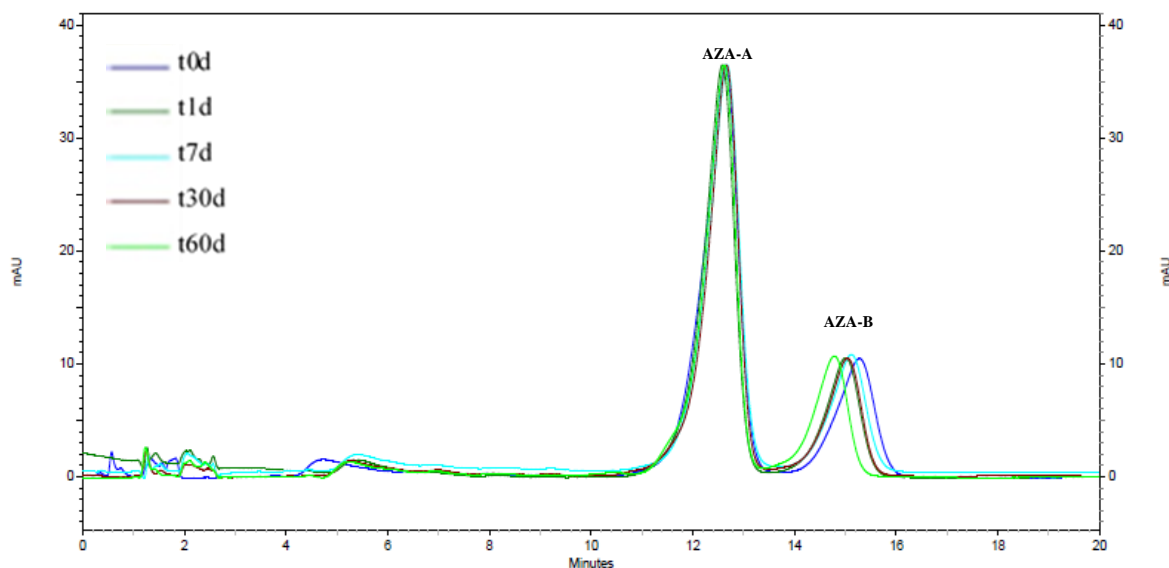
Da análise dos valores de CV (%) obtidos para a AZA-A, AZA-B e AZA-A+B, quer para a repetibilidade, quer para a precisão intermédia, verifica-se que estes apresentam sempre valores inferiores a 5%.

**Tabela XII** - Repetibilidade e precisão intermédia do método analítico para a AZA- A, AZA-B e AZA-A+B.

Concentração do Padrão de AZA (µg/ml)	Coeficiente de Variação (CV) %					
	Repetibilidade			Precisão Intermédia		
	AZA-A	AZA-B	AZA-A+B	AZA-A	AZA-B	AZA-A+B
10	3,54	1,84	2,77	2,63	4,17	1,71
150	1,23	0,65	1,02	0,93	1,07	0,79
300	1,34	0,39	1,11	1,38	3,77	1,68

#### 4.1.1.4. Estabilidade

A estabilidade da Azadiractina ao longo do tempo foi avaliada numa solução-padrão de concentração 150 µg/ml que foi analisada em diferentes períodos de tempo, mais especificamente, no dia da sua preparação e um dia, uma semana, um mês e dois meses após preparação. Os cromatogramas obtidos nos diferentes tempos de análise estão representados na **Figura 11**



**Figura 11** - Cromatogramas da solução-padrão de AZA com concentração 150 µg/ml representativos dos períodos de tempo utilizados para avaliação da estabilidade (t 0 dias - dia de preparação, t 1 dias, t 7 dias, t 30 dias e t 60 dias - um dia, uma semana, um mês e dois meses após a preparação).

Através da análise dos diferentes cromatogramas, é possível verificar que o padrão de AZA pura utilizado neste trabalho apresenta estabilidade uma vez que, mesmo após dois meses, o perfil cromatográfico mantém-se, pelo que se pode deduzir que a sua utilização no decorrer deste período oferece resultados confiáveis e reproduzíveis.

#### 4.1.1.5. Exatidão

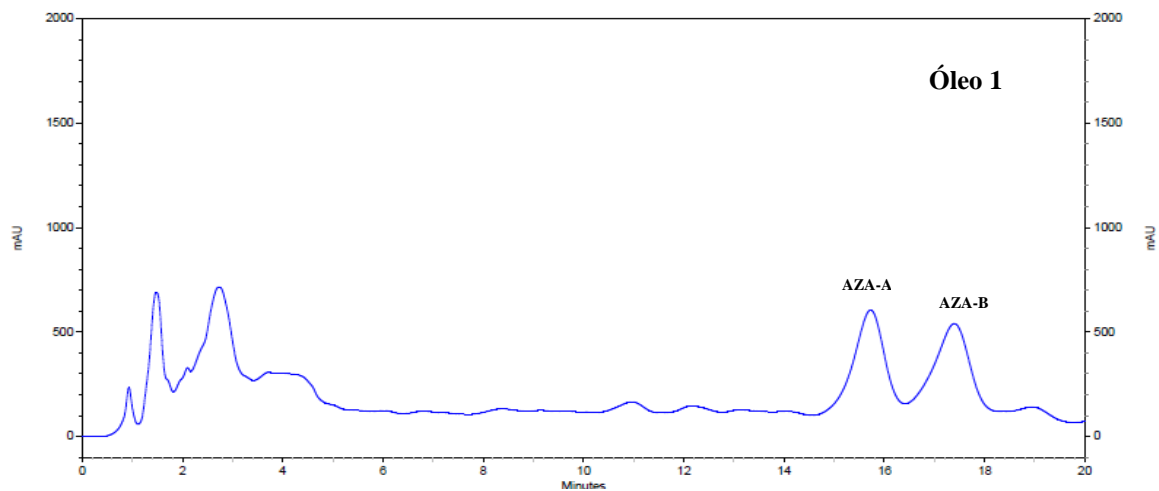
A exatidão, avaliada pela percentagem de recuperação, foi obtida através de ensaios de adição de padrão às amostras em estudo (óleo de Neem), utilizando apenas um nível de concentração, dado o custo elevado da substância pura. Os valores de percentagem de recuperação obtidos nas amostras de óleo de Neem encontram-se descritos na **Tabela XIII**. A percentagem de recuperação variou entre 70,91 e 106,64%, sendo que os valores alcançados se encontram dentro das especificações descritas para matrizes complexas (70-130%±20%) (Ribani et al., 2004, Tolosa et al., 1996).

**Tabela XIII** - Percentagens de recuperação médias dos compostos em estudo a partir de amostras de óleo de Neem suplementadas com AZA.

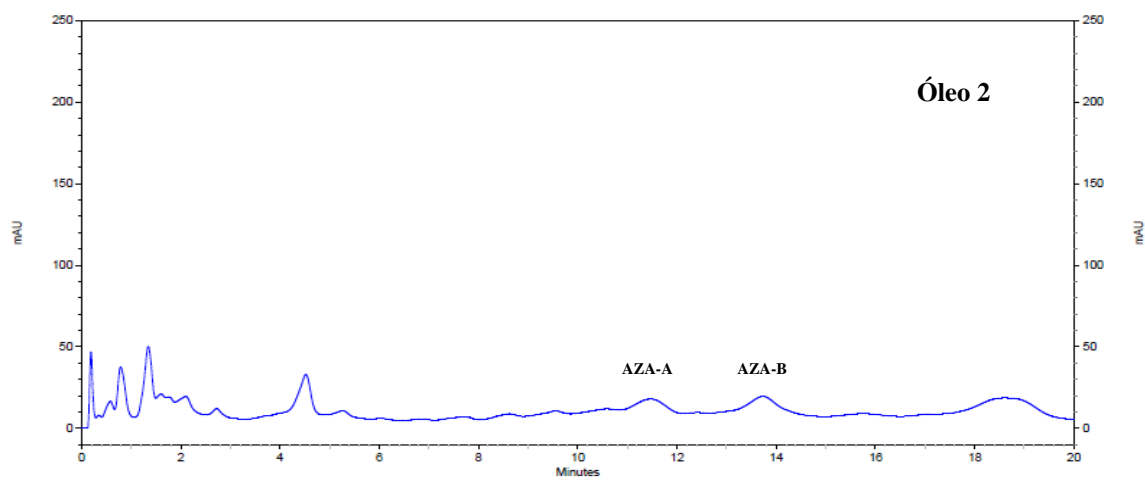
<b>Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Óleo 1</b>	<b>AZA-A</b>	90,87
	<b>AZA-B</b>	70,91
	<b>AZA-A+B</b>	86,07
<b>Óleo 2</b>	<b>AZA-A</b>	96,31
	<b>AZA - B</b>	106,64
	<b>AZA-A+B</b>	98,84
<b>Óleo 3</b>	<b>AZA-A</b>	75,77
	<b>AZA-B</b>	90,57
	<b>AZA-A+B</b>	79,37

#### 4.1.2. Teor de Azadiractina presente em amostras de óleo de Neem

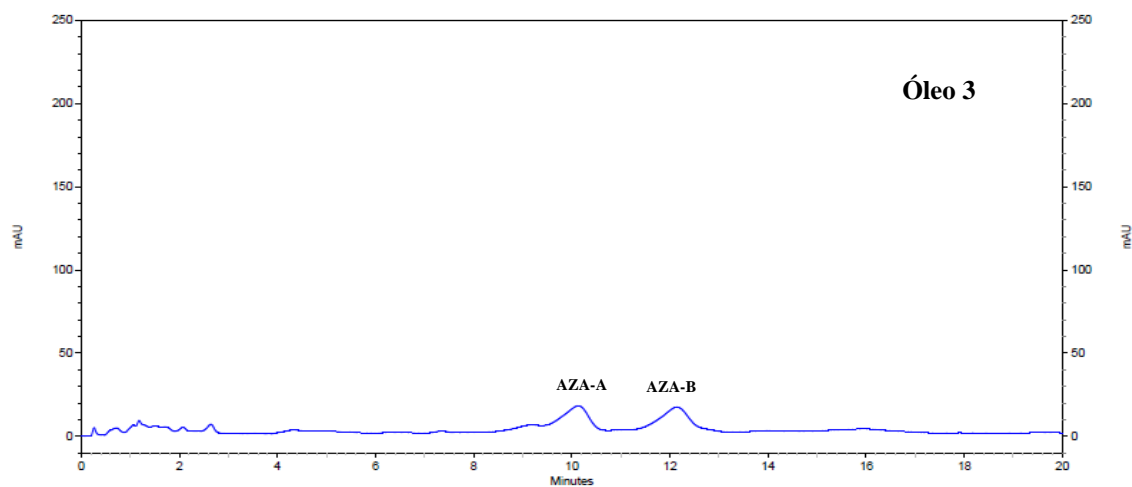
O método analítico alvo de validação foi aplicado na determinação do teor de AZA-A AZA-B em amostras de óleo de Neem. Nas **Figuras 12, 13 e 14** encontram-se exemplos de cromatogramas das amostras de óleo de Neem obtidos após extração e análise cromatográfica utilizando o método analítico validado. A identificação dos compostos nas amostras foi confirmada através da comparação com os tempos de retenção dos compostos numa solução-padrão analisada no mesmo dia, nas mesmas condições.



**Figura 12** – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem – Óleo 1.



**Figura 13** – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem - Óleo 2.



**Figura 14** – Cromatograma de uma amostra de óleo de Neem - Óleo 3.

Os teores dos diferentes compostos de AZA obtidos para cada amostra de óleo de Neem em estudo encontram-se apresentados na **Tabela XIV**

**Tabela XIV** – Teor de AZA-A, AZA-B e AZA-A+B em amostras de óleo de Neem.

Amostra	Teor do Composto (mg/kg amostra)		
	AZA-A	AZA-B	AZA-A+B
Óleo 1	92,01±7,00	12,52±0,22	104,20±6,76
Óleo 2	843,42±16,57	800,23±4,11	1642,17±12,35
Óleo 3	58,53±1,62	57,66±0,07	115,94±1,55

Os teores de AZA-A, AZA-B e AZA-A+B encontrados nas diferentes amostras de óleo de Neem variaram entre 58,53-843,42 mg/kg amostra para AZA-A, entre 12,52-800,23 mg/kg amostra para AZA-B e entre 104,20-1642,17 mg/kg amostra para AZA-A+B. Da análise dos teores de AZA-A, AZA-B e AZA-A+B nas diferentes amostras de óleo de Neem foi possível constatar que o óleo com maior teor destes compostos é o óleo 2. Por outro lado, quando se trata do óleo com menor teor destes compostos, este não pode ser atribuído a um único óleo uma vez que, no caso do teor de AZA-A, o óleo com valor mais reduzido é o óleo 3 mas, no caso do teor de AZA-B e AZA-A+B, os valores mais baixos verificam-se para o óleo 1.

## 4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem

### 4.2.1. Atividade antimicrobiana do óleo de Neem

As diferentes amostras de óleo de Neem em análise foram testadas contra diversos agentes potencialmente patogênicos de forma a avaliar a sua capacidade como agente antimicrobiano. A avaliação da atividade antimicrobiana foi efetuada através do teste de difusão em poço. Como controlo positivo foram utilizados discos impregnados com antibióticos para os quais os microrganismos em estudo eram sensíveis, tendo-se verificado valores médios de halos de inibição (**Tabela XV**) que estavam de acordo com os valores tabelados (CLSI, 2012).

**Tabela XV** – Halos de inibição médios obtidos após 24 e 48 h de incubação com os antibióticos utilizados como controlo positivo dos ensaios com amostras de óleo de Neem.\*

Bactéria	Antibiótico	Halo Médio (mm)±DP	
		24 h	48 h
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	Ciprofloxacina 5 µg	28,33 ± 1,21	29,50 ± 1,52
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (DSM 347)	Ciprofloxacina 5 µg	35,00 ± 0,00	37,20 ± 1,10
<i>Enterobacter aerogenes</i> (DSM 30053)	Ciprofloxacina 5 µg	32,33 ± 2,51	37,50 ± 2,10
<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 2570)	Vancomicina 30 µg	19,83 ± 0,41	20,17 ± 0,41
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1576)	Ampicilina 10 µg	19,00 ± 0,89	19,67 ± 1,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (DSM 681)	Ciprofloxacina 5 µg	35,50 ± 3,21	37,83 ± 2,23
<i>Micrococcus luteus</i> (DSM 1790)	Vancomicina 30 µg	27,17 ± 0,98	27,50 ± 0,55
<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 4479)	Ciprofloxacina 5 µg	32,40 ± 2,51	34,00 ± 2,24
<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 2140)	Ampicilina 10 µg	21,00 ± 0,63	21,33 ± 0,52
<i>Providencia rettgeri</i> (DSM 4542)	Ampicilina 10 µg	21,16 ± 1,94	23,67 ± 1,63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 1128)	Ciprofloxacina 5 µg	32,00 ± 2,45	33,33 ± 2,07
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 346)	Vancomicina 30 µg	19,00 ± 1,55	19,17 ± 1,33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 1798)	Vancomicina 30 µg	20,17 ± 0,41	20,67 ± 0,82
<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 11728)	Vancomicina 30 µg	25,17 ± 0,41	25,67 ± 1,03

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respetivamente.

DP – Desvio-padrão

No que respeita aos resultados obtidos para as amostras de óleo de Neem (**Tabela XVI e Figuras 15 e 16**), verificou-se que os três óleos apresentavam algum tipo de atividade sobre todos os microrganismos em estudo.

**Tabela XVI** - Halos de inibição médios obtidos com as diferentes amostras de óleo de Neem após 24 e 48 h de incubação.\*

Bactéria	Óleo 1		Óleo 2		Óleo 3	
	Halo de Inibição		Halo de Inibição		Halo de Inibição	
	(mm) ± DP		(mm) ± DP		(mm) ± DP	
	24 h	48 h	24 h	24 h	48 h	24 h
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778) <sup>b,d</sup>	12,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	14,75 ± 0,50	12,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	14,75 ± 0,50
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (DSM 347) <sup>a,d</sup>	11,83 ± 0,98	13,50 ± 1,22	14,83 ± 0,41	11,83 ± 0,98	13,50 ± 1,22	14,83 ± 0,41
<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> (DSM 30053) <sup>b,c</sup>	11,83 ± 0,98	14,83 ± 1,47	11,83 ± 1,17	11,83 ± 0,98	14,83 ± 1,47	11,83 ± 1,17
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (DSM 2570) <sup>a,c</sup>	13,17 ± 1,17	14,17 ± 1,17	15,00 ± 0,63	13,17 ± 1,17	14,17 ± 1,17	15,00 ± 0,63
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1576) <sup>a,c</sup>	10,67 ± 1,03	14,33 ± 0,82	11,83 ± 0,75	10,67 ± 1,03	14,33 ± 0,82	11,83 ± 0,75
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (DSM 681) <sup>a,c</sup>	12,50 ± 0,58	14,00 ± 0,82	11,75 ± 0,50	12,50 ± 0,58	14,00 ± 0,82	11,75 ± 0,50
<i>Micrococcus luteus</i> (DSM 1790) <sup>a,c</sup>	12,67 ± 0,52	12,67 ± 0,52	13,00 ± 0,00	12,67 ± 0,52	12,67 ± 0,52	13,00 ± 0,00
<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 4479) <sup>a,c</sup>	10,75 ± 0,96	16,75 ± 0,50	15,50 ± 0,55	10,75 ± 0,96	16,75 ± 0,50	15,50 ± 0,55
<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 2140) <sup>a,c</sup>	11,67 ± 1,03	13,33 ± 0,52	15,00 ± 0,00	11,67 ± 1,03	13,33 ± 0,52	15,00 ± 0,00
<i>Providencia rettgeri</i> (DSM 4542) <sup>a,c</sup>	11,17 ± 0,98	15,17 ± 1,33	12,33 ± 0,52	11,17 ± 0,98	15,17 ± 1,33	12,33 ± 0,52
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (DSM 1128) <sup>a,d</sup>	10,00 ± 0,00	14,17 ± 0,41	12,00 ± 1,00	10,00 ± 0,00	14,17 ± 0,41	12,00 ± 1,00
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 346) <sup>a,d</sup>	10,75 ± 0,50	13,00 ± 1,15	10,75 ± 0,50	10,75 ± 0,50	13,00 ± 1,15	10,75 ± 0,50
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> (DSM 1798) <sup>a,c</sup>	11,83 ± 0,41	13,33 ± 0,52	13,83 ± 0,75	11,83 ± 0,41	13,33 ± 0,52	13,83 ± 0,75
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> (DSM 11728) <sup>a,c</sup>	16,83 ± 1,17	17,67 ± 0,52	13,00 ± 0,63	16,83 ± 1,17	17,67 ± 0,52	13,00 ± 0,63

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respetivamente.

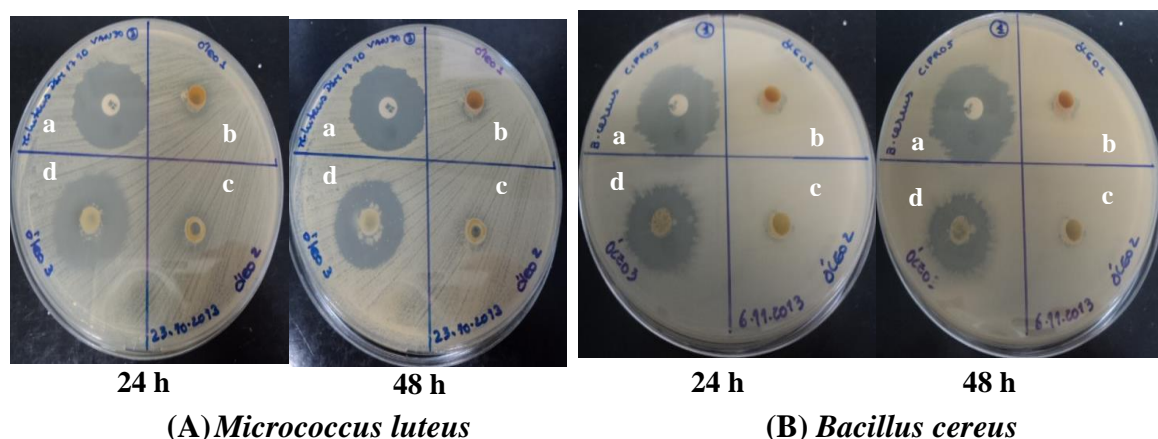
DP – Desvio-padrão

<sup>a</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição é estatisticamente diferente dos restantes às 24 h ( $p < 0,05$ ).

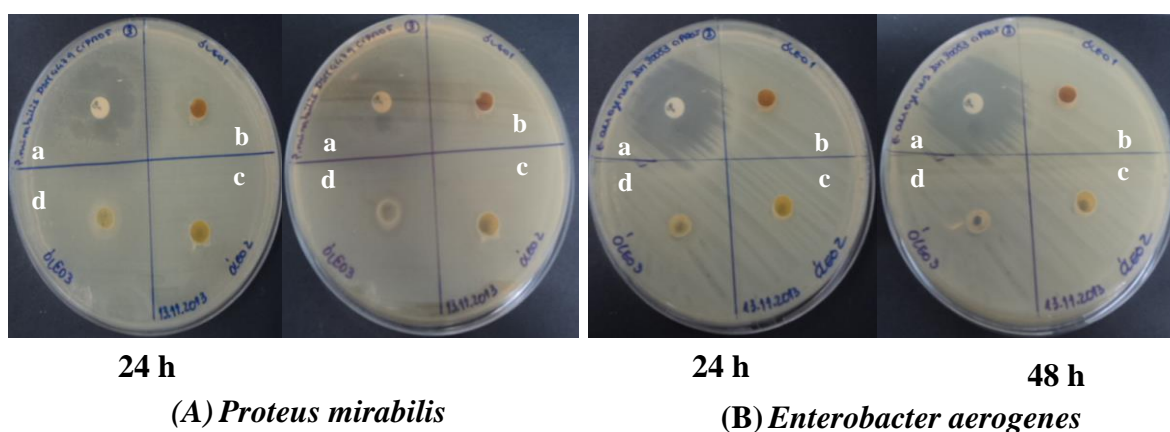
<sup>b</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição não é estatisticamente diferente dos restantes às 24 h ( $p > 0,05$ ).

<sup>c</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição é estatisticamente diferente dos restantes às 48 h ( $p < 0,05$ ).

<sup>d</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição não é estatisticamente diferente dos restantes às 48 h ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15** - Perfil de atividade antimicrobiana dos diferentes óleos de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram+: *Micrococcus luteus* (A) e *Bacillus cereus* (B). Método de difusão em poço. a) ATB, b) óleo 1, c) óleo 2 e d) óleo 3.



**Figura 16** - Perfil de atividade antimicrobiana dos diferentes óleos de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram-: *Proteus mirabilis* (A) e *Enterobacter aerogenes* (B). Método de difusão em poço. a) ATB, b) óleo 1, c) óleo 2 e d) óleo 3.

No que respeita ao óleo 1, os valores médios dos halos de inibição obtidos para as diferentes bactérias em estudo foram extremamente próximos entre eles. Porém, de entre as 14 estirpes bacterianas testadas, a bactéria *S. pyogenes* destacou-se apresentando os maiores valores médios de halo de inibição com o óleo 1, mais especificamente, valores de  $16,83 \pm 1,17$  mm às 24 h e  $17,67 \pm 0,52$  mm às 48 h de incubação. No extremo oposto, encontram-se as bactérias *P.aeruginosa* ( $10,00 \pm 0,00$  mm) e *B.cereus* ( $12,00 \pm 0,00$  mm), que apresentaram os valores mais baixos de halos de inibição às 24 e às 48 h, respetivamente.

Os valores médios dos halos de inibição obtidos com o óleo 2 foram, na sua generalidade, ligeiramente superiores aos verificados com o óleo 1. Neste sentido, verificou-se que as bactérias que apresentavam os valores mais elevados às 24 e às 48 h eram, respetivamente, o organismo *P. mirabilis* ( $15,50 \pm 0,55$  mm) e o organismo *P. vulgaris* ( $18,80 \pm 1,64$  mm). Por outro lado, as bactérias *S. aureus* ( $10,75 \pm 0,50$  mm) e *K. pneumoniae* ( $12,00 \pm 0,82$  mm) apresentaram os valores mais baixos às 24 e às 48 h, respetivamente.

Analisando os valores médios dos halos de inibição obtidos após 24 e 48 h de incubação, pôde constatar-se que o óleo 3 tendia a apresentar valores mais elevados comparativamente aos obtidos com os óleos 1 e 2 sobre a maioria dos microrganismos. Em termos de valores mais elevados de halos de inibição com o óleo 3, estes foram verificados para a bactéria *S. pyogenes*, com valores de  $28,75 \pm 1,50$  mm às 24 h e  $30,00 \pm 2,16$  mm às 48 h. No extremo oposto, *E. aerogenes* foi a bactéria para a qual se verificaram os valores de inibição mais baixos,  $13,50 \pm 1,30$  mm às 24 h e  $14,25 \pm 0,96$  mm às 48 h.

Na maioria dos casos, verificou-se um aumento do halo de inibição médio para os três óleos entre as 24 e as 48 h, mesmo que em alguns casos o aumento tenha sido mínimo. No entanto, é importante salientar, no caso do óleo 1, o aumento verificado para a bactéria *Proteus mirabilis*, que às 24 h apresentava um halo de inibição médio de  $10,75 \pm 0,96$  mm e às 48 h apresentava um valor de  $16,75 \pm 0,50$  mm. Para além deste caso, destacam-se os aumentos verificados para a bactéria *E. coli* nos ensaios com os três óleos. No caso do óleo 1, a bactéria *E. coli* apresentava às 24 h valores médios de halo de inibição de  $10,67 \pm 1,03$  mm aumentando para valores de  $14,33 \pm 0,82$  mm às 48 h. No caso do óleo 2, a bactéria *E. coli* apresentava às 24 h valores médios de  $11,83 \pm 0,75$  mm passando para valores de  $16,17 \pm 0,98$  mm às 48 h. Por outro lado, no caso do óleo 3, a mesma bactéria apresentava valores médios de  $16,20 \pm 1,30$  mm que aumentaram às 48 h para valores de  $23,80 \pm 1,30$  mm.

De forma a verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos halos de inibição obtidos para cada microrganismo com os diferentes óleos, foi realizada uma análise estatística (**Tabela XVI, a-d**).

Da análise realizada, verificou-se que apenas no caso da estirpe *E. aerogenes* os valores médios de halo de inibição obtidos para os três óleos não apresentaram diferenças

estatisticamente significativas entre si ( $p>0,05$ ), tanto às 24 h como às 48 h (**Tabela XVI**). No que concerne aos valores obtidos para cada uma das restantes bactérias, pelo menos um valor obtido para um dos óleos foi estatisticamente diferente ( $p<0,05$ ) dos valores dos restantes óleos, em ambos os tempos de incubação (**Tabela XVI**).

De forma a avaliar entre que valores se verificavam estas diferenças, foram realizados testes estatísticos de comparações múltiplas, onde os valores médios dos halos de inibição obtidos com cada óleo em cada bactéria foram comparados entre si (**Tabela XVII**).

**Tabela XVII** – Comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com os diferentes óleos para cada bactéria, através de testes estatísticos de comparações múltiplas.\*

Bactéria	Comparações Múltiplas ( $p$ ) *					
	Óleo 1/Óleo 2		Óleo 1/Óleo 3		Óleo 2/Óleo 3	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>B. cereus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>B. subtilis</i>	0,001	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>E. aerogenes</i>	<sub>a</sub>	<sub>a</sub>	<sub>a</sub>	<sub>a</sub>	<sub>a</sub>	<sub>a</sub>
<i>E. faecalis</i>	0,020	0,173	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>E. coli</i>	0,190	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>K. pneumoniae</i>	0,203	0,015	0,003	0,001	0,001	0,000
<i>M. luteus</i>	0,335	0,335	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P. mirabilis</i>	0,000	0,496	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P. vulgaris</i>	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P. rettgeri</i>	0,079	0,708	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	0,024	0,026	0,000	0,001	0,006	0,011
<i>S. aureus</i>	1,000	0,937	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>S. epidermidis</i>	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>S. pyogenes</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respetivamente.

<sub>a</sub> bactérias para as quais não foi aplicada a presente análise estatística, dado não terem apresentado diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre os valores obtidos com os diferentes cremes às 24 ou 48 h, nos testes estatísticos anteriores (**Tabela XVI, b e d**).

# diferenças estatisticamente significativas se  $p<0,05$ .

Analisando os resultados obtidos, e comparando os valores obtidos com o óleo 1 ou óleo 2 com os obtidos com óleo 3, constatou-se um desempenho mais elevado do óleo 3, comparativamente aos dois óleos restantes, em todas as bactérias testadas. De facto, verificou-se que, para todas as bactérias testadas, existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores do óleo 1 ou óleo 2 e os do óleo 3.

Por outro lado, quando se compararam os valores médios de halo de inibição obtidos com o óleo 1 e o óleo 2, estes dois não se distinguiram de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em algumas das bactérias em estudo (**Tabela XVII**). Após 24 h de incubação, os valores obtidos com o óleo 1 e 2 não eram estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) nas seguintes bactérias: *E. coli* ( $p = 0,190$ ), *K. pneumoniae* ( $p = 0,203$ ), *M. luteus* ( $p = 0,335$ ), *P. rettgeri* ( $p = 0,079$ ), *S. aureus* ( $p = 1,000$ ). Após 48 h de incubação, a situação anteriormente referida manteve-se em algumas das bactérias, ou seja, ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores de inibição do óleo 1 e óleo 2, no caso das estirpes *M. luteus* ( $p = 0,335$ ), *P. rettgeri* ( $p = 0,708$ ) e *S. aureus* ( $p = 0,937$ ). É ainda importante referir que em alguns casos, apesar de às 24 h não se verificarem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), após 48 h de incubação os resultados obtidos com o óleo 1 e o óleo 2 passaram a ser estatisticamente diferentes. Este facto observado nas estirpes *E. coli* ( $p = 0,015$ ) e *K. pneumoniae* ( $p = 0,015$ ). Porém, a situação inversa também se verificou, ou seja, em alguns casos as diferenças de valores entre o óleo 1 e óleo 2 deixaram de ser estatisticamente significativas após 48 h de incubação, como foi o caso das estirpes *E. faecalis* ( $p = 0,173$ ) e *P. mirabilis* ( $p = 0,496$ ).

Uma análise estatística semelhante à anteriormente descrita foi realizada, mas desta vez, para comparar os valores médios de halo de inibição obtidos para os diferentes microrganismos utilizando o mesmo óleo (dados não apresentados).

No caso do óleo 1, o valor médio alcançado por este óleo sobre a bactéria *S. pyogenes* após 24 h foi significativamente mais elevado ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores médios de halo de inibição obtidos com este óleo sobre as restantes 13 bactérias em estudo. A situação manteve-se às 48 h de incubação, porém, apenas em relação aos resultados deste óleo sobre 10 das restantes 13 bactérias em estudo, dado que com em relação as restantes 3 bactérias apresentou valores semelhantes. Ainda relativamente aos valores observados com o óleo 1 após 48 h, é de salientar o valor alcançado sobre a bactéria *P. mirabilis* que, a seguir ao valor obtido sobre a bactéria *S. pyogenes*, se apresentou como o segundo valor de

inibição significativamente mais elevado ( $p < 0,05$ ) em relação a 9 das restantes 13 bactérias, e sendo semelhante ao obtido com as outras 4 bactérias, situação que não se verificava após 24 h de incubação.

Em relação ao óleo 2, os valores médios alcançados por este óleo sobre as bactérias *P. mirabilis* e *S. aureus* após 24 h foram significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) que os valores médios de inibição observados sobre as restantes 13 bactérias em estudo. Esta constatação não se manteve às 48 h, sendo que neste caso os valores médios alcançados pelo óleo 2 sobre as bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus* foram significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores médios de halo de inibição observados para 8 das restantes 13 bactérias em estudo e semelhantes em relação aos obtidos com as outras 5 delas

No que se refere ao óleo 3, os valores médios de halo de inibição detetados com este óleo sobre as bactérias *M. luteus* e *S. pyogenes* após 24 h foram significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) relativamente aos valores de inibição alcançados sobre as restantes 13 bactérias em estudo, nomeadamente em relação aos valores de 11 delas, dado que em relação as outras duas bactérias apresentou valores semelhantes. Por outro lado, às 48 h, o valor médio de halo de inibição obtido com o óleo 3 sobre a estirpe *E. aerogenes* foi significativamente mais baixo ( $p < 0,05$ ) que os valores médios de halo de inibição observados sobre as restantes 13 bactérias em estudo, especialmente sobre 12 delas, uma vez que com a bactéria restante apresentou valores semelhantes.

#### **4.2.2. Atividade antimicrobiana de formulações comerciais contendo óleo de Neem**

As diferentes amostras de formulações comerciais contendo óleo de Neem foram, à semelhança das amostras de óleo de Neem, testadas contra diversos microrganismos de forma a avaliar a sua atividade antimicrobiana, utilizando-se para este efeito o teste de difusão em poço. A exemplo do referido anteriormente (secção 4.2.1), utilizaram-se como controlo positivo antibióticos para os quais os microrganismos em estudo eram sensíveis, verificando-se valores médios de halos de inibição médios (**Tabela XVIII**) que estavam de acordo com os valores tabelados (CLSI, 2012).

**Tabela XVIII** – Halos de inibição médios obtidos após 24 e 48 h de incubação com os antibióticos utilizados como controlo positivo dos ensaios com formulações comerciais contendo óleo de Neem.\*

Bactéria	Antibiótico	Halo Médio (mm)±DP	
		24 h	48 h
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	Ciprofloxacina 5 µg	26,67 ± 1,03	27,67 ± 1,21
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (DSM 347)	Ciprofloxacina 5 µg	34,00 ± 0,63	41,33 ± 0,82
<i>Enterobacter aerogenes</i> (DSM 30053)	Ciprofloxacina 5 µg	29,50 ± 2,12	35,00 ± 3,16
<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 2570)	Vancomicina 30 µg	18,17 ± 0,41	19,83 ± 0,98
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1576)	Ampicilina 10 µg	19,00 ± 1,26	19,67 ± 0,52
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (DSM 681)	Ciprofloxacina 5 µg	33,33 ± 2,58	34,00 ± 3,22
<i>Micrococcus luteus</i> (DSM 1790)	Vancomicina 30 µg	26,67 ± 0,52	27,33 ± 0,82
<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 4479)	Ciprofloxacina 5 µg	39,20 ± 1,10	41,40 ± 3,13
<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 2140)	Ampicilina 10 µg	23,17 ± 0,41	24,00 ± 0,63
<i>Providencia rettgeri</i> (DSM 4542)	Ampicilina 10 µg	25,00 ± 0,89	25,67 ± 0,82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 1128)	Ciprofloxacina 5 µg	32,33 ± 2,25	39,33 ± 3,50
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 346)	Vancomicina 30 µg	20,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 1798)	Vancomicina 30 µg	19,83 ± 0,98	20,17 ± 0,41
<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 11728)	Vancomicina 30 µg	25,50 ± 0,89	26,00 ± 0,89

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respetivamente.

DP – Desvio-padrão

No que respeita aos resultados obtidos para as amostras de formulações comerciais contendo óleo de Neem (**Tabela XIX e Figuras 17 e 18**), verificou-se que as três amostras apresentavam algum tipo de atividade sobre os microrganismos em estudo.

**Tabela XIX-** Halos de inibição médios obtidos com as diferentes amostras de formulações comerciais contendo óleo de Neem após 24 e 48 h de incubação.\*

Bactéria	Creme B Halo Médio (mm)±DP		Creme C Halo Médio (mm)±DP		Creme P Halo Médio (mm)±DP	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778) <sup>b,d</sup>	17,67 ± 0,52	17,83 ± 0,41	16,67 ± 1,51	17,33 ± 0,82	17,83 ± 0,41	18,00 ± 0,63
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (DSM 347) <sup>a,d</sup>	16,50 ± 1,05	20,50 ± 1,05	18,83 ± 0,98	20,33 ± 0,82	18,67 ± 1,03	20,50 ± 1,76
<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> (DSM 30053) <sup>b,c</sup>	15,00 ± 1,41	15,75 ± 0,96	15,25 ± 0,50	19,25 ± 1,51	14,20 ± 1,30	19,80 ± 1,10
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (DSM 2570) <sup>a,c</sup>	12,00 ± 0,63	12,67 ± 0,52	12,83 ± 0,41	14,50 ± 1,05	16,00 ± 1,09	16,17 ± 0,98
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1576) <sup>a,c</sup>	11,00 ± 0,89	13,83 ± 0,41	13,00 ± 0,00	14,83 ± 0,41	11,50 ± 1,05	15,83 ± 0,75
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (DSM 681) <sup>a,c</sup>	17,00 ± 0,63	17,83 ± 1,47	15,60 ± 0,89	15,80 ± 1,30	19,25 ± 0,96	20,25 ± 1,26
<i>Micrococcus luteus</i> (DSM 1790) <sup>a,c</sup>	12,80 ± 0,84	12,80 ± 0,84	16,50 ± 0,55	16,50 ± 0,55	18,20 ± 1,09	18,20 ± 1,09
<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 4479) <sup>a,c</sup>	15,00 ± 1,00	15,80 ± 1,30	18,40 ± 0,89	19,20 ± 0,84	15,50 ± 1,29	18,25 ± 1,26
<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 2140) <sup>a,c</sup>	16,33 ± 1,03	16,67 ± 0,82	19,60 ± 0,89	19,60 ± 0,89	18,83 ± 1,60	19,50 ± 0,82
<i>Providencia rettgeri</i> (DSM 4542) <sup>a,c</sup>	18,33 ± 1,03	18,83 ± 0,98	15,80 ± 0,84	16,20 ± 1,30	14,83 ± 0,41	15,17 ± 0,41
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (DSM 1128) <sup>a,d</sup>	10,50 ± 0,58	14,50 ± 0,58	14,40 ± 1,34	15,00 ± 0,00	10,40 ± 0,89	15,00 ± 0,00
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 346) <sup>a,d</sup>	9,25 ± 0,50	13,00 ± 1,15	9,67 ± 0,52	12,50 ± 0,84	10,83 ± 0,75	11,67 ± 1,03
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> (DSM 1798) <sup>a,c</sup>	12,50 ± 0,55	13,00 ± 0,89	15,00 ± 0,89	15,83 ± 1,17	14,50 ± 0,58	15,75 ± 1,50
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> (DSM 11728) <sup>a,c</sup>	11,00 ± 0,63	11,67 ± 0,52	10,83 ± 0,75	11,50 ± 0,55	13,17 ± 0,75	14,00 ± 0,89

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respectivamente.

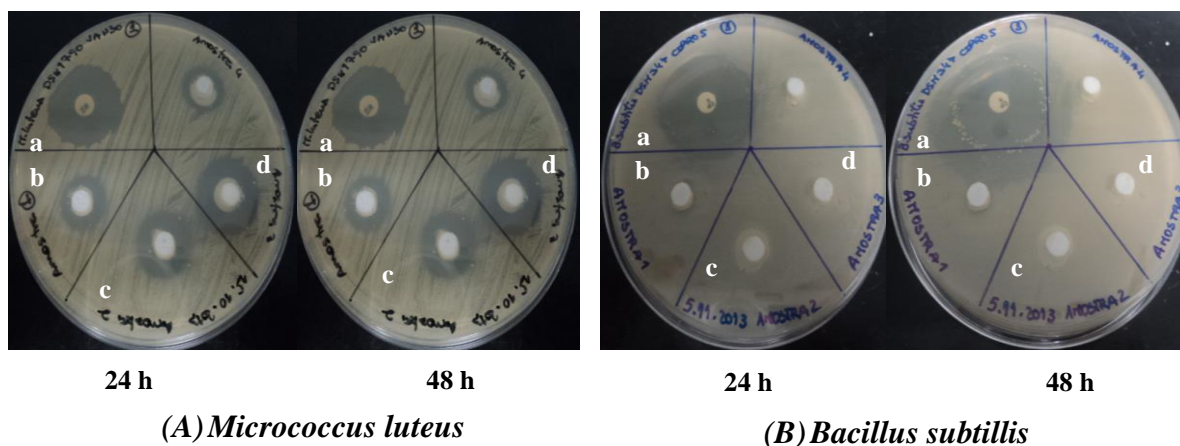
DP-Desvio-padrão

<sup>a</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição é estatisticamente diferente dos restantes às 24 h ( $p < 0,05$ ).

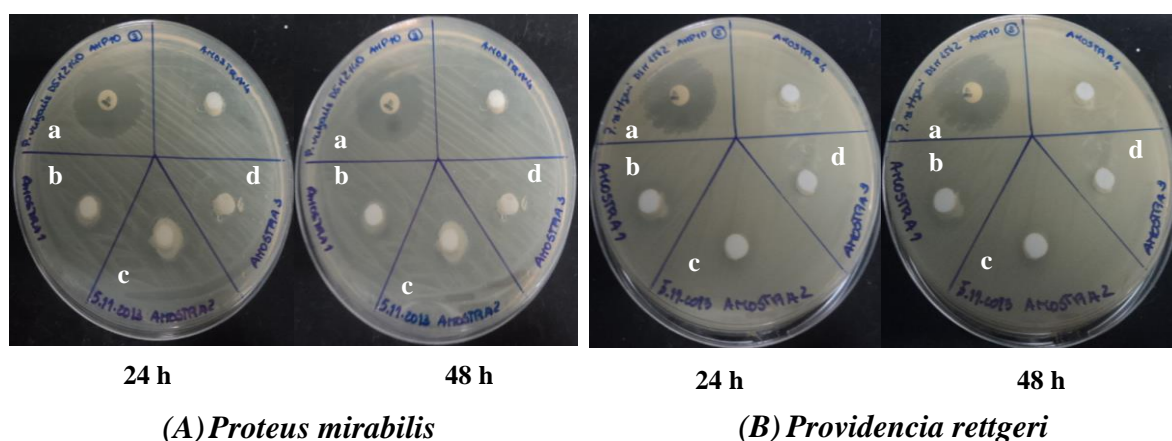
<sup>b</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição não é estatisticamente diferente dos restantes às 24 h ( $p > 0,05$ ).

<sup>c</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição é estatisticamente diferente dos restantes às 48 h ( $p < 0,05$ ).

<sup>d</sup> bactérias em que se verifica que pelo menos um dos valores médios de halo de inibição não é estatisticamente diferente dos restantes às 48 h ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17** - Perfil de atividade antimicrobiana das diferentes formulações comerciais contendo óleo de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram+: *Micrococcus luteus* (A), *Bacillus subtilis* (B). Método de difusão em poço. a) ATB, b) Amostra 1 (Crema B), c) Amostra 2 (Crema C) e d) Amostra 3 (Crema P).



**Figura 18** - Perfil de atividade antimicrobiana das diferentes formulações comerciais contendo óleo de Neem em análise em estirpes bacterianas Gram- : *Proteus mirabilis* (A) e *Providencia rettgeri* (B). Método de difusão em poço. a) ATB, b) Amostra 1 (Crema B), c) Amostra 2 (Crema C) e d) Amostra 3 (Crema P).

No que diz respeito ao creme B (amostra 1), os valores médios de halos de inibição obtidos para as diferentes bactérias em estudo foram bastante diversificados entre eles. Às 24 h, os valores mais elevados verificaram-se para a estirpe *P. rettgeri* ( $18,33 \pm 1,03$  mm). No entanto, o organismo *B. cereus* também apresentou valores de inibição elevados e muito próximos da bactéria anteriormente referida ( $17,67 \pm 0,52$  mm). Por outro lado, às 48 h, apesar de a estirpe *P. rettgeri* continuar a apresentar valores de halo de inibição elevados

(18,83±0,98 mm), os valores mais elevados foram observados no organismo *B. subtilis* (20,50±1,05 mm). No extremo oposto das bactérias anteriormente citadas devem ser referenciados os valores obtidos para a estirpe *S. aureus*, os quais foram os valores mais baixos observados após 24 h (9,25±0,50 mm). Esta situação não se manteve após 48 h uma vez que foi para o organismo *S. pyogenes* que se verificaram os valores mais baixos de halo de inibição (11,67±0,52 mm) neste tempo de incubação.

No caso do creme C (amostra 2), os valores médios de halo de inibição mais elevados após 24 h de incubação foram registados para as estirpes *P. vulgaris* (19,60±0,89 mm) e *B. subtilis* (18,83±0,98 mm). Esta constatação manteve-se mesmo após 48 h de incubação. Por outro lado, os valores médios de halo de inibição mais baixos foram observados para o organismo *S. aureus* (9,67±0,52 mm) às 24 h e para o organismo *S. pyogenes* (11,50±0,55 mm) às 48 h.

No que concerne ao creme P (amostra 3), os valores médios de halo de inibição mais elevados após 24 h de incubação foram observados para a bactéria *K. pneumoniae* (19,25±0,96 mm). Este resultado não se manteve às 48 h, sendo que neste caso os valores mais elevados foram verificados para a bactéria *B. subtilis* (20,50±1,76 mm). Em contrapartida, os valores médios de halo de inibição mais baixos foram observados para a bactéria *P. aeruginosa* (10,40±0,89 mm) às 24 h e para a bactéria *S. aureus* (11,67±1,03 mm) às 48 h.

É ainda importante referenciar que, à semelhança do verificado com as amostras de óleo de Neem, no caso das formulações comerciais contendo óleo de Neem ocorreu em geral um aumento dos valores médios do halo de inibição entre as 24 e as 48 h, mesmo que em alguns casos o aumento ocorrido tenha sido mínimo. No caso do creme B, o aumento mais significativo verificou-se para a bactéria *P. aeruginosa*. Por outro lado, para o creme C e P, os aumentos mais significativos verificaram-se para a bactéria *E. coli*.

Tal como realizado para as amostras de óleo 1-3, foi efetuada uma análise estatística para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos halos de inibição obtidos para cada microrganismo com os diferentes cremes (**Tabela XIX, a-d**).

Da análise realizada verificou-se que, às 24 h, apenas nos organismos *E. aerogenes* e *B. cereus* os valores médios de halo de inibição obtidos para os três cremes não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p>0,05$ ) (**Tabela XIX**). Após 48 h, destes dois organismos, apenas o *B. cereus* manteve este perfil, sendo acompanhado pelos valores obtidos pelos organismos *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* ( $p>0,05$ ). No que concerne aos valores obtidos para cada uma das restantes bactérias, pelo menos um dos valores obtidos para um dos cremes foi estatisticamente diferente ( $p<0,05$ ) dos valores dos restantes cremes, em ambos os tempos de incubação (**Tabela XIX**).

Os valores médios dos halos de inibição obtidos com os diferentes cremes em cada microrganismo foram comparados entre si através de testes estatísticos de comparações múltiplas de modo a avaliar entre que valores se verificavam de facto diferenças (**Tabela XX**).

**Tabela XX** – Comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com as diferentes formulações comerciais para cada bactéria, através de testes estatísticos de comparações múltiplas.\*

Bactéria	Comparações Múltiplas ( $p$ )*					
	Creme B/ Creme C		Creme B/ Creme P		Creme C/ Creme P	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>B. cereus</i>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>
<i>B. subtilis</i>	0,003	– <sup>a</sup>	0,006	– <sup>a</sup>	0,957	– <sup>a</sup>
<i>E. aerogenes</i>	– <sup>a</sup>	0,006	– <sup>a</sup>	0,001	– <sup>a</sup>	0,868
<i>E. faecalis</i>	0,178	0,007	0,000	0,000	0,000	0,013
<i>E. coli</i>	0,006	0,017	0,660	0,000	0,038	0,017
<i>K. pneumoniae</i>	0,042	0,083	0,003	0,049	0,000	0,001
<i>M. luteus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,015
<i>P. mirabilis</i>	0,001	0,001	0,857	0,024	0,005	0,539
<i>P. vulgaris</i>	0,002	0,000	0,010	0,000	0,672	0,996
<i>P. rettgeri</i>	0,000	0,016	0,000	0,000	0,177	0,297
<i>P. aeruginosa</i>	0,000	– <sup>a</sup>	0,998	– <sup>a</sup>	0,000	– <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i>	0,654	– <sup>a</sup>	0,004	– <sup>a</sup>	0,017	– <sup>a</sup>
<i>S. epidermidis</i>	0,000	0,003	0,002	0,008	0,625	0,999
<i>S. pyogenes</i>	0,915	0,905	0,000	0,000	0,000	0,000

\* os tempos de incubação dos organismos *E. faecalis* e *S. pyogenes* de 24 h e 48 h correspondem a 48 h e 96 h de incubação, respetivamente.

–<sup>a</sup> bactérias para as quais não foi aplicada a presente análise estatística, dado não terem apresentado diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre os valores obtidos com os diferentes cremes às 24 ou 48 h, nos testes estatísticos anteriores (**Tabela XIX, b e d**).

# diferenças estatisticamente significativas se  $p<0,05$ .

Quando se compararam os valores médios de halo de inibição obtidos com o creme B com o creme C, verificou-se que os valores obtidos após 24 h não apresentavam diferenças estatisticamente significativas no caso dos organismos *B. cereus* ( $p=0,338$ ), *E. aerogenes* ( $p=0,986$ ), *E. faecalis* ( $p=0,178$ ), *S. aureus* ( $p=0,654$ ) e *S. pyogenes* ( $p=0,915$ ). Relativamente aos valores obtidos após 48 h com o creme B e C, as bactérias *B. cereus* ( $p=0,390$ ), *S. aureus* ( $p=0,818$ ) e *S. pyogenes* ( $p=0,905$ ) mantiveram as condições referenciadas. Por outro lado, observou-se que alguns microrganismos com diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) às 24 h, passaram a apresentar resultados semelhantes ( $p>0,05$ ) entre os valores médios de halo de inibição obtidos com os dois cremes após 48 h de incubação. Este resultado foi observado para os microrganismos *B. subtilis* ( $p=0,972$ ), *K. pneumoniae* ( $p=0,083$ ) e *P. aeruginosa* ( $p=0,074$ ).

A comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com o creme B e com o creme P permitiu constatar que os valores obtidos com estes cremes após 24 h não eram estatisticamente diferentes nas seguintes bactérias: *B. cereus* ( $p=0,813$ ), *E. aerogenes* ( $p=0,675$ ), *E. coli* ( $p=0,660$ ), *P. mirabilis* ( $p=0,857$ ) e *P. aeruginosa* ( $p=0,998$ ). Às 48 h, os valores médios de halo de inibição obtidos com o creme B e P não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p>0,05$ ) para as estirpes *B. cereus* ( $p=0,895$ ) e *P. aeruginosa* ( $p=0,074$ ). Para além destas duas estirpes, também os organismos *B. subtilis* e *S. aureus* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos dois cremes após 48 h, situação que não se verificava às 24 h com estes organismos. É ainda importante salientar o caso das estirpes *E. aerogenes*, *E. coli* e *P. mirabilis* que às 24 h apresentavam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os valores médios de inibição obtidos com os dois cremes, e às 48 h deixaram de se verificar essas diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

No que concerne à comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos com os cremes C e P, verifica-se que, às 24 h, não se identificaram diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) em 6 das 14 bactérias em estudo. Esta observação foi constatada para os microrganismos *B. cereus* ( $p=0,241$ ), *B. subtilis* ( $p=0,957$ ), *E. aerogenes* ( $p=0,479$ ), *P. vulgaris* ( $p=0,672$ ), *P. rettgeri* ( $p=0,177$ ) e *S. epidermidis* ( $p=0,625$ ). No caso dos resultados obtidos para estes dois cremes às 48 h, é de referir que, de entre as 14 bactérias em estudo, apenas em 5 delas se verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os valores dos halos de inibição do creme C e do creme P. As 5 bactérias em causa são *E. faecalis* ( $p=0,013$ ), *E. coli* ( $p=0,017$ ), *K. pneumoniae*

( $p=0,001$ ), *M. luteus* ( $p=0,015$ ) e *S. pyogenes* ( $p=0,000$ ). É ainda importante referir que 3 dos microrganismos em que as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) após 48 h de incubação, tinham apresentado previamente às 24 h diferenças significativas ( $p<0,05$ ). Esses 3 microrganismos são *P. mirabilis* ( $p=0,539$ ), *P. aeruginosa* ( $p=1,000$ ) e *S. epidermidis* ( $p=0,411$ ).

À semelhança do descrito para as amostras de óleo, realizou-se também uma análise estatística que permitisse a comparação dos valores médios de halo de inibição obtidos para as diferentes bactérias utilizando a mesma formulação comercial.

No que se refere ao creme B, o valor médio alcançado por esta formulação sobre a bactéria *P. rettgeri* após 24 h foi significativamente mais elevado ( $p<0,05$ ) que os valores médios de halo de inibição alcançados por esta formulação sobre as restantes 13 bactérias em estudo, mais precisamente em relação a 11 delas, apresentando um perfil semelhante em relação as outras 2 bactérias. A situação não se manteve às 48 h, sendo que neste caso foi para a bactéria *B. subtilis* que se observou o halo médio de inibição significativamente mais elevado ( $p<0,05$ ) relativamente às restantes 13 bactérias em estudo, mais precisamente em relação aos valores de 11 das 13 bactérias, apresentando em relação as restantes 2 bactérias valores semelhantes .

No que concerne ao creme C, os valores médios obtidos com esta formulação sobre as bactérias *S. aureus* e *S. pyogenes* após 24 h foram significativamente mais baixos ( $p<0,05$ ) que os os valores médios de halo de inibição alcançados por este creme sobre as restantes 13 bactérias em estudo, nomeadamente para 12 delas, apresentando um perfil semelhante em relação a bactéria restante. Esta constatação manteve-se às 48 h, sendo que a bactéria *S. aureus* apresentou valores médios significativamente mais baixos ( $p<0,05$ ) em relação aos valores médios de inibição observados com 11 das 13 bactérias, enquanto que a bactéria *S. pyogenes* manteve valores médios de inibição com esta formulação significativamente mais baixos ( $p<0,05$ ) que os valores obtidos para 12 das 13 bactérias. Em relação as restantes bactérias estes dois organismos apresentaram valores médios semelhantes.

Por fim, no que diz respeito ao creme P, os valores médios de halo de inibição observados com este creme para as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 24 h foram significativamente mais baixos ( $p<0,05$ ) que os valores médios de halo de inibição alcançados sobre as restantes 13 bactérias em estudo, especialmente em relação a 11 das

restantes bactérias, dado que em relação aos valores das restantes 2 bactérias apresentou valores semelhantes. Esta observação manteve-se às 48 h, mas apenas para a estirpe *S. aureus*, sendo que o valor médio de inibição obtido com este creme foi significativamente mais baixo ( $p < 0,05$ ) que os valores médios de halo de inibição observados para as restantes 13 bactérias.

### **4.2.3. Atividade antimicrobiana do padrão de Azadiractina**

Adicionalmente, a atividade antimicrobiana da AZA pura foi avaliada utilizando o mesmo método descrito para as amostras de óleo e de creme. Neste caso, foi testada uma solução de AZA a 1 mg/ml em ACN. Simultaneamente, testou-se nas condições e como controlo apenas ACN (solvente). A exemplo dos ensaios de atividade antimicrobiana anteriores (secções 4.2.1. e 4.2.2.), utilizaram-se como controlo positivo antibióticos para os quais os microrganismos em estudo eram sensíveis, verificando-se valores médios de halos de inibição concordantes com os valores tabelados (CLSI, 2012).

Através da comparação por análise estatística dos valores médios de halo de inibição obtidos com o padrão de AZA e o apenas com o solvente ACN em cada bactéria, verificou-se que os valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre si para grande parte das bactérias em estudo. Contudo, no caso da bactéria *K. pneumoniae* verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores obtidos com ACN e AZA ( $p = 0,005$ ), tanto às 24 como às 48 h, uma vez que se observaram valores médios de halo de inibição de  $35,50 \pm 0,71$  mm para o padrão de AZA e de apenas  $30,00 \pm 0,00$  mm para o solvente ACN.

## **CAPÍTULO V – Discussão**



## **5. Discussão**

### **5.1. Análise de Azadiractina em amostras de óleo de Neem por Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC)**

A análise quantitativa e a análise qualitativa de compostos ativos presentes nas plantas são parâmetros essenciais para uma utilização segura e eficaz dos mesmos. No entanto, os produtos de origem natural têm associados a si uma grande variedade de compostos, os quais apresentam natureza, quantidade e características diferentes, tornando muitas vezes a sua análise extramente difícil e complexa. Neste sentido, torna-se difícil encontrar um método de análise universal que permita analisar todos os compostos presentes numa planta. A maior parte das técnicas usadas para esta função consistem normalmente em métodos espectrofotométricos ou métodos cromatográficos (mais precisamente HPLC), sendo estes últimos os métodos mais frequentemente utilizados.

No caso da *Azadirachta indica* (Neem), planta central deste trabalho, e em particular da sua principal substância ativa a AZA, várias técnicas analíticas têm sido descritas para a determinar a quantidade de AZA nos mais diversos tipos de amostras obtidas a partir do Neem. De entre os diversos métodos descritos, os métodos cromatográficos e, em particular, a análise utilizando HPLC acoplado a detetores UV, destacam-se como métodos de eleição (Prakash et al., 2002). No entanto, parte destes métodos não é aplicado na quantificação da AZA, mas apenas na identificação da sua presença nas diversas matrizes em estudo. Desta forma, o desenvolvimento de métodos que possam ser aplicados simultaneamente na identificação e na quantificação de AZA em diferentes tipos de matrizes do Neem é de extrema importância.

No presente trabalho, pretendeu-se desenvolver um método analítico utilizando a técnica de HPLC-DAD que, tendo por base métodos já descritos na literatura, pudesse ser aplicado na identificação e quantificação de AZA em amostras de óleo de Neem. O método utilizado para a determinação de AZA nas diversas amostras em estudo foi adaptado a partir do método proposto por Ramesh et al. (1999) (Ramesh and Balasubramanian, 1999).

No método de Ramesh et al. (1999) foi utilizada uma coluna RP-C18, com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro; uma fase móvel contendo MetOH, ACN e água, na proporção 35:15:50, respetivamente; e uma eluição do tipo isocrático, obtendo-se tempos de retenção para o composto AZA-A de 7,0 min e para o composto AZA-B de 6,0 min (Ramesh and Balasubramanian, 1999).

O método analítico implementado no presente trabalho apenas introduziu uma alteração no método anteriormente descrito, mais precisamente a coluna utilizada. Neste sentido, foi utilizada neste trabalho uma coluna RP-C18 com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro verificando-se um aumento de tempo de retenção de cada um dos compostos relativamente ao método utilizado por Ramesh et al. (1999). De facto, obtiveram-se com o presente método tempos de retenção de aproximadamente 12 e 15 minutos para os compostos AZA-A e AZA-B, respetivamente (**Tabela X e Figuras 12, 13 e 14**). O aumento do tempo de retenção dos compostos em análise deveu-se à utilização de uma coluna de comprimento mais elevado no presente estudo. É de salientar que, apesar de estarem geralmente associadas a tempos de análise mais longos, as colunas de maior comprimento (250-300 mm) proporcionam uma maior resolução, o que pode representar uma vantagem para o método utilizado neste trabalho. Por sua vez, uma resolução mais elevada facilita uma identificação e quantificação rigorosa dos compostos em análise.

No método utilizado por Ramesh et al. (1999) não é referenciado o comprimento de onda utilizado na deteção dos compostos. Desta forma, foi utilizado um dos comprimentos de onda mais descritos na literatura (**Tabela IV**) e que correspondia também ao comprimento de onda referenciado no certificado de análise do padrão de AZA. A deteção utilizando o comprimento de onda de 215 nm proporcionou resultados com qualidade na deteção tanto de AZA-A, como de AZA-B. Esta situação pôde ser comprovada, uma vez que o detetor de matriz de díodos utilizado permitiu obter o espectro de absorção das substâncias em estudo, no qual se confirmou que o comprimento de onda de 215 nm correspondia ao máximo de absorção das substâncias.

No decorrer na análise cromatográfica verificou-se que ocorriam ligeiras variações nos tempos de retenção dos compostos em diferentes dias de análise. Esta observação pode provavelmente ser atribuída à não utilização de água ultrapura e/ou tamponada na preparação da fase móvel. No entanto, uma vez que em todos os dias de trabalho a solução-

padrão era alvo de análise cromatográfica, a identificação dos compostos nas amostras não foi comprometida.

Para além das dificuldades de implementação de um método analítico que permita em simultâneo a identificação e quantificação de compostos em produtos de origem natural, uma outra dificuldade é a obtenção de um padrão adequado, que permita que os métodos analíticos sejam devidamente calibrados. Na maioria dos casos, as dificuldades inerentes à obtenção de padrões prendem-se com a inexistência comercial dos mesmos, de estarem associados a custos elevados, bem como o facto de muitos deles não se apresentarem como substâncias totalmente puras.

No caso da AZA, apesar da existência de padrões deste composto disponíveis comercialmente, estes estão associados a custos de aquisição bastante elevados. Esta situação foi a principal limitação do presente trabalho uma vez que limitou o número de ensaios realizados, nomeadamente no que se refere ao doseamento do composto nas diversas amostras. Para além disso, estes padrões nem sempre se apresentam como substâncias totalmente puras, bem como na sua generalidade não apresentam apenas a designada AZA-A, ou seja, a AZA, mas também o composto AZA-B. Apesar de a presença dos dois compostos no padrão poder representar uma desvantagem quando se pretende determinar apenas a AZA-A, pode também revelar-se benéfica e contribuir para uma diminuição dos custos quando se pretende determinar os dois compostos em simultâneo.

Antes da sua utilização no doseamento das substâncias em estudo, o método analítico foi alvo de um procedimento de validação. Como resultado deste procedimento, obtiveram-se valores de precisão intermédia entre 0,79% a 4,17% e de repetibilidade entre 0,39% e 3,54%, valores inferiores a 5% e indicadores de que o método analítico utilizado neste trabalho possui elevada precisão. Em termos de percentagem de recuperação para os diferentes compostos obtiveram-se valores entre 70,91% e 106,64%, os quais se apresentam como valores extremamente satisfatórios, e dentro dos valores referenciados para matrizes complexas (70-130%  $\pm$  15%), como é o caso das amostras em análise. O presente método analítico permitiu detetar (LD) AZA-A e AZA-B a partir de 0,40 e 0,23  $\mu\text{g/ml}$ , respetivamente, e quantificar (LQ) AZA-A e AZA-B a partir de 0,71 e 0,53  $\mu\text{g/ml}$ , respetivamente. Comparativamente com outros trabalhos visando a determinação de AZA,

os valores obtidos neste estudo são, no caso do LD, superiores aos previamente descritos enquanto que no caso do LQ se obtiveram valores inferiores (Forim et al., 2010a, Forim et al., 2010b, Forim et al., 2010c). A obtenção de valores de LQ reduzidos representa uma vantagem acrescida do método analítico desenvolvido neste trabalho, nomeadamente quando se tem em conta que um dos seus principais objetivos é a quantificação rigorosa de ativos em amostras reais. Foi ainda verificado que uma solução de AZA pura se mantinha estável e capaz de originar resultados fiáveis durante, pelo menos, 2 meses após a sua preparação.

Devidamente validado, o método analítico foi então aplicado na deteção e quantificação de AZA em amostras de óleo de Neem. O método desenvolvido permitiu detetar e quantificar de forma eficaz nas várias amostras não só a substância AZA-A, mas também a substância AZA-B. Como mencionado anteriormente, são poucos os estudos existentes sobre o teor destes compostos e em particular da AZA no óleo de Neem. Os estudos sobre o teor de Azadiractina (AZA-A) no óleo de Neem referem frequentemente valores de teor variáveis, que variam entre valores quase indetectáveis e valores perto de 4000 ppm (Melwita and Ju, 2010). Porém, é de salientar o facto de muitos estudos não referenciarem especificamente se os teores se referem à AZA-A, ou seja, a Azadiractina propriamente dita, ou aos teores de AZA-A e AZA-B em conjunto.

A maioria dos estudos existentes debruça-se essencialmente no desenvolvimento de métodos que permitam detetar de forma eficaz e rápida este tipo de compostos e não tanto sobre a sua quantificação nas diversas porções do Neem. No caso concreto do óleo de Neem, os estudos existentes tendem a extrapolar o teor de AZA existente no óleo a partir do teor presente nas sementes de Neem, fonte principal de obtenção do mesmo. Apesar das sementes influenciarem largamente o teor existente no óleo, o teor não é exatamente igual nas duas porções, dado que o processo extractivo do óleo também condiciona a percentagem dos diferentes compostos (Forim et al., 2010b, Melwita and Ju, 2010). Por conseguinte, a elaboração de trabalhos com o objetivo primordial de determinação do teor de AZA e outros compostos diretamente no óleo de Neem revela-se crucial.

O estudo mais recente sobre esta temática foi realizado por Forim et al. (2010) e teve como objetivo quantificar em simultâneo a Azadiractina (AZA-A) e o 3-*tigloylazadirachtol* (AZA-B) em sementes e óleo de Neem (Forim et al., 2010b). No caso

concreto das amostras de óleo de Neem, o estudo comparou os teores de AZA-A e AZA-B em amostras de óleo de Neem de proveniências diferentes, nomeadamente, Índia (6 amostras) e Brasil (7 amostras) (Forim et al., 2010b). Neste estudo verificou-se que os teores de AZA-A variavam entre 228,5-1577,4 mg/kg e os de AZA-B entre 117,1-1171,0 mg/kg (Forim et al., 2010b). Estes valores também permitiram concluir que, na generalidade, os valores obtidos para a substância AZA-A tendem a ser mais elevados do que os obtidos para a substância AZA-B (Forim et al., 2010b).

Comparando os resultados obtidos por Forim et al. (2010) e os do presente trabalho, constatou-se que os teores dos compostos AZA-A e AZA-B determinados para os óleos em estudo foram na globalidade bastante mais reduzidos que os resultados obtidos por Forim et al. (2010) (Forim et al., 2010b). No presente caso, os valores obtidos para os compostos AZA-A e AZA-B situaram-se, respetivamente, entre 58,53-843,42 mg/kg e 12,52-800,23 mg/kg. Dos três óleos alvo de análise, o que apresentou os teores mais próximos dos descritos por Forim et al.(2010) foi o óleo 2 (843,42 mg/kg-AZA-A; 800,23 mg/kg-AZA-B). À semelhança do verificado por Forim et al. (2010), os teores de AZA-A foram superiores aos de AZA-B.

Em termos de valores totais dos dois compostos (AZA-A+B), tal como observado com os teores dos compostos de forma isolada (AZA-A e AZA-B), verificou-se que apenas o óleo 2 tendia a apresentar valores próximos aos do estudo de Forim et al. (2010), mais especificamente  $1642,17 \pm 12,35$  mg/kg. No extremo oposto encontrava-se o óleo 1, com um teor de  $104,20 \pm 6,76$  mg/kg, valor muito abaixo dos teores apresentados por Forim et al (2010).

Para além da determinação do teor de AZA nas diferentes amostras, Forim et al. (2010) comparou os teores deste tipo de compostos entre os óleos de origem brasileira e os de origem indiana. Concluiu-se que os teores AZA- A e B nos óleos de de Neem do Brasil eram menores comparativamente com os da Índia (Forim et al., 2010b). Estes resultados levaram a atribuir aos óleos de Neem do Brasil uma menor qualidade (Forim et al., 2010b, Melwita and Ju, 2010). No presente trabalho também foram analisadas amostras dos dois países acima referidos, mais precisamente duas amostras de óleo de Neem da Índia (óleo 1 e 2) e uma amostra de óleo de Neem do Brasil (óleo 3). Analisando-se os resultados obtidos para estas amostras, observou-se que, em termos de AZA-A, o óleo proveniente do Brasil apresentava um teor inferior aos dos óleos de Neem da Índia (58,55 mg/kg).

Contudo, no que se refere ao teor em AZA-B, a situação alterou-se e o óleo 1, proveniente da Índia, apresentou o teor mais baixo (12,55 mg/kg). Neste sentido, foi possível constatar que apenas o óleo 2, originário da Índia, apresentou um teor considerado satisfatório dos dois compostos e de ordem de grandeza semelhante aos valores descritos na literatura. Posto isto, não é possível fazer corresponder com certeza uma menor qualidade dos óleos com nenhuma das proveniências. Porém, devido aos baixos teores em AZA, é possível considerar os óleos 1 e 3 como óleos de menor qualidade.

A qualidade do óleo de Neem é muito condicionada pela percentagem de AZA que nele está presente (Forim et al., 2010b, Melwita and Ju, 2010). Normalmente, um baixo teor de AZA no óleo de Neem pode ser atribuído a dois fatores: a qualidade das sementes utilizadas na extração do óleo ou o processo extrativo (Forim et al., 2010b, Melwita and Ju, 2010). No caso do estudo de Forim et al (2010), a qualidade reduzida dos óleos do Brasil foi atribuída ao processo extrativo, uma vez que quando analisadas amostras de sementes dos dois países, os teores entre elas eram bastante semelhantes (Forim et al., 2010b). No caso do presente estudo, não é possível concluir qual a causa das diferenças de teor observadas. Deste modo, seria necessário avaliar também o teor de AZA nas sementes que deram origem aos óleos em análise, e assim concluir sobre o que terá condicionado o teor de AZA nestes mesmos óleos.

## **5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de amostras de óleo de Neem e de formulações comerciais contendo óleo de Neem**

Para além da análise quantitativa e qualitativa dos compostos presentes nas plantas, a percepção da real utilidade desses compostos como possíveis agentes terapêuticos é essencial. Uma das grandes problemáticas atuais é a resistência dos microrganismos aos antibióticos que conduz a uma ineficácia dos mesmos. A descoberta de possíveis agentes que os possam substituir e proporcionar o mesmo efeito ou semelhante é por conseguinte fundamental. Por tudo isto, a avaliação da atividade antimicrobiana de determinado composto torna-se premente. No presente trabalho, pretendeu-se avaliar a capacidade antimicrobiana do óleo de Neem, bem como de produtos comerciais contendo óleo de Neem.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras em estudo, estas foram testadas sobre 14 microrganismos diferentes. Os microrganismos foram selecionados de acordo com diversos critérios e considerando o estudo de número semelhante de microrganismos dos dois grupos de Gram (Gram+ e Gram-). Dada a utilização tópica das formulações comerciais em estudo e a possível incorporação do óleo de Neem nas mesmas, foram selecionados microrganismos comuns na flora normal da pele e em patologias associadas à mesma. Para além disso, foram selecionados também microrganismos comumente utilizados em testes padrão de avaliação da atividade antimicrobiana. Por fim, foram escolhidos adicionalmente dois microrganismos que apresentavam uma dependência de oxigénio diferente dos restantes microrganismos, mais especificamente 2 organismos microaerofílicos (*S. pyogenes* e *E. faecalis*).

O procedimento experimental adotado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi o método de difusão em poço. Este tipo de técnica permite a utilização de quantidades mais elevadas de amostra, assim como se torna numa técnica de eleição quando se analisam matrizes viscosas ou de consistência pastosa, como é caso dos óleos e dos cremes em estudo. A análise destes tipos de matriz torna-se com frequência inviável através do método de difusão em disco, dado que o disco fica saturado com quantidades muito pequenas destas amostras.

O método de difusão em poço avalia a difusão das diferentes substâncias no meio sólido a partir de um poço. Assim, efetuou-se a medição do halo de inibição (em mm) ao redor do poço após 24 h e 48 h de incubação. Os dois tempos de incubação selecionados para análise devem-se em grande parte ao facto de as bactérias apresentarem velocidades diferentes de crescimento. Após consulta de bibliografia adequada, assumiu-se que as bactérias em estudo atingiam a sua fase estacionária de crescimento, ou seja, ocorria o fim do crescimento microbiano após 48 h de incubação. No entanto, como alguns microrganismos não necessitavam de um período tão longo para atingirem esta fase, optou-se pela inclusão dos dois tempos de incubação. Além disso, 24 h é o tempo de incubação indicado nas normas padrão de testes de suscetibilidade (CLSI, 2012). Para além das diferentes velocidades de crescimento dos microrganismos, também as características inerentes das amostras em estudo, nomeadamente a viscosidade dos óleos e a consistência pastosa das formulações comerciais contribuíram para se incluírem os dois tempos de incubação no presente estudo. Estas propriedades das amostras dificultam a sua difusão

nos meios de cultura, tornando-a mais lenta. Desta forma, torna-se necessário um período de tempo de incubação mais longo que permita a completa difusão das amostras e o seu máximo de ação. Na prática, tal como previsto devido aos fatores atrás referidos, observaram-se variações entre os valores de halos de inibição obtidos às 24 h e às 48 h na maioria dos ensaios. Apenas em algumas situações os valores se mantiveram constantes ou com variações quase indetetáveis entre os dois períodos de incubação.

Os microrganismos *S. pyogenes* e *E. faecalis* apresentam características particulares, nomeadamente a necessidade de incubação em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> e durante um período de tempo maior para que seja atingida a fase estacionária de crescimento. Estes microrganismos atingem geralmente a fase estacionária após 96 h de incubação (recomendação do fornecedor-DSMZ). Deste modo, fazendo uma correspondência entre os tempos de crescimento destes 2 microrganismos e dos restantes organismos em teste, assumiu-se que as 96 h de incubação destes 2 microrganismos corresponderiam às 48 h dos restantes microrganismos, e que as 48 h corresponderiam às 24 h dos restantes.

Nos últimos anos, os vários estudos publicados sobre a atividade antimicrobiana do Neem têm apresentado resultados muito diversificados. Já no caso do óleo de Neem, a literatura disponível sobre sua atividade antimicrobiana é escassa, sendo que a existente demonstra a capacidade de este óleo inibir o crescimento tanto de bactérias Gram- como Gram+ (Asif, 2012, Jahan et al., 2007, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010).

O presente trabalho permitiu avaliar a atividade antimicrobiana de três amostras diferentes de óleo de Neem, tendo-se verificado que as três apresentavam atividade sobre todas as bactérias em estudo. É de salientar que, à semelhança do descrito na literatura, as três amostras apresentaram atividade sobre bactérias Gram- e Gram+. Além disso, não se verificou que os óleos apresentassem atividade preferencial sobre determinado grupo de Gram, sendo os valores obtidos para as bactérias dos dois grupos extremamente próximos. Por conseguinte, é possível inferir que o grupo de Gram ao qual uma bactéria pertence não influencia a ação antimicrobiana do óleo de Neem.

Quando comparados os resultados obtidos com cada óleo sobre as diferentes bactérias, foi possível destacar uma ou várias bactérias com suscetibilidade estatisticamente diferente das restantes. No caso do óleo 1, o organismo *S. pyogenes* apresentou-se como o mais

susceptível uma vez que, tanto às 24 como às 48 h, apresentou halos de inibição significativamente mais elevados que as outras bactérias testadas. Relativamente ao óleo 2, foi possível observar que as bactérias *P. mirabilis* e *S. aureus*, quando sob ação deste óleo, apresentavam após 24 h uma suscetibilidade superior à verificada para as restantes bactérias. Porém, após 48 h, a bactéria *S. aureus*, em conjunto com a bactéria *K. pneumoniae*, passou a apresentar uma suscetibilidade que era significativamente inferior à das restantes bactérias. No que diz respeito ao óleo 3, às 24 h destacava-se a suscetibilidade significativamente mais elevada apresentada pelas bactérias *S. pyogenes* e *M. luteus*. Por outro lado, a bactéria que destacou em termos de suscetibilidade às 48 h foi a bactéria *E. aerogenes*, mas neste caso apresentando um valor de inibição significativamente mais baixo em relação aos restantes organismos.

De entre as bactérias mais frequentemente descritas na literatura como sendo alvo da atividade do óleo de Neem, salientam-se as bactérias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Asif, 2012, Jahan et al., 2007, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010). Estas quatro bactérias foram também testadas neste trabalho, sendo que, à semelhança do descrito na literatura, se verificou atividade antimicrobiana das amostras de óleo de Neem em estudo sobre estas bactérias. No conjunto destas quatro bactérias, o organismo *B. cereus* tem sido associado a resultados muito satisfatórios em várias publicações (Asif, 2012, Upadhyay et al., 2010). Upadhyay et al (2010) descreveu para esta bactéria halos de inibição com o óleo de Neem bastante elevados, de aproximadamente 45 mm (Upadhyay et al., 2010). Neste sentido, esperava-se que esta bactéria apresentasse também neste trabalho halos de inibição bastante elevados, destacando-se assim dos restantes microrganismos em teste. No entanto, este facto não se verificou. Apesar de se terem observado valores médios de halo de inibição elevados para a bactéria *B. cereus*, estes não se aproximaram dos descritos na literatura. Os valores mais elevados obtidos para esta bactéria foram conseguidos com o óleo 3, com halos de inibição médios próximos de 20 mm, mas muito distantes dos valores referidos por Upadhyay et al (2010) (Upadhyay et al., 2010). Uma possível composição diferente dos óleos utilizados nos dois estudos pode estar na base da diferença de resultados observada.

Outros microrganismos sobre os quais também é reportada atividade do óleo de Neem, apesar de menos frequente, foram também avaliados neste trabalho. Desse conjunto, são de realçar as bactérias *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* e *S. pyogenes*, que

no presente trabalho apresentaram perfis de suscetibilidade microbiana com o óleo de Neem bastante satisfatórios. No entanto, quando se comparam os resultados obtidos com a literatura, estes não são totalmente concordantes. No caso dos organismos *P. mirabilis* e *S. pyogenes*, os estudos anteriores que avaliaram a atividade do óleo de Neem sobre estas bactérias verificaram uma atividade positiva à semelhança do presente trabalho (Asif, 2012, Rao et al., 1986). Pelo contrário, no caso dos organismos *K. pneumoniae*, *B. subtilis* e *P. vulgaris*, esta concordância não se verificou pois existem estudos que descreveram atividade positiva do óleo de Neem à semelhança do presente estudo e outros em que se não se verificou atividade antimicrobiana (Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010). Esta constatação revela uma necessidade de estudos mais aprofundados da atividade do óleo de Neem sobre estas bactérias e também sobre outras não referenciadas na literatura e avaliadas neste estudo, de forma a perceber melhor a real ação do óleo de Neem sobre os microrganismos.

Os produtos naturais à base de plantas têm vindo a ser utilizados nos mais variadíssimos níveis, nomeadamente a nível farmacológico e cosmético e principalmente através da sua incorporação em produtos de aplicação tópica. Neste sentido, a perceção da sua atividade sobre microrganismos comuns ao nível da pele e de patologias da mesma são de extrema relevância.

As bactérias *S. pyogenes* e *S. aureus* são das mais frequentes em infeções da pele (Ki and Rotstein, 2008). Em termos de atividade antimicrobiana do Neem, os diferentes extractos de Neem e inclusive o óleo de Neem têm apresentado resultados bastante satisfatórios sobre estas bactérias (Asif, 2012, Gajanan, 2012, Jahan et al., 2007, Ki and Rotstein, 2008, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010). A bactéria *S. pyogenes* foi uma das testadas neste trabalho e para a qual se verificou atividade antimicrobiana com as amostras de óleo em estudo, semelhança do descrito na literatura (Rao et al., 1986). Esta bactéria apresentou os valores mais elevados de halo de inibição para dois dos óleos de Neem avaliados (óleos 1 e 3). Apesar de a ação antimicrobiana do óleo 2 não ser tão elevada sobre o organismo *S. pyogenes* como a observada com os dois restantes óleos, é possível dizer que o óleo 2 também apresentou atividade antimicrobiana positiva sobre esta bactéria. À semelhança do organismo *S. pyogenes*, o *S. aureus* também foi testado neste trabalho, verificando-se uma atividade positiva de todos os óleos sobre este microrganismo, resultado que se encontra de acordo

com o descrito na literatura (Asif, 2012, Gajanan, 2012, Jahan et al., 2007, Ki and Rotstein, 2008, Oyinbo et al., 2013, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000, Upadhyay et al., 2010). No entanto, comparativamente com o organismo *S. pyogenes*, obtiveram-se para o organismo *S. aureus* resultados tendencialmente mais baixos. De qualquer modo, obtiveram-se para o organismo *S. aureus* halos de inibição superiores a 10 mm, com o máximo de atividade observado com o óleo 3. A atividade demonstrada sobre estes dois microrganismos pode ser importante para uma possível incorporação do óleo de Neem em produtos de aplicação tópica a utilizar em prevenção ou tratamento de problemas de pele.

Nos idosos, a pele é estruturalmente e funcionalmente diferente das restantes faixas etárias e mais suscetível à ocorrência de infeções da pele e tecidos (Laube, 2004). Estas particularidades do doente idoso fazem emergir outros microrganismos como responsáveis destas infeções, principalmente *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, bem como os já referenciados *S. pyogenes* e *S. aureus* (Laube, 2004, Lertzman and Gaspari, 1996). No caso dos organismos *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, o presente trabalho revelou que estes organismos apresentavam um perfil de suscetibilidade aos óleos em estudo bastante satisfatório, e de acordo com a generalidade da literatura (Asif, 2012, Jahan et al., 2007, Rao et al., 1986, SaiRam et al., 2000). De todos os organismos testados neste trabalho, a bactéria *P. mirabilis* foi a que apresentou os valores mais elevados de halo de inibição com o óleo 2, após 24 h de incubação. Por outro lado, a bactéria *P. aeruginosa*, mesmo com valores tendencialmente mais baixos que a bactéria *P. mirabilis*, apresentou valores de suscetibilidade às amostras de óleo de Neem bastante razoáveis, principalmente após 48 h de incubação. Estes resultados sugerem que a incorporação do óleo de Neem em produtos destinados a problemas de pele desta faixa etária poderá representar uma vantagem.

Ainda no que se refere aos idosos, as úlceras de pressão são também uma situação comum (Moraes et al., 2012, Rocha et al., 2006). Nestas úlceras desenvolvem-se por vezes infeções, o que leva ao agravamento da lesão e em alguns casos mesmo à morte (Rocha et al., 2006). Os microrganismos mais descritos como responsáveis destas infeções são *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (Shibuya et al., 1994). Como referenciado anteriormente, as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* demonstraram perfis de suscetibilidade bastante satisfatórios com os óleos de Neem testados. Já no caso do organismo *E. faecalis*, os resultados obtidos foram extremamente positivos e tendencialmente superiores aos observados para as outras duas bactérias, principalmente

com o óleo 1 e o óleo 2. Estes resultados demonstram que a incorporação do óleo de Neem em produtos de aplicação em úlceras de pressão poderá ser uma mais valia no combate a estes agentes potencialmente patogénicos, permitindo assim prevenir a ocorrência de infeções por estes.

Para além do idoso, um doente crítico e que tem associado a si inúmeras infeções de pele é o doente queimado, representando as infeções uma das principais causas de morbilidade e de mortalidade neste tipo de doentes (Lari and Alaghebandan, 2000, Oncul et al., 2002, Soares de Macedo and Santos, 2006). Uma vez que estes doentes desenvolvem com facilidade muitas infeções, os produtos utilizados nos mesmos devem ser o mais seguros e eficientes possíveis para evitar outros problemas e o consequente agravamento do estado de saúde. A bactéria *P. aeruginosa* é descrita como o principal agente associado a infeções de feridas de doentes queimados (Lari and Alaghebandan, 2000, Oncul et al., 2002, Soares de Macedo and Santos, 2006). Como referenciado anteriormente, apesar de esta bactéria não ter apresentado valores de halos de inibição extraordinariamente elevados com os óleos de Neem testados, revelou uma suscetibilidade a este tipo de matriz que pode ser considerada satisfatória. Desta forma, é evidente o possível benefício da incorporação do óleo de Neem em produtos que visem o tratamento da pele de doentes queimados.

O crescimento microbiano é condicionado por inúmeros fatores, entre os quais a quantidade de oxigénio presente no ambiente. O organismo *S. pyogenes*, juntamente com o organismo *E. faecalis*, são representativos de bactérias com um tipo de dependência de oxigénio diferente das restantes bactérias em estudo. Estes dois organismos são microaerofílicos, ou seja, são organismos que utilizam oxigénio nas reações químicas para a produção de energia como os organismos aeróbios; porém, ao contrário destes, não resistem aos níveis de oxigénio existentes na atmosfera, requerendo níveis de oxigénio mais reduzidos para conseguirem crescer. Com a inclusão destes dois microrganismos no presente estudo, pretendeu-se avaliar se diferenças na dependência de oxigénio por parte dos microrganismos influenciavam os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana das diferentes amostras testadas. No caso das amostras de óleo de Neem, verificou-se que estes dois microrganismos apresentavam perfis de suscetibilidade diferentes entre si. Os valores médios de halo de inibição obtidos para a bactéria *S. pyogenes* foram tendencialmente superiores aos observados para a bactéria *E. faecalis* que, por sua vez, apresentou valores próximos dos registados para os restantes microrganismos em teste.

Estes resultados sugerem que poderá não existir influência do tipo de dependência de oxigénio sobre os valores de inibição alcançados. Para que essa influência fosse evidente, os resultados obtidos para as bactérias *E. faecalis* e *S. pyogenes* deveriam ter um perfil similar entre si e destacar-se dos restantes microrganismos, situação que não se verificou no presente estudo

A atividade antimicrobiana das amostras de óleo de Neem que foi detetada sobre os microrganismos em estudo pode dever-se a uma diversidade de compostos presentes nos óleos. Uma das substâncias apontada como possível responsável pela atividade antimicrobiana do óleo de Neem é a Azadiractina (AZA), o principal composto bioativo presente no Neem. No presente estudo, foram testados três óleos que apresentavam diferentes teores de AZA, como foi determinado pela análise cromatográfica (secção 4.1.2.). Caso a AZA fosse a principal responsável pela atividade antimicrobiana do óleo de Neem, os valores mais elevados de halo de inibição deveriam estar associados ao óleo com maior teor de AZA, neste caso o óleo 2. Porém, este facto não se verificou, sendo os valores mais elevados de halo de inibição associados ao óleo 3, um dos óleos com teor de AZA mais baixo. Esta constatação é indicadora de que a AZA, apesar de poder ter alguma influência, não se tratará do principal e/ou único responsável pela atividade antimicrobiana do óleo de Neem. Esta atividade antimicrobiana pode assim dever-se a outros compostos presentes nos óleos que não a AZA. Têm sido descritos na literatura alguns compostos do óleo de Neem com atividade antibacteriana comprovada, tais como o *Nimbolide* e *Mahmoodin* (Bandyopadhyay and Bindu, 2011, Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004). A atividade antimicrobiana verificada neste trabalho poderá dever-se então a estes compostos ou mesmo a outros que estejam presentes no óleo de Neem mas dos quais ainda não se conhece a sua real atividade.

Quando se analisaram globalmente os resultados obtidos com os diferentes óleos, obtiveram-se valores médios de halo de inibição às 24 h de  $12,06 \pm 1,80$  mm,  $13,30 \pm 1,58$  mm e  $20,12 \pm 4,56$  mm para os óleos 1, 2 e 3, respetivamente. Às 48 h obtiveram-se valores médios de halo de inibição de  $14,17 \pm 1,68$  mm,  $15,08 \pm 1,82$  mm e  $22,01 \pm 4,25$  mm para os óleos 1, 2 e 3, respetivamente. A determinação destes valores permitiu pôr em evidência, de entre as três amostras de óleo de Neem testadas, o óleo 3 como o que apresentou uma atividade antimicrobiana mais expressiva. Este facto pôde ser comprovado quando se compararam individualmente, para cada bactéria em estudo, os valores de inibição obtidos

com os três óleos, sendo que os valores dos óleos 1 e 2 foram, para todas as bactérias, estatisticamente diferentes dos do óleo 3 que apresentou valores mais elevados comparativamente a estes. A exceção foi o organismo *E. aerogenes*, para o qual não se detetaram diferenças significativas entre os resultados obtidos com os três óleos ( $p > 0,05$ ), sendo os valores do óleo 3 inferiores aos observados para as restantes bactérias e mais próximos dos restantes óleos.

Para além da avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes amostras de óleo de Neem, também foram alvo de análise formulações comerciais contendo óleo de Neem foram também alvo de análise. Desta avaliação, verificou-se que os três cremes testados apresentavam atividade sobre todas as bactérias em estudo. É de realçar que, tal como verificado com as amostras de óleos, não se observou atividade preferencial dos cremes sobre determinado grupo de Gram, sendo os valores obtidos para as bactérias dos dois grupos extremamente próximos.

Quando se efetuou a comparação dos resultados obtidos com cada creme sobre as diferentes bactérias, foi possível destacar uma ou várias bactérias com suscetibilidade estatisticamente diferente das restantes. No caso do creme B, as bactérias *P. rettgeri* e *B. subtilis* revelaram-se como as significativamente mais suscetíveis a esta matriz, nomeadamente quando comparadas com as restantes bactérias testadas. Já no caso do creme C, as bactérias *S. pyogenes* e *S. aureus* destacaram-se por apresentaram uma suscetibilidade significativamente inferior à verificada com as outras bactérias, tanto às 24 como às 48 h. No que ao creme P diz respeito, destacou-se a suscetibilidade significativamente inferior apresentada pelas bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* às 24 h de incubação. Por outro lado, às 48 h, apenas a bactéria *S. aureus* se destacou como significativamente menos suscetível à ação do creme P.

As formulações comerciais analisadas neste trabalho destinam-se a aplicação tópica com funções hidratante e protetora da pele. Para além disso, a ação que estas formulações possam exercer sobre microrganismos existentes na flora normal da pele ou em patologias associadas à pele reveste-se de extrema importância e pode representar uma mais valia para este tipo de produtos. Ao contrário do que se tinha observado com as amostras de óleo, a bactéria *S. pyogenes*, comum na pele e em patologias da mesma, não apresentou halos de inibição elevados quando colocada em contacto com as formulações comerciais..

À semelhança do verificado com este microrganismo, também a bactéria *S. aureus*, presente frequentemente na pele, apresentou suscetibilidade mais reduzida às formulações comerciais que a observada com as amostras de óleo. Além disso, comparativamente com os resultados obtidos com os cremes sobre as restantes bactérias, o *S. aureus* foi o organismo que apresentou halos de inibição mais baixos.

Apesar dos resultados obtidos para as bactérias *S. pyogenes* e *S. aureus* poderem levar a inferir que não existe vantagem na utilização destes cremes com a função de agentes antimicrobianos em problemas de pele, se a sua utilização for associada com as funções hidratante e protectora dos cremes, pode representar uma mais valia. Apesar de a sua atividade antimicrobiana ser reduzida sobre estas duas bactérias, os cremes apresentam algum tipo de atividade, o que se torna útil num combate primário. Além disso, mesmo não sendo tão comuns em problemas de pele, as restantes bactérias testadas neste trabalho podem encontrar-se na pele em condições mais específicas e podem por isso representar um risco para a integridade desta barreira. Deste modo, a utilização de cremes que tenham ação sobre essas bactérias também pode ter utilidade na prevenção ou tratamento de patologias resultantes da sua presença.

Os microrganismos *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, comuns na pele dos idosos apresentaram tendencialmente valores de inibição bastante expressivos com todos os cremes, destacando-se o organismo *P. mirabilis* com halos de inibição acima dos 15 mm para as três amostras de creme. Já a bactéria *P. aeruginosa*, à semelhança do detetado com os óleos, apresentou valores de halos de inibição inferiores aos do organismo *P. mirabilis*. Apesar disso, a bactéria *P. aeruginosa* revelou uma suscetibilidade às diferentes amostras bastante satisfatória, principalmente ao creme C. Estes resultados são indicadores do potencial sucesso da aplicação destes produtos em problemas de pele associados a esta faixa etária.

A utilização de produtos que atuam sobre os principais agentes causadores de infeções nas úlceras de pressão é também de relevância, ainda mais se a esses mesmos produtos forem associadas outras propriedades como cicatrizante ou hidratante. As três formulações testadas apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos mais associados a infeções em úlceras de pressão, mais especificamente *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Os valores de inibição mais elevados foram observados com o creme P sobre a

bactéria *E. faecalis* (halo de inibição >16 mm). No caso da bactéria *S. aureus* os resultados alcançados pelos três cremes são extremamente próximos entre si, porém tendencialmente mais baixos que os obtidos para as outras duas bactérias. Já no caso da bactéria *P. aeruginosa*, e como referenciado acima, o creme C revelou ser o mais eficaz na sua inibição. É importante acrescentar, que sendo também a bactéria *P. aeruginosa* o principal agente de infecções de feridas em queimados, e uma vez que apresentou suscetibilidade aos três cremes avaliados, estes poderão ser uma alternativa válida no tratamento da pele de doentes queimados.

Nos exemplos anteriormente apresentados, a ação das formulações comerciais sobre os microrganismos mostrou ser importante na prevenção e tratamento de complicações mais graves causadas por microrganismos. Contudo, em alguns casos, este tipo de atividade antimicrobiana poderá não ser vantajosa nem desejável. Em situações ditas não patológicas, muitas das bactérias testadas neste trabalho podem ser habitantes comuns da flora normal da pele, tais como os organismos *S. epidermidis* e *M. luteus*, e são agentes essenciais na proteção da pele contra agentes externos. Desta forma, a utilização de produtos que exerçam ação sobre bactérias da flora normal da pele de uma forma continuada pode ser prejudicial. Este facto torna-se relevante neste estudo, dado que as formulações comerciais testadas, bem como o óleo de Neem incorporado nas mesmas, apresentaram atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos analisados, incluindo os que são comuns na flora normal da pele.

Os organismos microaerofílicos *S. pyogenes* e o *E. faecalis* também foram testados com as formulações comerciais de forma a avaliar se, neste caso, a dependência de oxigénio dos microrganismos teria algum tipo de influência sobre a atividade antimicrobiana das amostras de creme. Tal como observado para as amostras de óleo de Neem, constatou-se que o tipo de dependência de oxigénio não parece condicionar a eficácia antimicrobiana dos cremes. sobre os resultados alcançados. Esta observação é suportada pelo facto de os valores dos halos de inibição obtidos com os três cremes para estas duas bactérias terem sido similares. Além disso, estes valores foram equivalentes aos observados para os outros microrganismos em estudo que apresentavam características diferentes em relação à dependência de oxigénio.

As formulações comerciais avaliadas neste trabalho têm incorporado óleo de Neem, mais precisamente o óleo 2 que foi também analisado neste trabalho. Neste sentido, efetuou-se uma comparação entre os valores de inibição obtidos para o óleo 2 e para os vários cremes, tendo-se verificado, na maioria dos casos, que os valores observados com os cremes foram superiores aos obtidos apenas com óleo 2. Este tipo de resultado sugere que a atividade antimicrobiana apresentada pelos cremes poderá não se dever exclusivamente à presença do óleo de Neem. Tal como se verifica com os óleos, as formulações comerciais são geralmente constituídas por uma diversidade de compostos com diferentes atividades. De facto, as formulações avaliadas neste estudo, além de óleo de Neem, possuíam na sua composição outros produtos de origem natural, nomeadamente extrato de fruta de *Carica papaya* (papaia), óleo de sementes de *Carapa guianensis* (andiroba), óleo de folhas de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) e óleo de folhas de *Aloé barbadensis* (Aloé vera). Estes produtos naturais têm sido descritos como tendo atividade sobre algumas das bactérias testadas, especialmente sobre *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, e *K. pneumoniae* (Aravind et al., 2013, Carson et al., 2006, Grover et al., 2011, Krishna et al., 2008, Shahzad et al., 2009, Shelton, 1991, Packer and Luz, 2007). Por conseguinte, o efeito antimicrobiano observado para estas formulações comerciais poderá dever-se não só à ação do óleo de Neem, mas a uma possível sinergia entre os diferentes componentes naturais presentes nas formulações. Por outro lado, o agente antimicrobiano efetivo poderá ser outro composto presente na formulação que não o óleo de Neem.

Nos ensaios com amostras de creme, o aumento do halo de inibição entre as 24 e 48 h de incubação foi verificado para alguns casos, sendo de interesse referir a bactéria *B. subtilis* que apresentou entre os dois tempos de incubação um aumento do halo de inibição com o creme 1 de 16,50 mm para 20,50 mm e também a bactéria *S. aureus*, cujo halo com o creme 1 aumentou de 9,25 para 13,00 mm entre as 24 e as 48 h, respetivamente. Este tipo de situações, que são possivelmente resultantes das diferentes velocidades de crescimento dos microrganismos e da consistência dos cremes, podem implicar em contexto real a necessidade de um maior tempo de contacto das formulações com a pele para que a sua ação seja máxima. Além disso, é de salientar que os resultados obtidos com os cremes sobre os diferentes microrganismos em laboratório poderão não ser totalmente reprodutíveis em condições reais, uma vez que as características particulares da pele podem diminuir ou aumentar a ação de determinados compostos presentes nas formulações

comerciais. Devem portanto ser realizados testes adicionais antes da aplicação prática, incluindo testes em condições próximas das reais.

Contrariamente ao verificado com os óleos em que foi possível destacar, de entre as três amostras de óleo, uma em que a atividade antimicrobiana era mais intensa, o mesmo não se verificou para os cremes. A determinação das médias globais dos resultados obtidos para cada creme revelou valores médios de halo de inibição às 24 h de  $14,10 \pm 2,97$  mm para o creme B,  $15,06 \pm 2,95$  mm para o creme C e  $15,28 \pm 3,06$  mm para o creme P, enquanto que às 48 h se obtiveram valores de  $15,43 \pm 2,82$  mm para o creme B,  $16,18 \pm 2,70$  mm para o creme C e  $16,91 \pm 2,76$  mm para o creme P. A comparação destes valores possibilitou concluir que os três cremes apresentaram valores médios globais muito próximos, o que não permite destacar, de forma tão evidente como nos óleos, um creme com atividade antimicrobiana mais intensa que os restantes. De qualquer modo, na generalidade, o creme P tendeu a apresentar valores de inibição mais altos que os restantes cremes, mesmo que apenas ligeiramente. Esta observação foi comprovada quando se compararam individualmente para cada bactéria em estudo os valores obtidos com os três cremes, os quais tenderam, na maioria dos casos, a não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p > 0,05$ ).

A constatação de que o creme P apresentou tendencialmente atividade antimicrobiana mais notória pode ajudar a reforçar a ideia de que o óleo de Neem poderá não ser o responsável primordial pela ação antimicrobiana destas formulações, uma vez que este creme é o que possui menor percentagem de óleo de Neem incorporada (2,5%), comparativamente com os 3% presentes nas restantes formulações. A atividade antimicrobiana dos cremes será portanto consequência de um efeito sinérgico entre os diferentes produtos existentes nestas formulações.

De forma a avaliar se a atividade antimicrobiana detetada nas amostras de óleo de Neem e nas formulações comerciais contendo óleo de Neem poderia ser devida à presença da Azadiractina, testou-se a atividade antimicrobiana da AZA pura. Na maioria dos microrganismos não se verificou que a AZA fosse preponderante para a atividade antimicrobiana das amostras. No entanto, no caso da bactéria *K. pneumoniae*, os resultados obtidos parecem sugerir que a AZA contribui para a atividade antimicrobiana observada sobre esta bactéria. De facto, detetaram-se para este organismo diferenças estatisticamente

significativas entre os valores de inibição obtidos com uma solução de AZA em ACN e os valores obtidos apenas com o solvente ACN ( $p=0,005$ ), tanto às 24 como às 48 h. De qualquer modo, para se confirmar esta possibilidade, seria necessário avaliar a atividade da substância pura nas concentrações reais presentes nas diversas matrizes, ou seja, no óleo de Neem e nas formulações comerciais.

Apesar de o teste acima referido fornecer uma indicação do papel da AZA na capacidade de inibição microbiana, é ainda importante referenciar que o padrão usado neste estudo não é constituído apenas por AZA (AZA-A), mas também AZA-B. Desta forma, nos casos em que os resultados indicam uma possível contribuição da AZA para a atividade antimicrobiana, como foi observado para a bactéria *K. pneumoniae*, não é possível determinar se esta se deve ao composto AZA-A ou AZA-B, sendo importante clarificar este resultado através de testes que usem os dois compostos de forma isolada e não em mistura. De qualquer modo, uma vez que a AZA-A é o composto presente em maior percentagem no padrão (70,33%), pode colocar-se a hipótese inicial de ser este o composto responsável pela atividade antimicrobiana observada.

Por fim, é importante referir que se avaliou adicionalmente a atividade antimicrobiana das diferentes amostras em estudo sobre outras três estirpes bacterianas. Estas estirpes eram pertencentes à mesma espécie de três bactérias testadas inicialmente, mais precisamente *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Este teste adicional pretendeu avaliar se estirpes diferentes de uma mesma espécie apresentavam suscetibilidades diferentes quando sujeitas à ação das mesmas amostras. Os resultados obtidos (dados não apresentados) para as estirpes adicionais foram similares aos obtidos para estirpes testadas inicialmente, permitindo concluir que, dentro de uma mesma espécie, a estirpe bacteriana não será preponderante para a obtenção de halos de inibição mais ou menos elevados.



## **CAPÍTULO VI – Conclusão e Perspetivas Futuras**



## 6. Conclusão e perspectivas futuras

### 6.1. Conclusão

Ao longo dos tempos, variadíssimas plantas têm sido alvo de estudos profundos de forma a poder tirar-se o maior proveito delas, sendo uma dessas plantas o Neem. Como referenciado, muitas das porções do Neem bem como todas as suas utilidades não são totalmente conhecidas, o óleo de Neem é um desses casos. O presente trabalho estudou precisamente o óleo de Neem, representando um contributo para o conhecimento mais profundo desta matriz através da avaliação de alguns aspetos importantes para a sua utilização de uma forma mais segura, eficaz e tirando o maior proveito do mesmo.

O método analítico desenvolvido para identificação e quantificação da AZA em amostras de óleo de Neem demonstrou a vantagem da utilização das técnicas cromatográficas, e em particular HPLC, na determinação de compostos em produtos de origem natural. No caso concreto do óleo de Neem, os bons resultados alcançados no doseamento não só da Azadiractina, o principal composto do Neem, mas também do *3-tigloylazadirachtol* (AZA-B), evidenciaram a mais valia da aplicação deste método no doseamento simultâneo de compostos. A avaliação futura da viabilidade de utilização deste tipo de técnica no doseamento de outros compostos de interesse no óleo de Neem, bem como em outros tipos de matrizes, será relevante.

Os teores de AZA e *3-tigloylazadirachtol* obtidos para as amostras de óleo de Neem foram muito diversificados, não tendo sido possível identificar qual a causa desta variação. De qualquer modo, esta constatação permitiu concluir que o óleo de Neem não apresenta um teor de AZA universal, podendo o seu valor variar de acordo com vários fatores. Alguns dos fatores apontados para esta situação são a qualidade das sementes que deram origem aos óleos e o processo de extração. Estes dois fatores são considerados cruciais para a qualidade do óleo de Neem, bem como para o teor de AZA e de outros compostos presentes no mesmo.

A avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural é também de extrema valia, uma vez que dada a problemática de resistência aos antibióticos, a descoberta de novos agentes com atividade antimicrobiana é urgente e de elevada

importância. No presente trabalho, os estudos da atividade antimicrobiana do óleo de Neem mostraram uma atividade satisfatória deste produto sobre todas as bactérias testadas. Estes resultados indiciam que a utilização de óleo de Neem em formulações poderá ser uma vantagem, ainda que não de uma forma isolada mas de forma sinérgica com outros produtos/compostos. Esta vantagem torna-se evidente quando se analisam os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana de formulações comerciais contendo óleo de Neem, apresentaram de um modo geral valores mais elevados relativamente ao óleo de Neem, demonstrando que a associação do óleo com outros produtos potencia a atividade antimicrobiana das formulações.

Uma das substâncias mais relevantes do Neem é a Azadiractina, tendo sido apontada como um potencial agente com atividade antimicrobiana, e possível responsável pela atividade antimicrobiana do óleo de Neem. No entanto, os resultados alcançados levaram a que a hipótese de este composto ser o principal responsável fosse refutada. Desta forma, foram sugeridos como responsáveis pela ação do óleo de Neem outros compostos, ou mesmo um sinergismo entre os diversos compostos presentes, incluindo a Azadiractina, que, apesar de reduzida, ainda apresenta alguma atividade antimicrobiana.

No caso concreto do óleo de Neem e das formulações comerciais em estudo, é ainda importante salientar a atividade demonstrada por estas amostras sobre microrganismos comuns ao nível de problemas de pele. Deste modo, a incorporação do óleo de Neem em produtos de aplicação tópica pode representar uma mais valia, situação que ficou evidente com os resultados obtidos com as formulações comerciais testadas.

Em resumo, o presente trabalho permitiu atingir para os diferentes produtos analisados resultados que são promissores e que, na sua maioria, são concordantes com estudos previamente publicados. Os resultados deste estudo permitiram constatar as mais valias e as diversas aplicações que podem estar associadas aos produtos de origem de natural, bem como realçar a importância de um conhecimento profundo dos mesmos, para que estes se possam assumir como alternativas viáveis e seguras aos produtos de síntese. De qualquer modo, revelam-se necessários mais ensaios para que se estudem melhor este tipo de produtos, e assim se aproveite melhor o potencial que estes têm para oferecer.

## 6.2. Perspetivas futuras

Apesar da AZA ser um dos compostos de maior interesse do Neem, e em concreto do óleo de Neem, outros compostos são associados a este óleo e podem ser de grande utilidade. Neste sentido, a determinação do teor destes compostos no óleo de Neem pode ser uma mais valia de forma a poder tirar o maior proveito e utilizar com a máxima segurança esta matriz. Para além disto, a otimização do método analítico utilizado neste estudo para outro tipo de matrizes pode representar uma vantagem. No presente momento, encontra-se em processo de otimização um método para identificação e quantificação da AZA em formulações comerciais contendo óleo de Neem, mais precisamente cremes.

Este estudo permitiu verificar que a AZA não será o principal responsável pela atividade antimicrobiana do óleo de Neem. Deste modo, a análise da atividade antimicrobiana de outras substâncias presentes no óleo de Neem revela-se importante de forma a averiguar qual ou quais os compostos que são responsáveis por tal atividade. Poderá ser interessante seguir uma estratégia semelhante para as formulações comerciais, mas, neste caso, avaliando o potencial antimicrobiano dos compostos que estão presentes nessas formulações, além do óleo de Neem. Caso o objetivo seja obter o máximo de ação antimicrobiana com a aplicação das formulações comerciais, a perceção de quais os compostos são responsáveis por essa atividade permitirá depois ajustar e otimizar as proporções presentes nas formulações de forma a alcançar o máximo de atividade.

Além da determinação da suscetibilidade de diferentes microrganismos aos diferentes compostos presentes no óleo de Neem e formulações comerciais, bem como às próprias matrizes, será interessante a determinação da concentração a partir da qual a sua atividade antimicrobiana existe (MIC). Esta informação poderá ser um aliado importante na definição da percentagem dos diferentes compostos a incorporar em futuras formulações comerciais. Além disso, poderá ser relevante avaliar a suscetibilidade de outros grupos de microrganismos além das bactérias, tais como fungos e parasitas.



## **CAPÍTULO VII – Referências Bibliográficas**



## 7. Referências Bibliográficas

- AARATI, N., RANGANATH, N., SOUMYA, G., KISHORE, B. & MITHUN, K. 2011. Evaluation of antibacterial and Anticandidial Efficacy of Aqueous and Alcoholic Extract of Neem (*Azadirachta indica*) an in vitro study. *IJRAP*, 2, 230-235.
- AERTS, R. & MORDUE, A. J. 1997. Feeding Deterrence and Toxicity of Neem Triterpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 2117-2132.
- AHMAD, I. & BEG, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 113-123.
- ALVES, P. D., BRANDÃO, M. G. L., NUNAN, E. A. & VIANNA-SOARES, C. D. 2009. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., *Meliaceae*) leaves hydroalcoholic extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 510-515.
- AMBROSINO, P., FRESA, R., FOGLIANO, V., MONTI, S. M. & RITIENI, A. 1999. Extraction of Azadirachtin A from Neem Seed Kernels by Supercritical Fluid and Its Evaluation by HPLC and LC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5252-5256.
- ARAVIND, G., DEBJIT, B., DURAIVEL, S. & HARISH, G. 2013. Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1, 7-25.
- ASIF, M. 2012. Antimicrobial Potential Of *Azadirachta Indica* Against Pathogenic Bacteria And Fungi. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1, 79-84.
- ATAWODI, S. & ATAWODI, J. 2009. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews*, 8, 601-620.
- AWOLU, O. O., OBAFAYE, R. O. & AYODELE, B. S. 2013. Optimization of Solvent Extraction of Oil from Neem (*Azadirachta indica*) and Its Characterizations *Journal of Scientific Research and Reports*, 2, 304-314.
- BANDYOPADHYAY, U. & BINDU, S. 2011. Beneficial Effect of Neem on Human Health. In: AKHLAQ A. FAROOQUI ET AL., P. (ed.) *Phytochemicals and Human Health*. Nova Science Publishers, Inc.
- BARREK, S., PAISSE, O. & GRENIER-LOUSTALOT, M.-F. 2004. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 753-763.
- BILTON, J. N., BROUGHTON, H. B., JONES, P. S., LEY, S. V., RZEPA, H. S., SHEPPARD, R. N., SLAWIN, A. M. Z., WILLIAMS, D. J., LIDERT, Z. & DAVID MORGAN, E. 1987. An x-ray crystallographic, mass spectroscopic, and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives. *Tetrahedron*, 43, 2805-2815.
- BINDER, C., MARX, D., BINDER, L., SCHAUER, A. & HIDDEMANN, W. 1996. Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer. *Annals of Oncology*, 7, 129-133.
- BISWAS, K., CHATTOPADHYAY, I., BANERJEE, R. K. & BANDYOPADHYAY, U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, 82, 1336-1345.
- BRAHMACHARI, G. 2004. Neem—An Omnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem*, 5, 408-421.
- BRITO, N. M., DE AMARANTE JUNIOR, U. P., POLESE, L. & RIBEIRO, M. L. 2003. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 129-146.
- CALIXTO, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 179-189.
- CARSON, C. F., HAMMER, K. A. & RILEY, T. V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 50-62.
- CASTRO, E. S., OLIVEIRA, D. B., FARIAS, S. S., GARGANO, R. & MARTINS, J. L. 2014. Structure and electronic properties of azadirachtin. *Journal of Molecular Modeling*, 20, 1-7.
- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21, 99-105.
- CHASIN, A. A. D. M., NASCIMENTO, E. D. S., RIBEIRO-NETO, L. M., DE SIQUEIRA, M. E. P. B., ANDRAUS, M. H., SALVADORI, M. C., DE FERNÍCOLA, N. A. G., GORNI, R. & SALCEDO, S. 1998. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11, 1-6.
- CHATTOPADHYAY, I., NANDI, B., CHATTERJEE, R., BISWAS, K., BANDYOPADHYAY, U. & BANERJEE, R. K. 2004. Mechanism of antiulcer effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract: effect on H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, oxidative damage and apoptosis. *Inflammopharmacology*, 12, 153-176.

- CHINNASAMY, N., HARISHANKAR, N., UDAY KUMAR, P. & RUKMINI, C. 1993. Toxicological studies on debitterized neem oil (*Azadirachta indica*). *Food and Chemical Toxicology*, 31, 297-301.
- CLSI 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement *M100-S22*, 32 (3).
- DA CUNHA, A. P. & ROQUE, O. R. 2009. Interesse da Indústria Farmacêutica pelas Matérias-primas Vegetais. In: CUNHA, A. P. D. (ed.) *Farmacognosia e Fitoquímica*. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- DAI, J., YAYLAYAN, V. A., VIJAYA RAGHAVAN, G. S., PARÈ, J. R. & LIU, Z. 2001. Multivariate Calibration for the Determination of Total Azadirachtin-Related Limonoids and Simple Terpenoids in Neem Extracts Using Vanillin Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1169-1174.
- DAI, J., YAYLAYAN, V. A., VIJAYARAGHVAN, G. S. & PARE, J. R. 1999. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin related limonoids in neem seed kernel. *Agri. Food Chem.*, 47, 3738-3742.
- DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B. & VIEIRA, P. C. 1998. Cromatografia: um breve ensaio. Atualidades em Química. *Química Nova na Escola*, 7, 21-25.
- DEOTA, P. T., UPADHYAY, P. R., PATEL, K. B., MEHTA, K. J., KAMATH, B. V. & MEHTA, M. H. 2000. Estimation and Isolation of Azadirachtin-A from Neem [*Azadirachta indica* A. JUSS] seed Kernels using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 2225-2235.
- DEWICK, P. M. 2009. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons, Ltd.
- FORIM, M. R., CORNÉLIO, V. E., DAS G. F. DA SILVA, M. F., RODRIGUES-FILHO, E., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., MATINEZ, S. S., NAPOLITANO, M. P. & YOST, R. A. 2010a. Chemical characterization of *Azadirachta indica* grafted on *Melia azedarach* and analyses of azadirachtin by HPLC-MS-MS (SRM) and meliatoxins by MALDI-MS. *Phytochemical Analysis*, 21, 363-373.
- FORIM, M. R., DA SILVA, M. F. D. G. F., CASS, Q. B., FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. 2010b. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. *Analytical Methods*, 2, 860-869.
- FORIM, M. R., MATOS, A. P., SILVA, M. F. D. G. F. D., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. 2010c. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de Nim: reprodutibilidade da ação inseticida. *Química Nova*, 33, 1082-1087.
- FREIRE, M. T. D. A., BOTTOLI, C. B. G., FABRIS, S. & REYES, F. G. R. 2008. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. *Química Nova*, 31, 1522-1532.
- GAJANAN, M. 2012. Antibacterial Activity Of *Azadirachta indica* A. Juss. Leaves Extracts Against Skin Pathogens. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*, 2, 33-35.
- GOVINDACHARI, T. R., NARASIMHAN, N. S., SURESH, G., PARTHO, P. D. & GOPALAKRISHNAN, G. 1996. Insect antifeedant and growth-regulating activities of Salannin and other c-seco limonoids from neem oil in relation to Azadirachtin. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 1453-1461.
- GRIMALT, S., THOMPSON, D. G., COPPENS, M., CHARTRAND, D. T., SHORNEY, T., MEATING, J. & SCARR, T. 2011. Analytical Study of Azadirachtin and 3-Tigloylazadirachtol Residues in Foliage and Phloem of Hardwood Tree Species by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8070-8077.
- GROVER, A., BHANDARI, B. S. & RAI, N. 2011. Antimicrobial Activity of Medicinal plants- *Azadirachta indica* A. Juss, *Allium cepa* L. and *Aloe vera* L. *International Journal of PharmTech Research*, 3, 1059-1065.
- GUALTIERI, M. J. G., GONZÁLEZ, M. C., CONTRERAS, K. P., NOGUERA, M. C., UZCÁTEGUI, E. E., VILLASMIL, S. & VILLALTA, C. 2008. Evaluation of the antimicrobial activity of *Azadirachta indica* ethanolic extracts. *Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”*, 39, 12-16.
- HANSEN DALE, J., CUOMO, J., KHAN, M., GALLAGHER REX, T. & ELLENBERGER WILLIAM, P. 1993. Advances in Neem and Azadirachtin Chemistry and Bioactivity. *Natural and Engineered Pest Management Agents*. American Chemical Society.
- HARISH KUMAR, G., CHANDRA MOHAN, K. V. P., JAGANNADHA RAO, A. & NAGINI, S. 2009. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. *Investigational New Drugs*, 27, 246-252.

- HARISH KUMAR, G., VIDYA PRIYADARSINI, R., VINOOTHINI, G., VIDJAYA LETCHOUMY, P. & NAGINI, S. 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *Investigational New Drugs*, 28, 392-401.
- HASHMAT, I., AZAD, H. & AHMED, A. 2012. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An overview. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1, 76-79.
- HEMALATHA, K., VENUGOPAL, N. B. K. & RAO, B. S. 2001. Determination of Azadirachtin in Agricultural Matrixes and Commercial Formulations by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of AOAC International*, 84, 1001-1010.
- HUANG, H.-P. & MORGAN, E. D. 1990. Analysis of azadirachtin by supercritical-fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 519, 137-143.
- HULL JR, C. J., DUTTON, W. R. & SWITZER, B. S. 1993. Quantitation of azadirachtins in insecticidal formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 633, 300-304.
- ISAH, A. B., IBRAHIM, Y. K. E. & IWALEWA, E. O. 2003. Evaluation of the antimalarial properties and standardization of tablets of *Azadirachta indica* (Meliaceae) in mice. *Phytotherapy Research*, 17, 807-810.
- JAHAN, T., BEGUM, Z. A. & SULTANA, S. 2007. Effect of neem oil on some pathogenic bacteria. *Bangladesh J Pharmacol*, 2, 71-72.
- JAUCH, J. 2008. Total Synthesis of Azadirachtin—Finally Completed After 22 Years. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 34-37.
- JOHNSON, S. & MORGAN, E. D. 1997. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Journal of Chromatography A*, 761, 53-63.
- JOHNSON, S., MORGAN, E. D. & PEIRIS, C. N. 1996. Development of the Major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem (*Azadirachta indica*). *Annals of Botany*, 78, 383-388.
- KAUSHIK, N. 2002. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 1199-1204.
- KAZUSAKI, M., UEDA, S., TAKEUCHI, N. & OHGAMI, Y. 2012. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatography*, 33, 65-73.
- KI, V. & ROTSTEIN, C. 2008. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 19, 173-184.
- KLENK, A., BOKEL, M. & KRAUS, W. 1986. 3-Tigloylazadirachtol (tigloyl = 2-methylcrotonoyl), an insect growth regulating constituent of *Azadirachta indica*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 523-524.
- KOONA, S. & BUDIDA, S. 2011. Antibacterial Potential of the Extracts of the Leaves of *Azadirachta indica* Linn. *Not Sci Biol*, 3, 65-69.
- KORIEEM, K. M. M. 2013. Review on pharmacological and toxicological effects of oleum azadirachtii oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 834-840.
- KRISHNA, K. L., PARIDHAVI, M. & PATEL, J. A. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural Product Radiance*, 7, 364-373.
- KUMAR, J. & PARMAR, B. S. 1996. Physicochemical and Chemical Variation in Neem Oils and Some Bioactivity Leads against *Spodoptera litura* F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2137-2143.
- KUMAR, N., KANT1, R., SINAGA, M., YIMAME, B. & BELACHEW, T. 2012. Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial evaluation of the leaf and root extract of *Azadirachta indica* Plant. *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research*, 2, 32-41.
- KUMAR, P. S., MISHRA, D., GHOSH, G. & PANDA, C. 2010. Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae)" an Overview *Annals of Biological Research*, 1, 24-341.
- KUPIEC, T. C. 2004a. Quality-Control Analytical Methods: Gas Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8, 305-309.
- KUPIEC, T. C. 2004b. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8, 223-227.
- LARI, A. R. A. R. & ALAGHEHBANDAN, R. R. 2000. Nosocomial infections in an Iranian burn care center. *Burns*, 26, 737-740.
- LAUBE, S. 2004. Skin infections and ageing. *Ageing Research Reviews*, 3, 69-89.
- LERTZMAN, B. H. & GASPARI, A. A. 1996. Drug treatment of skin and soft tissue infections in elderly long-term care residents. *Drugs Aging*, 9, 109-21.

- LEY, S. V., ABAD-SOMOVILLA, A., ANDERSON, J. C., AYATS, C., BÄNTELI, R., BECKMANN, E., BOYER, A., BRASCA, M. G., BRICE, A., BROUGHTON, H. B., BURKE, B. J., CLEATOR, E., CRAIG, D., DENHOLM, A. A., DENTON, R. M., DURAND-REVILLE, T., GOBBI, L. B., GÖBEL, M., GRAY, B. L., GROSSMANN, R. B., GUTTERIDGE, C. E., HAHN, N., HARDING, S. L., JENNENS, D. C., JENNENS, L., LOVELL, P. J., LOVELL, H. J., DE LA PUENTE, M. L., KOLB, H. C., KOOT, W.-J., MASLEN, S. L., MCCUSKER, C. F., MATTES, A., PAPE, A. R., PINTO, A., SANTAFIANOS, D., SCOTT, J. S., SMITH, S. C., SOMERS, A. Q., SPILLING, C. D., STELZER, F., TOOGOOD, P. L., TURNER, R. M., VEITCH, G. E., WOOD, A. & ZUMBRUNN, C. 2008. The Synthesis of Azadirachtin: A Potent Insect Antifeedant. *Chemistry – A European Journal*, 14, 10683-10704.
- LEY, S. V., DENHOLM, A. A. & WOOD, A. 1993. The chemistry of azadirachtin. *Natural Product Reports*, 10, 109-157.
- LEY, S. V., LOVELL, H. & WILLIAMS, D. J. 1992. Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica*, Part 14: absolute configuration of azadirachtin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1304-1306.
- LIAUW, M. Y., NATAN, F. A., WIDIYANTI, P., IKASARI, D., INDRASWATI, N. & SOETAREDJO, F. E. 2008. Extraction of Neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n-hexane and ethanol: studies of oil quality, kinetic and thermodynamic. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.*, 3, 49-54.
- MAITY, P., BISWAS, K., CHATTOPADHYAY, I., BANERJEE, R. K. & BANDYOPADHYAY, U. 2009. The use of neem for controlling gastric hyperacidity and ulcer. *Phytotherapy Research*, 23, 747-755.
- MALVIYA, R., BANSAL, V., PAL, O. P. & SHARMA, P. K. 2010. High performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Techonology*, 2, 22-26.
- MARAGATHAVALLI, S., BRINDHA, S., KAVIYARASI, N. S., B. ANNADURAI, B. & GANGWAR, S. K. 2012. Antimicrobial Activity in Leaf Extract of Neem (*Azadirachta indica* Linn.). *International Journal of Science and Nature*, 3, 110-113.
- MCPOLIN, O. 2009. *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis*, Mourne Training Services.
- MEHROTRA, S., SRIVASTAVA, A. K. & NANDI, S. P. 2010. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 2473-2478.
- MELWITA, E. & JU, Y.-H. 2010. Separation of azadirachtin and other limonoids from crude neem oil via solvent precipitation. *Separation and Purification Technology*, 74, 219-224.
- MORAES, G. L. D. A., DE ARAÚJO, T. M., CAETANO, J. Á., LOPES, M. V. D. O. & DA SILVA, M. J. 2012. Evaluation of the risk for pressure ulcers in bedridden elderly at home. *Acta Paul Enferm*, 25, 7-12.
- MORDUE, A. J. & NISBET, A. J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29, 615-632.
- MORGAN, E. D. 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4096-4105.
- ONCUL, O., YÜKSEL, F., ALTUNAY, H., AÇIKEL, C., ÇELİKÖZ, B. & ÇAVUŞLU, Ş. 2002. The evaluation of nosocomial infection during 1-year-period in the burn unit of a training hospital in Istanbul, Turkey. *Burns*, 28, 738-744.
- OYINBO, K., MUNGADI, A. G. & DANJUMA, J. B. 2013. The effect of Neem oil (*Azadirachta indica* oil) on Pathogens isolated from adult skin. *International Journal of Engineering and Social Sciences*, 3, 25-31.
- PACKER, J. F. & LUZ, M. M. S. D. 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 102-107.
- PAES, J. B., SOUZA, A. D. D., LIMA, C. R. D. & MEDEIROS NETO, P. N. D. 2011. Eficiência dos óleos de nim (*Azadirachta indica*) e de mamona (*Ricinus communis*) na proteção da madeira de sumaúma (*Ceiba pentandra*) contra cupins xilófagos em ensaio de preferência alimentar. *Revista Árvore*, 35, 751-758.
- PARIDA, M. M., UPADHYAY, C., PANDYA, G. & JANA, A. M. 2002. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 273-278.
- PAUL, R., PRASAD, M. & SAH, N. K. 2011. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): A mini review. *Cancer Biology & Therapy*, 12, 467-476.
- PINTO, J. S. D. S. & LANÇAS, F. M. 2010. Hidrólise do óleo de *Azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. *Química Nova*, 33, 394-397.

- PRAKASH, G., BHOJWANI, S. & SRIVASTAVA, A. 2002. Production of azadirachtin from plant tissue culture: State of the art and future prospects. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 185-193.
- RAMESH, A. & BALASUBRAMANIAN, M. 1999. Rapid preconcentration method for the determination of azadirachtin-A and -B, nimbin and salannin in neem oil samples by using graphitised carbon solid phase extraction. *Analyst*, 124, 19-21.
- RAO, D. V. K., SINGH, I., CHOPRA, P., CHABRA, P. C. & RAMANJULU, G. 1986. *In vitro* antibacterial activity of neem oil. *Indian J. Med. Res.*, 84, 314-316.
- RATHOD, G. P., KOTECHA, B. M., SHARMA, R., AMIN, H. & PRAJAPATI, P. K. 2012. *In vitro* Antibacterial study of two commonly used medicinal plants in Ayurveda: Neem (*Azadirachta indica* L.) and Tulsi (*Ocimum sanctum* L.). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3, 582-586.
- RAVICHANDRAN, V., SHALINI, S., SUNDRAM, K. M. & HARISH, R. 2010. Validation of Analytical Methods – Strategies & Importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 18-22.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- ROCHA, J. A., MIRANDA, M. J. & ANDRADE, J. 2006. ABORDAGEM TERAPÊUTICA DAS ÚLCERAS DE PRESSÃO - Intervenções baseadas na evidência. *Acta Med Por*, 19, 29-38.
- RUKMINI, C. 1987. Chemical and nutritional evaluation of neem oil. *Food Chemistry*, 26, 119-124.
- RUSCUE, C. N. E. 1972. Growth disruption effects of an insect antifeedant. *Nature New Biology*, 236, 159-160.
- SAIRAM, M., ILAVAZHAGAN, G., SHARMA, S. K., DHANRAJ, S. A., SURESH, B., PARIDA, M. M., JANA, A. M., DEVENDRA, K. & SELVAMURTHY, W. 2000. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 377-382.
- SARAI, G., CABONI, P., SARRITZU, E., RUSSO, M. & CABRAS, P. 2008. A Simple and Selective Method for the Measurement of Azadirachtin and Related Azadirachtoid Levels in Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2939-2943.
- SARMIENTO, W. C., MARAMBA, C. C. & GONZALES, M. L. M. 2011. An In-vitro Study on the Antibacterial Effect of Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract on Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PIDSP Journal*, 2, 40-45.
- SCHAAF, O., JARVIS, A. P., VAN DER ESCH, S. A., GIAGNACOVO, G. & OLDHAM, N. J. 2000. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 886, 89-97.
- SCHMUTTERER, H. 1990. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta Indica*. *Annual Review of Entomology*, 35, 271-297.
- SCHÜTZ, S., WENGATZ, I., GOODROW, M. H., GEE, S. J., HUMMEL, H. E. & HAMMOCK, B. D. 1997. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Azadirachtins†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2363-2368.
- SHAHZAD, K., AHMAD, R., NAWAZ, S., SAEED, S. & IQBAL, Z. 2009. Comparative Antimicrobial Activity of *Aloe vera* gel on microorganisms of Public Health significance. *Pharmacologyonline*, 1, 416-423.
- SHARMA, V., WALIA, S., KUMAR, J., NAIR, M. G. & PARMAR, B. S. 2003. An Efficient Method for the Purification and Characterization of Nematicidal Azadirachtins A, B, and H, Using MPLC and ESIMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3966-3972.
- SHELTON, R. M. 1991. *Aloe vera - Its Chemical and Therapeutic Properties*. *International Journal of Dermatology*, 30, 679-683.
- SHIBUYA, H., TERASHI, H., KURATA, S., ISHII, Y., TAKAYASU, S., MURAKAMI, I., TAKASAKI, S., NAWATA, T. & NOGUCHI, T. 1994. Gas gangrene following sacral pressure sores. *J. Dermatol.*, 21, 518-523.
- SIDHU, O. P., KUMAR, V. & BEHL, H. M. 2003. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with Respect to Azadirachtin Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 910-915.
- SOARES DE MACEDO, J. L. & SANTOS, J. B. 2006. Infectious complications in burn patients. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.*, 21, 108-111.
- SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H. R. N. & PIETRO, R. C. L. R. 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 435-440.

- SUNDARAM, K. M. S. & CURRY, J. 1993. High performance liquid chromatographic method for the analysis of azadirachtin in two commercial formulations and neem oil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 28, 221-241.
- THEJAVATHI, R., YAKKUNDI, S. R. & RAVINDRANATH, B. 1995. Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of Chromatography A*, 705, 374-379.
- THOH, M., BABAJAN, B., RAGHAVENDRA, P. B., SURESHKUMAR, C. & MANNA, S. K. 2011. Azadirachtin Interacts with Retinoic Acid Receptors and Inhibits Retinoic Acid-mediated Biological Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 4690-4702.
- TOLOSA, I., READMAN, J. W. & MEE, L. D. 1996. Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. *Journal of Chromatography A*, 725, 93-106.
- UPADHYAY, R. K., DWIVEDI, P. & SHOEB, A. 2010. Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian Journal of Medicinal Sciences*, 2, 152-158.
- VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. & MACIEL, M. A. M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28, 519-528.
- VEITCH, G. E., BECKMANN, E., BURKE, B. J., BOYER, A., MASLEN, S. L. & LEY, S. V. 2007. Synthesis of Azadirachtin: A Long but Successful Journey. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 7629-7632.
- VEITCH, G. E., BOYER, A. & LEY, S. V. 2008a. The Azadirachtin Story. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 9402-9429.
- VEITCH, G. E., PINTO, A., BOYER, A., BECKMANN, E., ANDERSON, J. C. & LEY, S. V. 2008b. Synthesis of Natural Products from the Indian Neem Tree *Azadirachta indica*. *Organic Letters*, 10, 569-572.
- VINOTH, B., MANIVASAGAPERUMAL, R. & RAJARAVINDRAN, M. 2012. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of *Azadirachta indica* A. *Juss. International Journal of Research in Plant Science*, 2, 50-55.
- WARRA, A. 20012. Medicinal and Cosmetic Potential of Neem (*Azadirachta Indica*) Seed Oil: A Review *Research and Reviews: Journal of Medicinal Chemistry*, 1, 5-8.
- ZANNO, P. R., MIURA, I., NAKANISHI, K. & ELDER, D. L. 1975. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Application of PRFT/CWD [partially relaxed Fourier transform/continuous wave decoupling] carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 1975-1977.
- ZHANG, Y.-Q., XU, J., YIN, Z.-Q., JIA, R.-Y., LU, Y., YANG, F., DU, Y.-H., ZOU, P., LV, C., HUA, T.-X., LIU, S.-L., SHU, G. & YI, G. 2010. Isolation and identification of the antibacterial active compound from petroleum ether extract of neem oil. *Fitoterapia*, 81, 747-750.

## **Anexos**



## **Anexo I – Composição dos meios de cultura utilizados**

### ***Meio Nutrient Broth***

<b>Composição</b>	<b>(g/L)</b>
<b>Extrato de carne</b>	1,0
<b>Extrato de levedura</b>	2,0
<b>Peptona</b>	5.0
<b>Cloreto de sódio</b>	5.0
<b>pH = 6.8 ± 0.2 at 25 °C</b>	

### ***Meio Mueller-Hinton***

<b>Composição</b>	<b>(g/L)</b>
<b>Extrato de carne</b>	2,0
<b>Hidrolisado ácido de caseína</b>	17,5
<b>Amido</b>	1,5
<b>Agar</b>	15,0
<b>pH = 7.3 ± 0.1</b>	