

## Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L.<sup>1</sup>

Roberto F. Vieira<sup>1\*</sup>; Renée J. Grayer<sup>2</sup>; Alan Paton<sup>2</sup>; James E. Simon<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, 70770-990, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup> Royal Botanical Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB, U.K.

<sup>3</sup> Cook College, Rutgers University, New Brunswick, NJ, 08901-8520, USA.

### Introdução

As alfavacas, ou alfavacão (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae), é uma espécie comumente utilizada na medicina popular na América do Sul<sup>2</sup>, e África<sup>12,13</sup>. Esta espécie é também uma importante fonte comercial de eugenol na Índia, onde vem sendo cultivada<sup>19</sup>.

O centro de origem de *Ocimum gratissimum* é a África, e apesar de muitos estudos a respeito dos constituintes químicos de seus óleos essenciais, a taxonomia infraespecífica desta espécie permanece ainda confusa<sup>15</sup>. A espécie é subdividida em duas variedades: *O. gratissimum* var. *gratissimum*, a qual possui folhas e ramos pubescentes, e inflorescência densa; e *O. gratissimum* var. *macrophyllum*, que apresenta folhas e ramos glabros, com inflorescência aberta<sup>1,15</sup>. *O. gratissimum* apresenta uma larga variabilidade morfológica, especialmente em relação ao indumento das folhas e inflorescências, o que torna difícil o uso destes caracteres como indicador taxonômico.

Guenther<sup>10</sup> relata que os óleos essenciais de *O. gratissimum* podem ser divididos em dois grupos, o primeiro com alto teor de eugenol, e o segundo com alto teor de timol. A composição química dos óleos essenciais de *O. gratissimum* relatada na literatura confirma a divisão estabelecida por Guenther<sup>10</sup>. Diversas plantas ricas em timol<sup>8,12,13,14,16,18</sup>, e ricas em eugenol<sup>6,7,9,11,22</sup> tem sido relatadas na literatura. Mais recentemente, um terceiro tipo químico, rico em geraniol foi relatado<sup>5</sup>.

A família Lamiaceae é também rica em muitos tipos de flavonóides, os quais tem sido frequentemente usados com propósitos quimiotaxonômicos<sup>20</sup>. Estes compostos são encontrados na superfície das folhas, ramos e inflorescências de plantas, e são armazenados em pelos glandulares especiais<sup>3</sup>.

O objetivo deste trabalho é determinar se estes metabólitos secundários podem ser usados como marcadores taxonômicos em *O. gratissimum*. Este trabalho pretende auxiliar na identificação taxonômica e diferenciação da variabilidade existente entre acessos de *O. gratissimum*.

### Material e Métodos

**Material:** Doze acessos de *Ocimum gratissimum* (Tabela 1) foram cultivados em Purdue University Research Station, West Lafayette, USA em experimento em blocos completamente ao acaso com quatro indivíduos em cada uma das três repetições. A planta inteira foi colhida de cada indivíduo em cada bloco em plena floração, colocadas em saco de papel e secas em estufa de ar circulante a 38 °C por 15 dias para análise dos óleos essenciais. Excicatas de cada acessos foram coletadas e depositadas no herbário da Purdue University (POU). Duplicatas foram enviados aos herbários de Kew Gardens (K) e Delaware State University (DOL) para coleção permanente.

**Extração e Análise dos Óleos Essenciais:** Os óleos voláteis foram extraídos de amostras secas em balões de 2 l com água destilada usando aparelho Clevenger, conforme descrito em Charles and Simon<sup>4</sup>. Os óleos essenciais foram analisados em Cromatografo a Gás modelo Varian, equipado com FID e integrador eletrônico 4270. Uma coluna capilar de sílica (30 m x 0,25 mm ID) com RSL-200 fase fixa (Altech, 5% fenil, 95% metilpolisiloxano) foi usada. Hélio foi usado como gás carreador e a temperatura do forno foi estabelecida à 80 °C por 2 min e programado para aumentar a 3 °C/min à 160 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 180 °C e 300 °C, respectivamente. A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi confirmada por cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massas usando modelo 4000<sup>4</sup>.

**Flavonóides:** A extração, identificação e quantificação dos flavonóides foi realizada conforme descrito em Vieira<sup>21</sup>.

### Resultados e Discussão

Houve uma interessante correlação entre os perfis dos constituintes dos flavonóides e dos óleos essenciais. Os acessos contendo altos teores de flavonóides (ot26 e ot65) apresentaram alto teor de timol, enquanto que os acessos contendo baixo teor de flavonóides (ot27, ot63, and ot85) tinham alto teor de eugenol (Tabela 2). O acesso ot84, que apresentou um teor intermediário de flavonóides, apresentou geraniol como seu principal constituinte do óleo essencial. É possível que os acessos ricos em eugenol contenham baixo teor de flavonóides porque eugenol, sendo um fenilpropanóide, pode competir com mais sucesso que os flavonóides pelo mesmo aminoácido precursor, a fenilalanina, da mesma via metabólica. Pode não haver o mesmo tipo de competição entre os flavonóides e timol e geraniol, ambos terpenos, oriundos da via do ácido mevalônico.

As observações morfológicas e de campo dos acessos de *O. gratissimum* nos permitiram identificar 6 acessos dentro desta espécie, baseado principalmente no indumento foliar e dos ramos, bem como formato da inflorescência. Diferenças no formato e tamanho das folhas também foram observadas (Tabela 3). A análise dos óleos essenciais de todos acessos nos

<sup>1</sup> Este artigo representa uma parte do original publicado na íntegra na revista *Biochemical Systematic and Ecology*, 29/3: 287-304.

**Tabela 1.** Lista de acessos de *Ocimum gratissimum*, origem, crescimento e teor de óleo essencial, cultivados na Purdue University, West Lafayette, IN, USA

Acesso	Origem	Denominação do acesso	Altura (cm)	Peso fresco total (g)	Peso seco total (g)	% óleo essencial (g peso seco)
ot17	USA	USDA <sup>a</sup> , PI211715	64±2,9	536,5±90	151,2±26,5	0,72±0,11
ot24	Russia	BRA116 <sup>b</sup>	57,3±3,8	422,8±96,1	107,8±19,5	0,31±0,04
ot26	Brazil	BRA043	59±3,6	505±122	125,9±29	0,33±0,12
ot27	Brazil	BRA078	49±2,2	441,5±51,5	105,4±14	0,49±0,09
ot52	USA	East Indian, Richters <sup>c</sup>	63±3,2	436±127,8	113,5±31,5	0,46±0,18
ot63	USA	Tree, Richters	51,5±3	280±72,8	68,4±16,1	0,45±0,08
ot65	USA	Green, Richters	53,3±2,4	326,8±21,2	83,6±5,5	0,44±0,13
ot84	USA	Purdue University <sup>d</sup> (tipo geraniol)	60,8±3	618,3±77,5	149±26	1,66±0,62
ot85	USA	Purdue University (tipo eugenol)	51,3±3,4	500,5±280	133,8±70,5	0,50±0,22

<sup>a</sup> USDA, United States Plant Introduction Center, Ames, Iowa

<sup>b</sup> Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Brasil.

<sup>c</sup> Richters Co., Goodwood, Ontario, Canada.

<sup>d</sup> Purdue University, West Lafayette, Indiana.

**Tabela 2.** Porcentagem relativa de flavonas do total de flavonóides presentes em cada extrato dos acessos de *Ocimum gratissimum*

Flavonóides <sup>a</sup>	Raças químicas de <i>Ocimum gratissimum</i>						
	Eugenol (ot27)	Eugenol (ot52)	Eugenol (ot63)	Eugenol (ot85)	Geraniol (ot84)	Timol (ot26)	Timol (ot65)
	(percentagem relativa do total de flavonoides) <sup>b</sup>						
xantomicrol					8,75±6,9	89,8±3,1	86,8±0,5
cirsimaritina	100±0	100±0	100±0	100±0	66±4,4	10,0±2,8	11,8±1
isotimusina					20,75±3,9	0,25±0,5	0,2
luteolina					5±2,7		
total de flavonóides (mg/g)	0,03±0,01	0,01±0,006	0,01±0	0,01±0	0,43±0,1	2,1±0,8	1,43±0,3

<sup>a</sup> percentagem relativa de flavonóides; <sup>b</sup> valores relatados como média de tres repetições ± Desvio Padrão

**Tabela 3.** Área foliar, pubescência das folhas e ramos e principais constituintes dos óleos voláteis relatados para diferentes tipos morfológicos de *Ocimum gratissimum*

Acessos	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Ramos	Folhas	Principais constituintes dos óleos voláteis
ot17	15,2±3,3	piloso	piloso	eugenol / espatulenol
ot24	53,1±24,9	glabro	glabro	timol / $\alpha$ -copaeno
ot27	70,9±11,1	piloso	piloso	eugenol / $\gamma$ -muuroleno / espatulenol
ot65	38,3±7,4	glabro	glabro	timol / p-cimeno
ot84	35±9,9	piloso	piloso	geraniol
ot85	11,4±3	piloso	piloso	eugenol / timol / espatulenol

permtiram identificar 3 tipos químicos de *O. gratissimum* (eugenol, timol e geraniol), os quais são possíveis de serem identificados pela análise organoléptica de cada acesso.

A similaridade entre os flavonóides e óleos essenciais reforça as observações feitas em campo. Metabólitos secundários, como os flavonóides e óleos essenciais, podem estar associados a alguns tratos morfológicos, e são úteis para compreender a variação existente dentro deste grupo.

Apesar deste estudo conter apenas uma pequena amostra de *O. gratissimum*, parece que os caracteres morfológicos são de difícil uso sozinhos como descritores, devido a sua contínua variação. A divisão da espécie em duas

variedades com base apenas em morfologia, obscurece o alto grau de variação na produção de metabólitos secundários encontrada na var. *gratissimum*, em contraste do que foi encontrado na var. *macrophyllum*.

Enquanto os constituintes dos óleos essenciais e flavonóides exibem uma excelente discriminação entre os acessos de *O. gratissimum*, o uso de metabólitos secundários como marcadores intra-específicos per se necessitam considerar outros fatores, tais como fatores ambientais, desenvolvimento da planta, e método de extração utilizado, todos com grande impacto na composição dos óleos essenciais e flavonóides. Pino<sup>16</sup> encontrou composição diferente dos óleos essenciais

**Tabela 4.** Composição química dos acessos de *Ocimum gratissimum*, cultivados em condições de campo, Purdue University, USA

Constituintes do óleo essencial	Acessos de <i>O. gratissimum</i>									
	TRb	ot17	ot24	ot26	ot27	ot52	ot63	ot65	ot84	ot85
	(porcentagem relativa do total de óleo essencial)c									
p-cimeno	5,9	0,3±0,2	3,4±2,2	2,8±1,7		0,3±0,3	0,4±0,4	9,6±4,5	0,8±0,4	
γ-terpineno	6,74		1,6±0,7	2,3±0,7	t	2±2,8	0,1±0,2	2,3±0,3	t	
α-terpineol	7,22	2,3±0,2	2,5±0,6	2,4±1,3	0,2±0,2	3,2±1	2,1±1	4,3±0,4	0,1±0,2	0,4±0,4
terpinoleno	8,12	1,1±0,6	2±1,4	1±0,1	0,8±0,4	1,4±0,2	1,4±0,7	1,9±0,3	0,6±0,1	1,4±1,6
terpinen-4-ol	10,95	0,9±0,4	1,4±0,4	1,6±0,1	t	1±0,3	1,6±0,8	2,6±0	0,1±0	t
metilchavicol	11,72	0,5±0,4	0,5±0,2	0,6±0,2	0,4±0,2	0,8±0,4	0,5±0,5	1,7±0,5	0,3±0,2	0,6±0,3
anisol	14,08	0,9±0,6	1,5±1,9	7,3±7,6	1,4±2,5		1,2±1,6	2,2±1,9		1,9±1,4
geraniol	15,8									85,4±2,1
timol	16,39	5,2±3,5	37,2±3,3	38,5±5,1	5,7±2,3		0,3±0,2	44,3±0,8	1,1±0,3	12,7±7,5
eugenol	18,72	62,6±3,2	3,5±1	2,1±1,5	45,1±8,6	50,1±2,7	44,1±10,5	3,3±1,7	1,1±0,8	41,7±8,5
α-copaeno	20,75	2,4±0,4	14,3±2,3	11,9±2,7	1,5±0,4	2,8±1,2	1,8±0,3	4,1±0,9	1,3±0,1	0,7±0,1
β-cariofileno	22,03	0,3±0,1	1,9±0,2	1,6±0,2	1±0,4	0,6±0,3	0,3±0	0,9±0,2	0,8±0,1	2,2±0,3
γ-selineno	23,66	1,4±0,6	6,4±0,9	5,1±1,1	0,2±0,3	1,3±1,2	0,5±0	6,8±1,4	2,1±0,2	0,3±0,4
γ-muuroleno	24,47	1±0,3	6,4±0,7	5±0,7	20,2±2,2	1,6±1,1	1,1±0,5	1,2±0,2	0,4±0,1	1,1±0,1
espatulenol	27,6	9,9±2,3	4,3±0,9	3,7±0,8	14,3±3	25,3±5,2	23,4±6,8	1,9±0,3	0,7±0,3	15,4±3,9

<sup>a</sup> Listados em ordem de tempo de retenção (min); <sup>b</sup> TR = tempo de retenção;

<sup>c</sup> valores relatados como média de três repetições ± desvio padrão. t=traços (< 0.05%)

quando comparando extração por arraste a vapor, extração por solvente ou CO<sub>2</sub> supercrítico. A mesma amostra de *O. gratissimum* resultou em concentrações variadas de timol, apesar deste ser sempre o principal composto. Compostos minoritários, tais como p-cimeno e β-cariofileno, foram detectados em arraste a vapor, mas somente traços foram verificados quando a extração foi feita por solvente ou CO<sub>2</sub> supercrítico. Diferentes técnicas de extração tem demonstrado significativo impacto nas concentrações relativas dos constituintes dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum*<sup>5</sup>. Além de fatores ambientais e métodos de extração, a variação genética intra-específica pode promover a segregação de diversos copostos minoritários, tais como sesquiterpenos.

Apesar de *O. gratissimum* ser largamente distribuído em todo mundo, poucos esforços foram feitos para sua domesticação. Foi observado que acessos com alto teor de timol e eugenol, apresentaram diferenças quanto a composição e teor de sesquiterpenos (Tabela 3). Neste caso, pode-se levantar a hipótese de que foram selecionados organolepticamente para diferentes aromas e usos medicinais no caso do timol e eugenol. O alto teor de geraniol em ot84 é devido provavelmente a seleção para alto teor de óleo na Purdue University<sup>5</sup>. O uso de metabólitos secundários em taxonomia pode ser mais útil em espécies como *O. gratissimum*, que ainda não são domesticadas, ao invés de espécies que já foram submetidas a extensa seleção e melhoramento genético.

## Referências

- Albuquerque U P, Andrade L H C. 1998a. El genero *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el nordeste del Brasil. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56(1), 43-64
- Albuquerque U P, Andrade L H C. 1998 b. Etnobotanica del genero *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasilenas. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56(1), 107-118
- Bosabaldis A, Gabrieli C, Niopas I. 1998. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens*. *Phytochemistry* 49, 1549-1553
- Charles D J, Simon J E, 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of Basil. *Journal of American Society for Horticulture Science* 115(3):458-462
- Charles D J, Simon J E, 1992. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. *Journal of Essential Oil Research* 4(3), 231-234
- Chogo J B, Crank G. 1981. Chemical composition and biological activity of the Tanzanian plant *Ocimum suave*. *Journal of Natural Products* 44(3), 308-311
- Cortez D A G, Cortez L E R., Pessini G L, Doro D L, Nakamura C V. 1998. Analysis of essential oil of alfavaca *Ocimum gratissimum* L (Labiatae). *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 2(2), 125-127
- Ekundayo O. 1986. Essential oils. VIII. Volatile constituents of the leaves of *Ocimum viride*. *Planta Medica* 3, 200-202
- Fun C E, Svendsen A B, Baerheim-Svendsen A. 1990.

- Composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* var. *canum* and *O. gratissimum* L. grown on Ariba. Flavor and Fragrance 5(3), 173-177
- <sup>10</sup> Guenther E. 1948. The Essential Oils. II. Van Nostrand Co., New York
- <sup>11</sup> Jankovsky M, Taborsky J, Hubacek J, Hlava B. 1990. Volatile substances in basil (*Ocimum gratissimum* L.). Sbornik UVTIZ, Zahradnictivi 17(1), 59-68
- <sup>12</sup> Jirovetz L, Buchbauer G, Ngassoum M B. 1998. Aroma compounds of leaf and flower essential oils of the spice plant *Ocimum gratissimum* L. from Cameroon. Ernährung 22(9), 395-397
- <sup>13</sup> Ndounga M, Ouamba J M. 1997. Antibacterial and antifungal activities of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *O. basilicum* from Congo. Fitoterapia 68(2), 190-191
- <sup>14</sup> Ntezurubanza L, Scheffer J J C, Svendsen A B, Baerheim-Svendsen A. 1987. Composition of the essential oil of *Ocimum gratissimum* grown in Rwanda. Planta Medica, 53(5), 421-423.
- <sup>15</sup> Paton, A., 1992. A synopsis of *Ocimum* L. (*Labiatae*) in Africa. Kew Bulletin 47(3), 403-435
- <sup>16</sup> Pino J A, Rosado A, Fuentes V. 1996. Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. J Essential Oil Res. 8(2), 139-141
- <sup>17</sup> Pino J A, Garcia J, Martinez M A. 1998. A comparison between the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Ocimum gratissimum* L. J. Essential Oil Res. 10, 575-577.
- <sup>18</sup> Sanda K, Koba K, Nambo P, Gaset A. 1998. Chemical investigation of *Ocimum* species growing in Togo. Flavour and Fragrance Journal 13(4), 226-232
- <sup>19</sup> Sobti S N, Pushpangadan P, 1982. Studies in the genus *Ocimum*: Cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: Cultivation and Utilization of Aromatic Plants. (Atal, C.K., Kapur, B.M., eds.), pp. 457-472. Regional Laboratory Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi
- <sup>20</sup> Tomás-Barberán F A, Gil M I. 1992. Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), Advances in Labiate Science, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 299-305
- <sup>21</sup> Vieira R F, R Grayer, A Paton, J E Simon. 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. Biochemical Systematics and Ecology 29 (3):287-304
- <sup>22</sup> Zamureenko V A, Klyuev N A, Dmitriev L B, Polyakova S G, Grandberg I I. 1986. Essential oil component composition in basils of the eugenol type. Izvestiya Timiryazevskoi Sel'skokhozyaistvennoi Akademii 2, 172-175