

RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM PLANTAS DE *Ocimum basilicum* L. cv. Genovese SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA HÍDRICA
ESSENTIAL OILS INCOME AND COMPOSITION OF *Ocimum basilicum* L. cv. genovese SUBMITTED TO HYDRIC DEFICIT

Juliana Marino¹; Fernando Broetto²

¹FREA-Fundação Regional Educacional de Avaré; ²Departamento de Química e Bioquímica, IB-UNESP, Botucatu, SP e-mail: broetto@ibb.unesp.br

RESUMO

Verificou-se a influência da deficiência hídrica (DH) no acúmulo e na composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* cv. genovese além de parâmetros bioquímicos relacionados com a resposta das plantas à DH. As plantas foram produzidas a partir de sementes provenientes da Itália. Os tratamentos foram constituídos por dois blocos, T1 (controle) e T2 (submetido à DH). O tratamento T2 foi subdividido em três níveis de intensidade: E1 - estresse leve ($\Psi_{\text{folha}} \sim -0,8$ MPa); E2 - estresse moderado ($\Psi_{\text{folha}} \sim -1,4$ MPa) e E3 - estresse severo ($\Psi_{\text{folha}} \sim -2,0$ MPa). As plantas consideradas como controle foram mantidas sempre irrigadas ($\Psi_{\text{folha}} \sim -0,3$ a $-0,5$ MPa). Suspendeu-se o fornecimento de água quando 50% das plantas iniciaram o florescimento (entre a 10^a e 12^a semana). As determinações do Ψ_{folha} foram feitas imediatamente antes de amanhecer, medidas em folhas da parte mediana. Observou-se que com o aumento da DH houve incremento na concentração de óleo essencial na inflorescência e principalmente nas folhas. Houve diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2, principalmente na concentração de óleo em folhas, que apresentaram diferenças no momento em que as plantas foram submetidas a um estresse moderado enquanto que no caso da concentração de óleo essencial na inflorescência esse efeito só foi evidenciado quando a planta foi submetida a um estresse severo. O composto Linalol foi o que apresentou maior concentração sendo esta mais acentuada na inflorescência do que nas folhas; a única diferença significativa foi com relação a substância Eugenol que na inflorescência é a segunda substância com maior concentração enquanto que em folhas a segunda substância com maior concentração é o 1,8 Cineol. Os níveis de DH influenciaram quantitativamente na concentração dos componentes do óleo. Observou-se que os diferentes níveis de DH induziram proporcionalmente o aumento na atividade das enzimas SOD e CAT.

Palavras-chave : Deficiência hídrica , óleos essenciais, plantas medicinais, produção vegetal

ABSTRACT

The objective of this work was to verifying the influence of hydric deficit in the accumulation and composition of essential oils of *Ocimum basilicum* cv. genovese. Parallel, where studied some biochemical parameters related to water stress. The plants where produced by seeds, originated of Italy. The treatments were constituted of two blocks, T1 (control) and T2 (submitted the hydric deficit - HD) The treatment T2 was composed for three levels of HD: E1 - slight stress (-0,8 MPa); E2 - moderate stress (-1,5 MPa) and E3 – severe stress (-2,3 MPa). The set of plants considered as control, where maintained well watered. The supplying of water was suppressed when 50 %of the plants start they flowering process (10 to 12 week). The determinations of total water potential (Ψ) were made in predawn, measured in the leaves of the median part of the plant. There was significative differences between the treatments T1 and T2, mainly the oil concentration in the leaves, that shown some differences by the moment that the plants where submitted to moderate stress. In the case of inflorescence tissues, this effect appeared only by the severe treatment of HD. The linalol was identified as the more concentrated fraction of the integral oil, more in the inflorescence than in the leaves. The levels of HD induced quantitatively in the concentration of the oils. We observed that the different levels of HD seem to have effect in the increase of the enzyme activities like SOD and Catalase.

Keywords : Essential oils, hydric deficit , medicinal plants, plant production

INTRODUÇÃO

Informações sobre o efeito de condições de estresse no metabolismo secundário de plantas são derivadas principalmente de esforços da pesquisa, para maximizar a produção de constituintes ativos de espécies medicinais, aromáticas e condimentares. Como aplicação prática, avanços no sentido de compreender a influência de fatores ambientais na regulação da síntese de metabólitos secundários, podem contribuir para a maximização da produção de compostos de interesse nestas espécies (GERSHENZON, 1984).

Vários autores (OLIVER *et al.*, 2001) fazem referência ao acúmulo e participação de compostos secundários na tolerância a deficiência hídrica. Tais informações indicam que através do manejo da água de irrigação, pela diminuição do fornecimento, pode-se induzir aumento na produção destes compostos. Além disso, estes autores discutem que compostos secundários como as quinonas, polióis, flavonóides, fenóis e carotenóides estão envolvidos nas respostas antioxidantes durante a deficiência hídrica, posto que um dos principais mecanismos moleculares de dano às células

sensíveis a DH é o ataque de radicais livres a fosfolipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Outro mecanismo que a célula dispõe para dismutar radicais livres produzidos em condição de DH, é a ativação de enzimas do sistema de resposta antioxidativo. Dentre os principais sistemas, destacam-se as polifenol oxidases, catalases, superóxido dismutases, lipoxigenases, glutathione redutase, ascorbato peroxidase e peroxidases (OLIVER et al., 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental foi desenvolvida no Departamento de Produção Vegetal - Setor de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, Campus de Botucatu-SP. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação, utilizando-se vasos com capacidade de 5,0 Kg de substrato. Os vasos foram colocados em bandejas, onde se manteve lâmina de água com aproximadamente 2 cm, considerando-se que a água de irrigação ascendeu por capilaridade em sistema de sub-irrigação. Todos os vasos receberam quantidades iguais de substrato, constituído por solo Latossolo Vermelho Escuro distrófico textura média (Le_d), segundo classificação feita por Carvalho *et al.* (1983). Este solo foi coletado na Fazenda Experimental Lageado, na gleba denominada “Patrulha”.

A parte analítica dos experimentos foi conduzida no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências - UNESP, Campus de Botucatu, SP. O material coletado (folhas e inflorescências) foi processados e analisado quanto aos parâmetros bioquímicos e fitoquímicos. A análise da composição do óleo foi realizada no Departamento de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas – IAC, fazenda experimental Santa Eliza.

Para realização das análises de inferência estatística do experimento, foi adotado um delineamento em blocos inteiramente casualizados recomendado para ensaios em casas de vegetação, onde a maioria das variáveis experimentais é controlada (BANZATTO & KRONKA, 1989), no esquema fatorial 2 x 3, com 10 repetições, para estudar os efeitos do manejo de água sobre diversas características de plantas de *Ocimum basilicum* L. cv genovese.

Quadro 1: Delineamento experimental em blocos casualizados no esquema fatorial 2 x 3

Blocos	Épocas de amostragem		
	E1 (época 1)	E2 (época 2)	E3 (época 3)
T1 (controle)	T1 x E1 _{controle}	T1 x E2 _{controle}	T1 x E3 _{controle}
T2 (deficiência hídrica)	T2 x E1 _{estresse leve}	T2 x E2 _{estresse moderado}	T2 x E3 _{estresse severo}

A determinação da atividade da SOD considerou a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). A atividade foi determinada pela adição de 50 µL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 µM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 µM de riboflavina em 3,0 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8, conforme descrito por (DEL LONGO *et al*, 1993). A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25° C. Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). O composto azul formado (formazana) pela fotoredução do NBT foi determinado pelo incremento na absorção a 560 nm. Os tubos considerados *branco* para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, portanto, abrigados da luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra (µg µl⁻¹).

A atividade da enzima catalase foi determinada por medição em um aparelho espectrofotômetro a um comprimento de onda de 240 nm pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto *et al.* (1999). Para o teste, 50 µL de extrato bruto foram adicionados a 950 µL de um tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12.5 mM. A variação da absorção (ΔE) foi calculada em um intervalo de 80 s, sendo a atividade da enzima calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar ε = 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade específica (µKat µg Prot⁻¹) da catalase, levou em consideração a concentração de proteína solúvel no teste. A análise quantitativa do óleo essencial foi realizada no laboratório do Departamento de Química Bioquímica no Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

O aparelho utilizado para a hidrodestilação foi um modelo Clevenger modificado e arquitetado especificamente para a extração de óleo em amostras de pequeno volume. As amostras (1g) foram colocadas em balões volumétricos (50 mL) contendo 30 mL de água destilada. Após a hidrodestilação em manta aquecedora, o hidrodestilado obtido foi transferido para outro balão (50 mL) contendo 30 mL de diclorometano. A solução foi filtrada na presença de sulfato de sódio. O filtrado contendo diclorometano com o óleo essencial, foi rotacionado em rotaevaporador, para a destilação do diclorometano e separação do óleo. A determinação quantitativa foi feita através da diferença do peso dos balões previamente tarados, em balança analítica. Para o resgate do óleo, acrescentou-se acetato de etila em quantidade suficiente (aproximadamente 3,0 mL) para se retirar todo o óleo aderido às paredes do balão. Após a pesagem, o óleo foi armazenado em vidros âmbar

hermeticamente fechados e mantido em geladeira a 4°C. A análise qualitativa do óleo essencial (%) foi realizada em cooperação com o Departamento de Fitoquímica no Instituto Agronômico de Campinas – IAC, Fazenda Experimental Santa Eliza, em Campinas, SP. As análises para identificação dos constituintes voláteis do óleo foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu, QP-5000) equipado com coluna capilar modelo DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm). Para a análise, o equipamento trabalhou com temperatura do injetor a 240°C e do detector a 230°C, baseado no seguinte programa de controle de temperatura: 60°C – 240°C, 3°C min⁻¹. Como fase móvel utilizou-se gás hélio, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 1,0 µl. A identificação dos constituintes foi efetuada através da comparação dos espectros de massas detectados na amostra, com espectros conhecidos e armazenados no banco de dados do sistema CG-EM (biblioteca Nist 62 lib.), conforme citado na literatura (McLAFERTU, 1989) e índice de refração (ADAMS, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

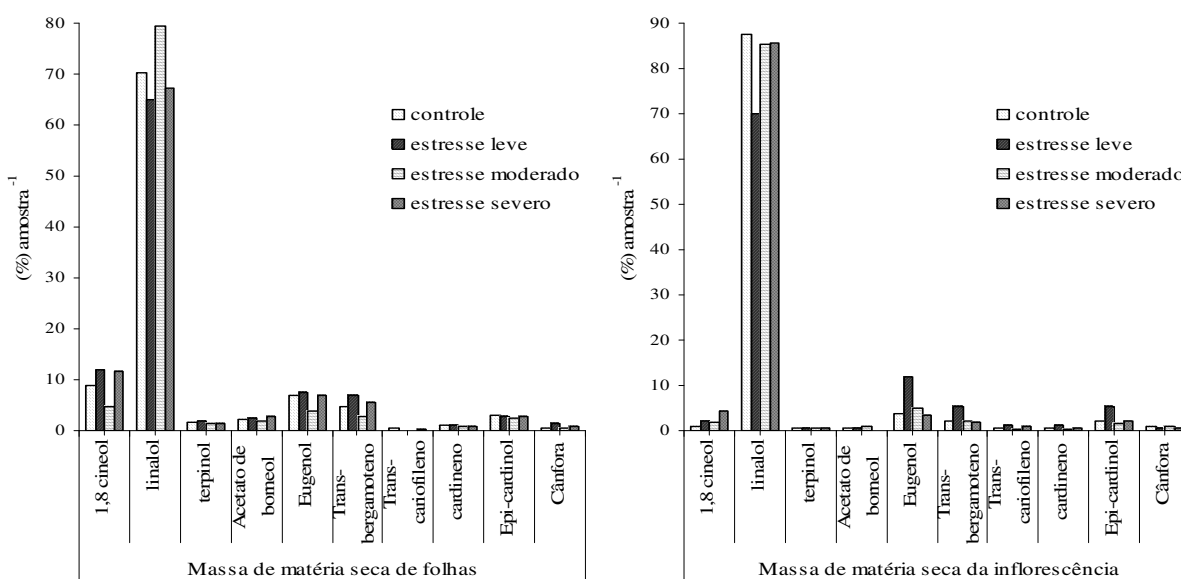


Figura 1 E 2: Valores médios em (%) para os componentes do óleo essencial encontrado em folhas (1) e na inflorescência (2) de *O. basilicum* cujas plantas foram submetidas a diferentes níveis de DH.

Os dados relativos à concentração dos componentes do óleo essencial (%), encontrados nos diferentes tratamentos e épocas de amostragens estão resumidos no Anexo 1.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2, observa-se que o composto linalol, foi o que apresentou maior concentração em ambos os tecidos analisados, nas folhas (70,4%) e nas inflorescências (87,6%). Resultados similares foram encontrados por Murungesan & Damodaran,

(1988). Outros autores também relatam que o linalol é o que apresenta maior concentração em *Ocimum*, embora em valores inferiores a 50% (VIEIRA *et al* 2001).

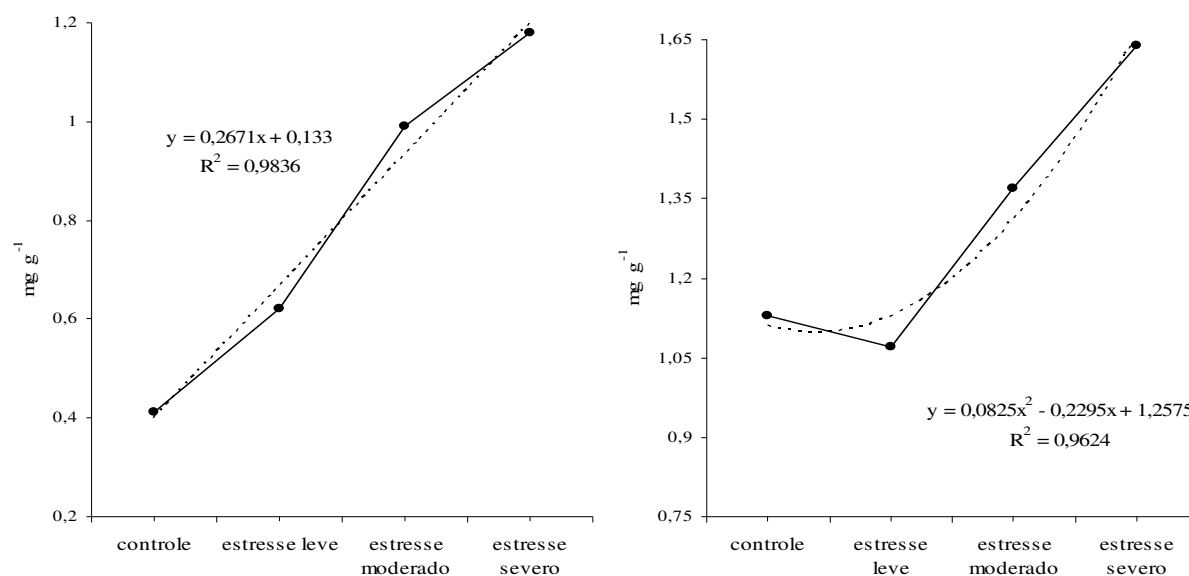


Figura 3 e 4: Valores médios para a concentração de óleo essencial (mg g⁻¹) em folhas (3) e na inflorescência (4) de plantas de *Ocimum basilicum* em função de diferentes níveis de DH.

Conforme demonstrado nas Figuras 3 e 4 o aumento da concentração de óleo essencial nas folhas e na inflorescência de plantas de *Ocimum basilicum* é diretamente proporcional ao aumento do estresse, provocado neste caso, pela deficiência hídrica. Conforme citado em vários trabalhos (SILVA *et al.* 2002), este padrão de resposta a DH parece ser comum em várias espécies medicinais produtoras de óleos essenciais. Os teores da concentração foliar do óleo essencial no tratamento T1 (Controle) para todas as épocas de amostragem (E1, E2 e E3) foram 0,37; 0,38 e 0,49% respectivamente. Esses valores confirmam os encontrados por Furlan (2000), em condições experimentais similares, os quais variaram entre 0,41 a 0,57% de óleo essencial. Os resultados encontrados no tratamento T2 (DH) variaram de 0,62 a 1,18%.

Oliver *et al*, (2001) relatam que existe uma tendência e que os compostos terpênicos acumulem-se sob condições de estresse, principalmente em DH.

Charles *et al* (1990) relatam que, trabalhando com a espécie *Ocimum micranthum*, obtiveram concentração de 0,63% e 1,54% de óleo essencial na inflorescência e folhas, respectivamente. Moraes *et al.* (2002) apresenta valores próximos a 0,60% na concentração de óleo essencial de inflorescência de *Ocimum selloi*. Os trabalhos citados como referências foram realizados em condições climáticas satisfatórias. Os resultados comparados foram menores do que os encontrados neste trabalho para o tratamento controle (T1) e para o tratamento submetido à DH (T2), que

apresentaram valores de concentração média de 1,0% no tratamento T1 e valores entre 1,07% a 1,64% no tratamento T2.

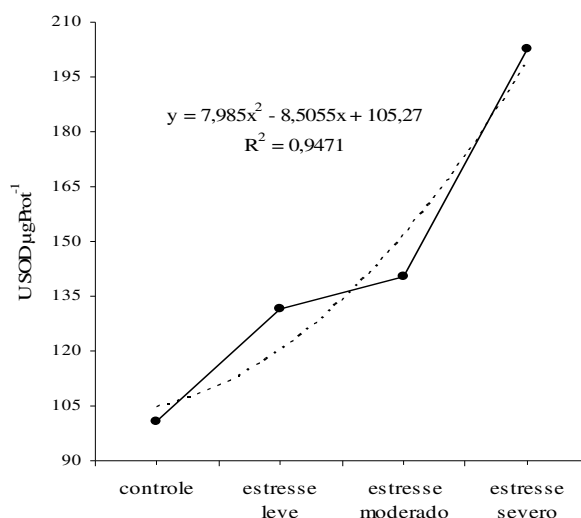


Figura 5: Valores médios para a atividade da enzima SOD (U SOD µg Prot⁻¹) em folhas de plantas de *Ocimum basilicum* em função de diferentes níveis de DH.

Observou-se (Figura 5) que a atividade da SOD aumentou em relação ao aumento da severidade da DH. Segundo Broetto *et al.* (2002), a SOD apresenta um aumento de atividade quando as plantas são submetidas a uma condição ambiental estressante, seja hídrica, térmica, salina, alta intensidade luminosa, injúrias por insetos ou fitopatógenos.

Outros autores trabalhando com diferentes estresses ambientais relatam resultados semelhantes (LEONARDO, 2003). Os autores argumentam que a atividade da SOD pode ser interpretada como marcador bioquímico para reações das plantas em situações de estresse ambiental, apresentando funções antioxidativas, atuando na dismutação de espécies reativas de oxigênio.

A SOD catalisa a dismutação de radicais superóxidos para H₂O₂. Existem três classes distintas de SOD, as quais se diferenciam principalmente no seu cofator metálico. Em plantas CuZn-SOD foi encontrada nos cloroplastos, no citossol e em mitocôndria (Salin & Bridges 1981). Fe-SOD foi encontrada exclusivamente em cloroplastos (Salin & Bridges 1980) e a Mn-SOD foi detectada em mitocôndria, peroxissomo e citossol (Alsher *et al.* 1997). Considerando-se que a CuZn-SOD, a Fe-SOD e a Mn-SOD estão presentes no citoplasma, no cloroplasto e na mitocôndria, respectivamente, é possível medir-se resposta específicas e compartimentalizadas do sistema de resposta antioxidativo, pelo monitoramento da atividade destas diferentes classes de SOD.

No entanto, a atividade da enzima pode ser requerida, mesmo em situações normais, para dismutar espécies reativas de oxigênio evoluídas do metabolismo de açúcares na mitocôndria, sendo,

portanto necessário para a utilização da SOD como marcador bioquímico de parâmetros da atividade da enzima em condições ambientais normais.

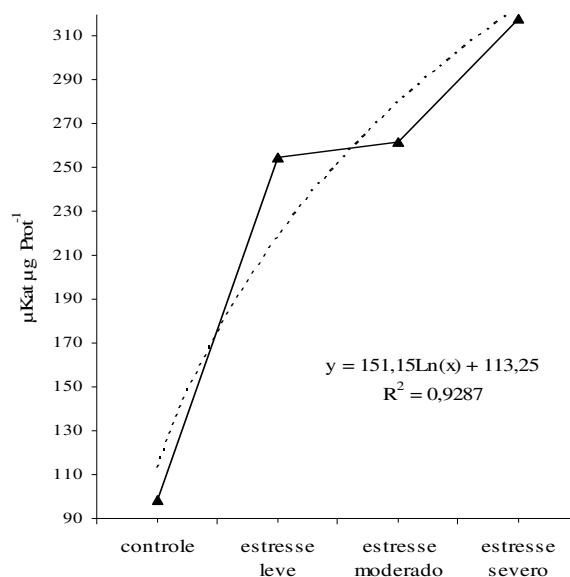


Figura 6: Valores médios para a atividade da enzima CAT ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$) em folhas de plantas de *Ocimum basilicum* em função de diferentes níveis de DH.

De acordo com a Figura 6 a atividade da CAT desenvolve uma função assemelhada a atividade da SOD em condições de estresse ambiental, mantendo uma relação positiva direta com o aumento da deficiência hídrica. Este evento pode ter relação com um aumento das taxas de respiração celular, em função da alteração das rotas metabólicas (catabolismo) relacionadas com o desenvolvimento vegetativo. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido durante a fotorrespiração nos peroxissomos pode ser decomposto pela catalase, sendo reduzido à água (H_2O). Sabe-se que a SOD também pode ser responsável pela elevação do nível de peróxido de hidrogênio nas células devido à conversão de radicais superóxido (O^{2-}). Tonin, 2005 trabalhando com pimentão, relatou aumento na atividade da CAT quando as plantas foram submetidas a estresse salino. Alguns autores afirmam que um conjunto de condições ambientais estressantes pode interferir causando alterações na estrutura protéica da enzima ou hidrólise causando a diminuição de sua atividade. Tais alterações na atividade da catalase podem ocorrer como resposta a salinidade, altas intensidades luminosas, temperaturas e outros eventos estressantes, com diminuição de sua atividade (BROETTO, 2002).

CONCLUSÕES

Em relação aos parâmetros bioquímicos, concluem-se que a atividade das enzimas SOD e CAT aumentaram em função do estresse provocado pela DH, podendo ser consideradas como indicadores de situação de estresse.

Em termos qualitativos, observou-se que o composto linalol foi o que apresentou maior concentração, principalmente nas inflorescências. Os compostos Eugenol; 1,8 cineol; Trans- α -bergamoteno; Epi- α -cardinol; α -terpinol; Acetato de borneol; Trans-cariofileno; γ -cardineno e Cânfora, foram encontrados nas amostras de inflorescência e de folhas mas em quantidades inferiores.

Plantas submetidas à DH apresentaram aumento na concentração de óleo essencial por grama de matéria seca em folhas e na inflorescência. As análises fitoquímicas revelaram que o rendimento total de óleo por planta foi maior nas inflorescências das plantas do tratamento controle. Nos tecidos foliares o resultado encontrado foi o inverso, exceto para as plantas foram submetidas a estresse moderado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a participação de Marcelo Leonardo, Paula R. Polato, Jose A. Marchese e Fabiano P. Amaral para realização desse trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp, Carol Stream, 1995.

ALSCHER R.G., DONAHUE J.L., CRAMER C.L.; Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100, 224-233, 1997.

BANZATO, D. A; KRONKA, S.N.; **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 247p. 1989.

BROETTO, F.; LUTTGE, U.; RATAJCZAK, R.; Influence of light intensity and salt treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *mesembryanthemum crystallinum*, *Functional Plant Biology*, Victoria, v.29, , p. 13-23, 2002.

CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal American Society Horticultural Science*. V.115, n.3, p.458-62, 1990.

GHERSHENZON, J. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: TIMMERMAN, B.N.; STEELIN, C. & LOEWUS, F.A. (EDS.) *Recent advances in phytochemistry* - phytochemical adaptations to stress. New York: Plenum Press, v.18, 1984. p.273-320.

GIANNOPOLITIS, C.N. & RIES, S.K.; Superóxido dismutases. I. occurrence in Higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314, 1977.

LEONARDO, M. *Estresse salino induzido em plantas de pimentão (Capsicum annuum L.) e seus efeitos sobre a produtividade e parâmetros agrônômicos e bioquímicos*. 2003. 100p Dissertação (agronomia-irrigação e drenagem) Botucatu, UNESP/FCA.

McLAFFERTY, F. W. ; STAUFFER, D. The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley Sons, New York, (1989).

MURUGESAN, M.; DAMODARAN, N.P. Studies on Indian essential oils & their isolates. A on the essential oil of chemo-type of *Ocimum basilicum*, exceptionally rich in linalool. *Indian Perfumer*. V.32, n.1, p.92, 1988.

OLIVER, A.E., LEPRINCE, O., WOLKERS, W.F. et al. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology*, v.43, p.151-167, 2001.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A.M.; Aluminum effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Viçosa, v.11, n.3, p.137-43, 1999.

SALIN M.L., BRIDGES S.M.; Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201, 369-373, 1980.

SALIN, M.L., BRIDGES, S.M; Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 99, 37-45, 1981.

VIEIRA, R. F., GRAYER, R.J., PATON, A., SIMON, J. Genetic diversity of *Ocimum grantissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematic Ecologic.*, v.29, p.287-304, 2001.

ZHUJUN, Z.; GUOQUIANG, W.; JUAN, L.; QIONGQIU, Q.; JINGQUAN, Y. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167:527-533, 2004.