

Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L.

Phytochemical investigation of dichloromethanic fraction on *Ocimum gratissimum* L. extract

Michele Rosset¹; Vitor de Moraes Zamarion¹; Milton Faccione²; Terezinha de Jesus Faria²; Jurandir Pereira Pinto³; Aneli de Melo Barbosa⁴; José Roberto Pinto de Souza^{5*}

Resumo

Ensaio anteriores de atividade antifúngica do extrato etanólico de *Ocimum gratissimum*, utilizando a técnica de difusão em meio sólido, evidenciaram a inibição do crescimento de *Penicillium chrysogenum*, *Rhizoctonia* sp, *Aspergillus niger* e de duas espécies de *Alternaria* sp isoladas de tomate e de cenoura. O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis constituintes químicos responsáveis pela atividade antifúngica da planta, por meio de estudo químico do extrato hexano-diclorometano-etanol (1:3:1) das partes aéreas de *O. gratissimum*. O extrato foi cromatografado em coluna de sílica gel, eluída com hexano, diclorometano e etanol. A purificação em coluna cromatográfica de sílica gel das frações eluídas com diclorometano (5,9g) resultou na obtenção de quatro constituintes: uma mistura de hidrocarbonetos saturados de cadeia longa (C₃₁, C₃₃, C₃₄ e C₃₅), eugenol, óxido de cariofileno e uma mistura de stigmasterol-sitosterol. Os constituintes foram identificados através das análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e das espectrometrias no infravermelho, de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C e comparação com dados espectrais da literatura. Entre os constituintes isolados, concluiu-se que o eugenol é um dos prováveis responsáveis pela atividade antifúngica de *O. gratissimum*, pois registros da literatura comprovaram a atividade deste constituinte contra várias espécies de fungos.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, atividade antifúngica, eugenol, fungos fitopatogênicos

Abstract

Previous studies showed that ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* inhibited growth of *Penicillium chrysogenum*, *Rhizoctonia* sp, *Aspergillus niger* and *Alternaria* sp, isolated from tomato and carrot. The aim of this study was to identify the chemical constituents of *Ocimum gratissimum*. Aerial parts of the plant were treated with hexane-dichloromethane-ethanol mixture (1:3:1) at room temperature. The obtained extract was chromatographed on silica gel column eluted with hexane, dichloromethane and ethanol. Fractions eluted with dichloromethane were rechromatographed on a column of silica gel to yield alyphatic hydrocarbon mixture (C₃₁, C₃₃, C₃₄ e C₃₅), eugenol, caryophyllene oxide and a mixture of stigmasterol and sitosterol. The structures of the compounds were deduced by spectral data analysis and by comparison with literature values. Recent studies showed that eugenol is probably one of the responsables for antifungal activity of *O. gratissimum*.

Key words: *Ocimum gratissimum*, antifungal activity, eugenol, phytopathogenic fungi

¹ Aluno de Graduação do Curso de Química, Departamento de Química, UEL, Londrina –PR

² Professor Dr., Departamento de Química, CCE, UEL, Londrina –PR

³ Técnico M.Sc, Departamento de Química, CCE, UEL, Londrina –PR

⁴ Professora Dr., Departamento de Bioquímica, CCE, UEL, Londrina –PR

⁵ Professor Dr., Departamento de Agronomia, CCA, UEL, Londrina –PR

* Autor para correspondência.

Introdução

Os fitopatógenos representam um dos fatores limitantes da produção de alimento, tornando necessária a utilização de agrotóxicos para garantir a produtividade e a qualidade dos produtos. Entretanto, devido à toxicidade e alto poder residual, os defensivos agrícolas sintéticos têm provocado contaminação do ambiente e danos à saúde humana (SANTOS, 1999). Estes fatos, aliados ao desenvolvimento da resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos, estimularam a pesquisa de novas substâncias capazes de impedir o crescimento de fungos e bactérias.

As espécies vegetais representam um campo a ser mais explorado na busca de novas substâncias antifúngicas, visto que a maioria dos trabalhos registrados na literatura sobre antifúngicos naturais tratam de metabólitos obtidos de microrganismos. Várias classes de substâncias do metabolismo secundário de plantas apresentam ação antimicrobiana. Como exemplo pode-se citar a classe dos isoflavonóides, que atuam como fitoalexinas, representando, portanto, um mecanismo natural de resistência das plantas ao ataque de fungos e bactérias (SMITH; BANKS, 1986). Por serem naturais e possuírem atividade antimicrobiana altamente específica, os isoflavonóides podem ser uma alternativa aos antifúngicos convencionais na estocagem de grãos (WEIDENBÖRNER et al., 1990) e no controle de fungos nas áreas de produção agrícola. Esta é uma alternativa importante, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a utilização de agrotóxicos eleva os custos de produção.

Ocimum gratissimum, pertencente à família Labiatae, possui ampla distribuição nas regiões tropicais de clima quente (PESSOA et al., 2002). A planta é utilizada popularmente no Brasil e na África para diversos fins terapêuticos como tratamento de dores de cabeça, diarreia, pneumonia, problemas estomacais, tosse, febre e conjuntivite (ONAJOBI, 1986; CORRÊA, 1926). Estudos registrados na literatura comprovaram várias propriedades

biológicas do óleo essencial de *O. gratissimum*, entre elas as atividades antifúngica (DUBEY et al., 2000; NAKAMURA et al., 2004), antibacteriana (JANSSEN et al., 1989; NAKAMURA et al., 1999; CIMANGA et al., 2002; NGASSOUM et al., 2003) e inseticida (KÉITA et al., 2001). Extratos da planta apresentaram atividade anti-diarréica (ONAJOBI, 1986; OFFIAH; CHIKWENDU, 1999), hipoglicêmica em ratos (AGUIYI et al., 2000) e contra os vírus HIV-1 e HIV-2 (AYISI; NYADEDZOR, 2003). Ensaio biológico realizado no Departamento de Bioquímica da UEL indicaram atividade antifúngica do extrato etanólico de *O. gratissimum* contra os fungos *Penicillium chrysogenum*, *Rhizoctonia* sp, *Aspergillus niger*, duas espécies de *Alternaria* sp isoladas de tomate e de cenoura. Apesar dos vários registros sobre as atividades biológicas da espécie, existem poucas informações sobre os constituintes químicos de extratos desta espécie e sobre a relação destas substâncias com as propriedades biológicas da planta.

Com base nos fatos apresentados, foi iniciado o estudo químico de *O. gratissimum*, visando identificar os constituintes químicos responsáveis pela atividade antifúngica do extrato bruto da planta.

Material e Métodos

Para análise e isolamento das substâncias, o material vegetal foi desidratado. O extrato, obtido pela extração com mistura de hexano/diclorometano/etanol 1:3:1 das partes aéreas de *O. gratissimum* desidratadas, foi fracionado em coluna de sílica gel, eluída com hexano, diclorometano e etanol. O isolamento e a identificação dos constituintes químicos foram realizados no material resultante das frações eluídas com diclorometano (fração diclorometânica), de acordo com as seguintes fases:

Material vegetal: Ocimum gratissimum foi cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de

Londrina e está registrada no Herbário da mesma Universidade sob número 36554. Após a coleta, as partes aéreas da planta foram submetidas a processo de secagem em estufa a 40°C e, em seguida, foram trituradas, fornecendo 429g de material seco.

Extração e fracionamento do extrato: O material vegetal (429g) foi submetido à extração com hexano/diclorometano/etanol na proporção de 1:3:1. O solvente de extração foi escolhido com base em um planejamento experimental para escolha do melhor solvente extrator. Eliminação do solvente por destilação à pressão reduzida resultou na obtenção de 25g de extrato, o qual foi cromatografado em coluna filtrante de sílica gel, eluída com hexano, diclorometano e etanol. O grupo de frações eluído com diclorometano forneceu 5,90g de material.

Isolamento dos constituintes químicos da fração diclorometânica: O material resultante do grupo de frações eluídas com diclorometano (5,90g) foi purificado em coluna de sílica gel, utilizando como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol em misturas com gradientes crescentes de polaridade. Foram coletadas 118 frações de 250mL, as quais foram reunidas em 25 grupos por comparação em placas cromatográficas de sílica gel. O grupo frações 1-7, eluído com hexano, forneceu um sólido branco (67,6 mg), ponto de fusão 88°C-90°C, identificado como uma mistura de hidrocarbonetos saturados. O grupo de frações 21-26, eluído com hexano/diclorometano 15 %, foi purificado em coluna de sílica gel e em placas preparativas, também de sílica gel.

Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas: A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foi realizada em equipamento Shimadzu, modelo GC-17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000 (Shimadzu). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-1 (polimetisiloxano), de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás de arraste. As temperaturas foram de 300°C no

injetor e 250°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 60 a 250°C, com acréscimo de 10°C a cada minuto e de 250°C a 320°C com acréscimo de 20°C a cada minuto.

Identificação do número de átomos de carbono dos constituintes da mistura de hidrocarbonetos: A identificação do número de átomos de carbono dos hidrocarbonetos da mistura, foi feita através de cromatografia gasosa da mistura e de padrões de alcanos C_{30} , C_{32} e C_{36} , sob condições de temperatura programada na faixa de 100 a 340°C. As temperaturas foram de 250°C no injetor e de 230°C no detector. Os dados fornecidos pelo cromatograma dos padrões foram utilizados na construção do gráfico Temperatura de retenção x Número de átomos de carbono. O número de átomos de carbono de cada alcano da mistura foi determinado através da temperatura de retenção e dos parâmetros A e B obtidos do gráfico.

Resultados e Discussões

O resultado da purificação do material resultante da fração diclorometânica por métodos cromatográficos usuais, forneceu duas substâncias de aspecto oleoso, identificadas como eugenol (Figura 1A) e óxido de cariofileno (Figura 1B), uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos e uma mistura dos esteróides estigmasterol e sitosterol. O eugenol foi identificado através das análises por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas e das espectrometrias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de 1H e de ^{13}C e pela comparação dos dados espectrais com os dados registrados na literatura para o eugenol (SAITO et al., 2004). Os demais constituintes foram identificados através da análise por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas. A determinação do número de átomos de carbono dos constituintes da mistura de hidrocarbonetos indicou tratar-se de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos saturados C_{31} , C_{33} , C_{34} e C_{35} .

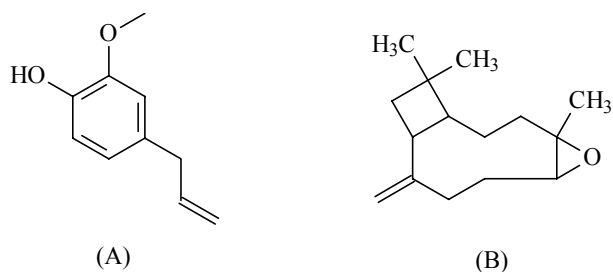


Figura 1. Representação das estruturas de algumas substâncias encontradas no extrato da parte aérea de *O. gratissimum*: eugenol (A) e óxido de cariofileno (B).

O total de eugenol obtido foi 28,3mg e o total de óxido de cariofileno foi 1,3mg. O grupo de frações 42-46, eluído com hexano/diclorometano 30 %, ao ser purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, forneceu um sólido branco (16,8mg), cuja análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas indicou tratar-se de uma mistura dos esteróides estigmasterol e sitosterol.

Entre os constituintes isolados, concluiu-se que o eugenol deve ser um dos prováveis responsáveis pela atividade antifúngica do extrato de *O. gratissimum*, pois registros da literatura comprovaram a atividade deste constituinte contra várias espécies de fungos (DUBEY et al., 2000; NAKAMURA et al., 2004).

Outros estudos estão sendo realizados para se identificar outros possíveis substâncias antifúngicas das demais frações (hexânica e etanólica) obtidas do fracionamento do extrato bruto de *O. gratissimum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Araucária e da Universidade Rural do Rio de Janeiro.

Referências

AGUIYI, J. C.; OBI, C. I.; GANG, S. S.; IGWEH, A. C. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia*, Milano, v.71, n.4, p.444-446, 2000.

AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. *Antiviral Research*, Amsterdam, v.58, n.1, p.25-33, mar. 2003.

CIMANGA, K.; KAMBU, L.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 79, n.2, p.213-220, Feb. 2002.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v.1.

DUBEY, K. N.; TIWARI, T. N.; MANDIN, D.; ANDRIAMBOAVONJY, H.; CHAUMONT, J. P. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia*, Milano, v.71, p.567-569, 2000.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; NTEZURBANZA, L.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.26, p.57-63, 1989.

KÉITA, S. M.; VICENT, C.; SCHMIT J. P.; ARNASON, J. T.; BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *Journal of Stored Products Research*, Oxford, v.37, p.339-349, 2001.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, N. A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.94. n.5, p.675-678, Sect./Out. 1999.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In viro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. *Research in Microbiology*, Paris, v. 155, p.579-586, 2004.

NGASSOUM, M. B.; ESSIA-NGANG, J. J.; TATSADJIEU, L. N.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADJOUJJI, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia*, Milano, v.74, n.3, p.284-287, 2003.

- OFFIAH, V. N.; CHIKWENDU, U. A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.68, n.1/3, p.327-330, 1999.
- ONAJOBI, F. D. Smooth muscle contracting lipid-soluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.18, n.1, p.3-11, 1986.
- PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.109, n.1/2, p.59-63, 2002.
- SAITO, T.; HAYAMIZU, K.; YANAGISAWA M.; YAMAMOTO, O.; WASADA, N.; KINUGASA, S.; TANABE, K.; TAMURA, T. *Integrated spectral data base system for organic compounds*. Disponível em: <<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/>> Acesso em: 30 set.2004.
- SANTOS, S. R. Dos espirros à morte: agrotóxicos provocam mortes e danos irreversíveis à saúde humana. *Revista CREA/PR*, Curitiba, v.1, n.4, p.22-23, 1999.
- SMITH, D. A.; BANKS, S. W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoids phytoalexins. *Phytochemistry*, New York, v.25, n.5, p.979-995, 1986.
- WEIDENBÖRNER, M.; HINDORF, H.; JHA, H. C.; TSOTSONOS, P. Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the Genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, New York, v.29, n.4, p.1103-1105, 1990.