

## **Influência da adubação orgânica na atividade antifúngica de extratos de alfavaquinha**

**Líliá Aparecida Salgado de Moraes<sup>1</sup>; Andréia Lúcia Catini<sup>2</sup>; Rodrigo Fernandes Castanha<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 - Guaratiba. Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 23020-470 <sup>2</sup>. Embrapa Meio Ambiente, CP 69 Jaguariúna- SP CEP: 13820-000

### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos diferentes tipos de adubos orgânicos na atividade antifúngica de extratos de *Ocimum selloi*. Os tratamentos utilizados foram: T1 – testemunha (solo sem adubação), T2 – cama-de-aviário (5 Kg/m<sup>2</sup>), T3 – hidrolisado de peixe (5 mL/m<sup>2</sup>) e T4 – composto orgânico (4 Kg/m<sup>2</sup>). Foram testados extratos metanólicos e clorofórmicos, bem como suas respectivas frações, na concentração de 5 mg/mL sobre os fungos fitopatogênicos *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com dez tratamentos (extratos metanólico e clorofórmico) e nistatina com três repetições. As medidas finais (mm) das dimensões dos halos de inibição foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Houve diferença entre os tratamentos de adubação e dentro dos mesmos observou-se diferença entre os extratos. Para o fungo *R. solani* os melhores resultados foram obtidos pelos extratos clorofórmico do T1 (21mm) e metanólico do T4 (16mm). Para *S. sclerotium* o melhor extrato foi o clorofórmico do T2 (19,7 mm). Para *P. parasitica* o melhor extrato foi o metanólico do T4 (13,5mm). Pode-se concluir que os extratos de *O. selloi* apresentaram atividade fungitóxica diferenciada de acordo com os tratamentos de adubação, assim como devido à polaridade dos solventes orgânicos utilizados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ocimum selloi* Benth.; Compostagem; Antibiose.

### **ABSTRACT**

**Influence of organic manure on antifungal activity from *Ocimum selloi* extracts.** The aim of this study was to evaluate the influence of different types of organic fertilizers on the antifungal activity of extracts of *Ocimum selloi*. The treatments used were T1-control (soil without fertilizer), T2 - litter (5kg/m<sup>2</sup>), T3-commercial product by hydrolyzed fish (5mL/m<sup>2</sup>) and T4-organic compound (4kg/m<sup>2</sup>). Methanolic and chloroformic extracts and their fractions were tested at 5mg/mL. Microorganisms tested were the pathogenic fungi *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. The experimental design was a random design with ten treatments (methanolic and chloroformic extracts) plus nystatin, with three replications. The final average (mm) of the

size of inhibition zones were submitted to analysis of variance (ANOVA). There were differences between the fertilization treatments and within a few fertilization treatments differences were observed between extracts. To *R. solani* best results were obtained by chloroformic extract from T1 (21mm) and methanolic extract from T4 (16mm). To *S. Sclerotium*, best results were obtained by chloroformic extract from T2 (19.7mm). For *P. parasitica* the best was the methanolic extract of T4 (13.5mm). It can be concluded that extracts of *O. selloi* presented fungitoxicity differentiated according to the fertilization treatments, and due to the polarity of the organic solvents used.

**KEYWORDS:** *Ocimum selloi* Benth. Composting. Antibiosis.

*Ocimum selloi* Benth é um subarbusto perene, pertencente à família Lamiaceae, nativo das regiões Sul e Sudeste do Brasil, que pode ser multiplicado por sementes ou estacas. A espécie é conhecida popularmente como elixir-paregórico, alfavaquinha e atroveran. A espécie produz óleo essencial rico em metil-chavicol, metil-eugenol, cis e trans-anetol, dentre outros, sendo muito utilizada na medicina popular como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório (Vanderlinde et al., 1994), bem como repelente de insetos (Costa et al., 2008).

Os produtos naturais de origem vegetal são uma importante fonte de novos defensivos naturais usados no controle de doenças de plantas (Silva & Bastos, 2007). A exploração da atividade biológica presente em extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, encontrados nos diferentes órgãos como folhas, caules, cascas, resinas, flores, frutos e outros (Nunes et al., 2006), pode constituir em mais uma forma potencial no controle de diferentes fitopatógenos.

A nutrição é um dos principais fatores de estresse que podem alterar a composição química dos princípios ativos, pois a deficiência ou o excesso de nutrientes pode interferir também na quantidade de princípio ativo e na produção de biomassa (Mapeli et al., 2005). Dentre os diversos materiais utilizados na produção do biofertilizante encontram-se a cama-de-aviário, hidrolisado de peixe, esterco fresco de gado e caprinos, composto orgânico enriquecido com minerais, carboidratos, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos, entre outros (Basaglia et al., 2011). O controle químico de fitopatógenos vem criando inúmeros problemas como resistência microbiana adquirida, contaminação da água, solo, consumidor e elevados custos de produção. Atualmente as plantas medicinais estão sendo estudadas no controle de fitopatógenos, em função de apresentarem menor risco ambiental, serem geralmente inofensivas aos animais e seres humanos, e por apresentarem menor custo. Saito & Scramin (2000) sugerem sua utilização a fim de obter mais seletividade de controle de

patógenos de plantas, com a vantagem de poluir menos o meio ambiente. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos diferentes tipos de adubos orgânicos na atividade antifúngica de extratos de *O. selloi* sobre os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotium*, *Phytophthora parasitica* e *Sclerotium rolfsii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal:** Para a realização deste experimento foi utilizada a metodologia descrita por Moraes & Barbosa (2011). O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP). Para a instalação da cultura no campo, foram realizadas as análises químicas do solo (20-40 cm de profundidade). A composição de macro e micronutrientes dos adubos e compostos utilizados também foi analisada. As mudas de *O. selloi* foram produzidas sob cultivo protegido a partir de sementes, preparadas em bandejas 128 células. As mudas foram transplantadas para o campo 60 dias após a semeadura, para áreas vizinhas. Os tratamentos foram constituídos de três tipos diferentes de adubos orgânicos, além da testemunha, totalizando quatro tratamentos. Os tratamentos utilizados foram: T1–testemunha (solo sem adubação), T2–cama-de-aviário (5Kg/m<sup>2</sup>), T3–hidrolisado de peixe (Fishfétil Active®, fertilizante orgânico proveniente de processo natural de fermentação enzimática de pescados marinhos para aplicação no solo–5 mL/m<sup>2</sup>, seguindo as especificações do fabricante) e T4–composto orgânico (4Kg/m<sup>2</sup>). A incorporação de todos os adubos orgânicos foi feita por m<sup>2</sup>, quinze dias antes do transplante das mudas. A colheita foi realizada 180 dias após o plantio, sendo colhidas as plantas úteis.

**Preparo dos extratos:** As amostras de material vegetal foram secas a 35°C, em estufa com circulação de ar forçada até obtenção de peso constante, e posteriormente pulverizada em moinho de facas. Para cada tratamento foram utilizados 300g do material vegetal seco e moído. Os extratos foram preparados utilizando-se como solvente clorofórmio e metanol. Foi realizada extração à frio, com renovação de solvente a cada 72h e filtragem em papel de filtro qualitativo, por três vezes; sendo posteriormente trocado o solvente. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida. As amostras foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a concentração de 5 mg/mL, sendo estas solubilizadas em agitador Vortex.

**Testes de Antibiose:** Os ensaios foram realizados para os fungos fitopatogênicos *P. parasitica*, *R. solani*, *S. sclerotium* e *S. rolfsii*. As linhagens avaliadas são provenientes da coleção de micro-organismos do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa meio Ambiente. Para a inoculação dos fungos foram utilizados discos de cada cultura. Para isto, foi realizada escavação do meio, contendo fungo, com o auxílio de um cilindro de cobre de

7mm de diâmetro. Posteriormente foi feito a inserção deste disco de cultura fúngica no centro da placa teste, contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar). Em cada placa foram inseridos cinco discos de papel filtro, com 6mm de diâmetro, previamente esterilizados a 121°C/15min, já adicionadas alíquotas de 10µL dos respectivos extratos. Como padrão foi utilizado a nistatina. Foram realizados testes apenas com DMSO, solvente utilizado na diluição dos extratos, para verificar a interferência dos mesmos (branco). As placas foram incubadas a 25±2°C até o crescimento dos micro-organismos e posterior formação dos halos de inibição. O tempo de incubação variou para cada micro-organismo: *R. solani* (72h), *S. rolfii* (72h), *P. parasitica* (168h) e *S. sclerotium* (120h). A dimensão dos halos de inibição foi medida em mm (vertical e horizontalmente), com o auxílio de um paquímetro, calculando-se a média de cada halo. O delineamento experimental utilizado foi o DIC, com dez tratamentos, sendo estes quatro extratos metanólicos e quatro extratos clorofórmicos das plantas provenientes dos tratamentos de adubação, o padrão e a testemunha. Os tratamentos foram realizados em triplicata. Posteriormente as frações isoladas dos extratos selecionados dos diferentes tratamentos também foram submetidas à antibiose. A avaliação foi realizada por DIC sendo testadas todas as frações isoladas e a nistatina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento com o fungo *S. rolfii* demonstraram que os extratos não inibiram o crescimento do mesmo, diferindo estatisticamente da nistatina, que apresentou inibição significativa (18,5mm) contra esse fungo (Tabela 1). Nos ensaios realizados com o fungo *P. parasitica*, o extrato metanólico obtido do T4 obteve halo de inibição (13,5mm) superior ao padrão (11mm). Alguns fatores podem explicar este resultado, como o isolado testado ser resistente ao padrão ou este encontrar-se em concentração menor que a recomendada pelo fabricante. Os extratos clorofórmico e metanólico da testemunha e T2, e o extrato clorofórmico do T4 não diferiram significativamente do padrão, apresentando halo de inibição de 11mm. Ainda no tratamento T4, o extrato metanólico apresentou halo de inibição de 13,5mm, sendo este resultado melhor que o apresentado pelo extrato clorofórmico (11mm). Este resultado pode ser explicado pela diferença de polaridade entre os solventes orgânicos utilizados para preparar os extratos, indicando maior afinidade do composto ativo com o metanol. Os demais tratamentos obtiveram a mesma resposta, independentemente do solvente utilizado.

Para *R. solani*, o extrato clorofórmico da testemunha apresentou formação de halo de inibição (21mm) inferior ao padrão (28,5mm), porém, seu halo de inibição foi muito superior aos demais tratamentos. Isto também pode ser explicado pela afinidade do solvente

com a substância ativa, já que o extrato metanólico proveniente do mesmo tratamento não foi capaz de formar halo de inibição. A biossíntese dessa substância pela planta pode ter sido induzida pelo fato da mesma estar sob condições de estresse, devido ao déficit nutricional, já que a este tratamento não foi adicionado nenhum tipo de adubação. Estes resultados concordam com os obtidos por Costa et al. (2008). Os autores observaram diferenças quantitativas e qualitativas em relação aos constituintes químicos do óleo essencial de *O. selloi*, sendo que o maior número de compostos químicos foi verificado no tratamento sem adubação, possivelmente como uma resposta de defesa da planta ao estresse nutricional ao qual foi submetida. O tratamento T4 apresentou resposta inversa ao observada na testemunha, já que o extrato metanólico apresentou halo de inibição de 16 mm, não se observando formação de halo para o extrato clorofórmico. O clorofórmio não foi tão eficiente na extração do composto ativo quando comparado ao metanol, devido à diferença de polaridade entre os dois solventes e o composto ativo. Benini et al. (2010) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *O. gratissimum*, colhidos nas quatro estações do ano, no crescimento micelial in vitro dos fungos *R. solani* e *Phytophthora* sp. Os autores verificaram que os extratos provenientes das plantas colhidas no outono, na concentração a partir de 5%, inibiram totalmente o crescimento micelial de *R. solani* e *Phytophthora* sp. A polaridade do metanol está mais próxima da polaridade da água do que o clorofórmio, reforçando a idéia de que o composto ativo presente no extrato metanólico de *O. selloi* do T4 (composto orgânico) apresenta alta polaridade. No teste com o fungo *S. sclerotium*, o extrato clorofórmico do T2 obteve halo de inibição de 19,6mm, sendo superior ao padrão (11mm). O extrato metanólico proveniente do mesmo tratamento de adubação apresentou halo de inibição menor que o extrato clorofórmico, porém igual ao padrão. O mesmo foi observado com o extrato metanólico da testemunha, o qual não diferiu estatisticamente do padrão, porém apresentou diferença significativa em relação a seu extrato clorofórmico. Garcia et al.(2012) verificaram que o extrato aquoso de *O. gratissimum* proporcionou pouco efeito sobre *S. sclerotium* com 3,6% de inibição do crescimento micelial.

A influência da adubação na composição química de compostos secundários de plantas medicinais pode ser exemplificada pelo resultado obtido por Rosal et al.(2011). Após realização de análise química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* submetidos a diferentes fontes de adubos orgânicos, o mesmo apresentou relevante diversidade de constituintes químicos, encontrando-se 39, 17 e 26 picos, nos ensaios sem adubação, com adubação bovina e cama-de-aviário, respectivamente, dos quais foram identificados 31, 15 e 21 compostos químicos.

MORAIS, LAS; CATINI, AL; CASTANHA, RF. 2014. Influência da adubação orgânica na atividade antifúngica dos extratos de alfavaquinha. Horticultura Brasileira 31: S0745 – S0752.

Com base nos resultados obtidos foi selecionado o extrato metanólico para fungos provenientes do T4 para análise fitoquímica. Apesar de ter um resultado menos expressivo que os demais possui o mesmo ativo sobre dois fungos distintos. Os extratos clorofórmico da testemunha e metanólico e clorofórmico do T2 apresentaram resultados expressivos, porém não foram contemplados neste estudo.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que houve diferença entre os tratamentos de adubação nos extratos de *O. selloi*, já que estes apresentaram atividade fungitóxica diferenciada. A adubação com composto orgânico apresentou a melhor resposta quando comparado com os demais. A polaridade dos solventes orgânicos utilizados influenciou no comportamento dos extratos de alguns tratamentos. Os extratos testados não apresentaram atividade positiva sobre o fungo *S. rolfsii*. Para *R. solani* os melhores resultados foram obtidos pelos extratos clorofórmico do T1 (21mm) e metanólico do T4 (16mm). Já para *S. sclerotium* o melhor extrato foi o clorofórmico do T2 (19,7mm). Para *P. parasitica* o melhor extrato foi o metanólico do T4 (13,5mm). A polaridade dos solventes utilizados também influenciou no arraste e separação dos compostos presentes nos extratos analisados. Estudos da composição química dos extratos estão em andamento e são necessários para a identificação das substâncias ativas responsáveis pela ação fungitóxica dos mesmos. Estes apresentaram potencial para uso no controle de fitopatógenos, porém, faz-se necessária a continuação dos experimentos em condições de campo e semi-campo, visando a obtenção de resultados mais conclusivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASAGLIA, F.S., MORAIS, L.A.S.; CASTANHA, R.F.; TERRA, S.M.T. 2011. Rendimento do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. submetido a diferentes adubos orgânicos em associação ou não à adubação verde. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite.
- BENINI, P.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KLAIS, E.C.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINE, R.M.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B. 2010. Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 677-683.
- COSTA, L.C.B. PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; REIS, E.S.; ALVES, P.B.; NICULAU, E.S. 2008 Tipos e doses de adubação orgânica

MORAIS, LAS; CATINI, AL; CASTANHA, RF. 2014. Influência da adubação orgânica na atividade antifúngica dos extratos de alfavaquinha. *Horticultura Brasileira* 31: S0745 – S0752.

no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2173-2180.

GARCIA, R.A., JULIATTI, F.C.; CASSEMIRO, T.A. 2012. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotium*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57.

MAPELI, N.C. Vieira, M.C.; Heredia Z., N.A.; Siqueira, J.M. 2005. Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função do nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 32-37.

MORAIS, L.A.S.; BARBOSA, A.G. 2011. Influência da adubação verde e diferentes adubos orgânicos na produção de fitomassa aérea de atroveran. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Anais... Viçosa: ABH.

NUNES, X.P; MAIA, G.L.A.; ALMEIDA J.R.G.S.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. 2006. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16.

ROSAL, L.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; BRANT, R.S.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. 2000. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 5, p. 670-678, 2011.

SAITO, M.L.; SCRAMIM, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 20, p. 25-30.

SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. 2007. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phitophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

VANDERLINDE, F.A.; COSTA, E.A.; D'ANGELO, L.C.A. 1994. Atividades farmacológicas gerais e atividade antiespasmódica do extrato etanólico de *Ocimum selloi* Benth. (elixir paregórico). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13. **Anais...** Fortaleza, UFCE.

**TABELA 1:** Atividade antifúngica dos extratos clorofórmico e metanólico de folhas de *Ocimum selloi* Benth. submetidos aos tratamentos de adubação: T1 (Testemunha), T2 (Cama-de-aviário), T3 (Hidrolisado de Peixe) e T4 (Composto Orgânico) na concentração de 5 mg/mL.

Extratos		Diâmetro da zona de inibição (mm)			
		<i>P. parasitica</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotium</i>	<i>S. rolfsii</i>
Testemunha	Clorofórmico	11,00±0,00b	21,00±0,00b	0,00±0,00c	0,00±0,00b
	Metanólico	11,00±0,00b	0,00±0,00d	11,00±0,00b	0,00±0,00b
Cama-de-aviário	Clorofórmico	11,00±0,00b	0,00±0,00d	19,67±3,21 <sup>a</sup>	0,00±0,00b
	Metanólico	11,00±0,00b	0,00±0,00d	11,00±0,00b	0,00±0,00b
Hidrolisado de peixe	Clorofórmico	0,00±0,00c	0,00±0,00d	0,00±0,00c	0,00±0,00b
	Metanólico	0,00±0,00c	0,00±0,00d	0,00±0,00c	0,00±0,00b
Composto orgânico	Clorofórmico	11,00±0,00b	0,00±0,00d	0,00±0,00c	0,00±0,00b
	Metanólico	13,50±0,00a	16,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00b
	Nistatina	11,00±0,00b	28,50±0,00a	11,00±0,00b	18,50±0,00a

Valores de média de triplicata ± desvio padrão

Médias da mesma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0,05)