

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var.
minimum NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* var. *niger*
(van Tiegh.) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

JOSEANE SOUZA DO CARMO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO DE 2018**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var.
minimum NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* var. *niger*
(van Tiegh.) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

JOSEANE SOUZA DO CARMO

Nutricionista

Universidade Federal de Ouro Preto, 2008

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Zanoti

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JANEIRO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

C287a	<p>Carmo, Joseane Souza do. Atividade antifúngica do óleo essencial e do extrato metanólico de <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>minimum</i> no controle de <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> (van Tiegh) e atividade antioxidante / Joseane Souza do Carmo. _ Cruz das Almas, BA, 2018. 65f.; il.</p> <p>Orientadora: Franceli da Silva. Coorientadora: Karina Zanoti.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Plantas medicinais – Microbiologia – Manjerição. 2.Manjerição – Atividade antifúngica. 3.Antioxidantes – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 579</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var.
minimum NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* var. *niger*
(van Tiegh.) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
JOSEANE SOUZA DO CARMO**

Realizada em 31 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Franceli da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Orientadora)

Profa. Dra. Cintia Armond
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno

Prof. Dr. Daniel Melo de Castro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Davi, por entender minha ausência e as dificuldades desse momento, sempre muito amoroso, carinhoso, compreensivo e incentivador. “Termina logo mamãe de escrever para irmos tomar um sorvete ou assistirmos um filminho”.

Antes de ser mãe, eu fazia e comia os alimentos ainda quentes. Eu não tinha roupas manchadas, tinha calmas conversas ao telefone.

Antes de ser mãe, eu dormia o quanto eu queria, Nunca me preocupava com a hora de ir para a cama. Eu não me esquecia de escovar os cabelos e os dentes

Antes de ser mãe, eu limpava minha casa todo dia. Eu não tropeçava em brinquedos e nem pensava em canções de ninar.

Antes de ser mãe, eu não me preocupava: Se minhas plantas eram venenosas ou não. Imunizações e vacinas então, eram coisas em que eu não pensava.

Antes de ser mãe, ninguém vomitou e nem fez xixi em mim, Nem me beliscou sem nenhum cuidado, com dedinhos de unhas finas.

Antes de ser mãe, eu tinha controle sobre a minha mente, Meus pensamentos, meu corpo e meus sentimentos, e dormia a noite toda.

Antes de ser mãe, eu nunca tive que segurar uma criança chorando, para que médicos pudessem fazer testes ou aplicar injeções. Eu nunca chorei olhando pequeninos olhos que choravam. Nunca fiquei gloriosamente feliz com uma simples risadinha. Nem fiquei sentada horas e horas olhando um bebê dormindo.

Antes de ser mãe, eu nunca segurei uma criança, só por não querer afastar meu corpo do

dela. Eu nunca senti meu coração se despedaçar, quando não pude estancar uma dor. Nunca imaginei que uma coisinha tão pequenina, pudesse mudar tanto a minha vida e que pudesse amar alguém tanto assim. E não sabia que eu adoraria ser mãe.

Antes de ser mãe, eu não conhecia a sensação, de ter meu coração fora do meu próprio corpo. Não conhecia a felicidade de alimentar um bebê faminto. Não conhecia esse laço que existe entre a mãe e a sua criança. E não imaginava que algo tão pequenino, pudesse fazer-me sentir tão importante.

Antes de ser mãe, eu nunca me levantei à noite toda, cada 10 minutos, para me certificar de que tudo estava bem. Nunca pude imaginar o calor, a alegria, o amor, a dor e a satisfação de ser uma mãe. Eu não sabia que era capaz de ter sentimentos tão fortes.

Por tudo e, apesar de tudo, obrigada Deus, Por eu ser agora um alguém tão frágil e tão forte ao mesmo tempo.

Obrigada meu Deus, por permitir-me ser Mãe!

(Antes de ser mãe - Silvia Schmidt)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo o dom da vida, pelo cuidado e proteção sempre, pela força de sempre seguir em frente em busca dos meus objetivos diante dos momentos difíceis em que pensei que não os superaria, e me fazer vencer mais uma etapa da minha vida.

À minha família que acreditou e contribuiu para esta realização, pelo apoio, pelos conselhos. Em especial à minha mãe pelas suas orações e pela confiança incondicional, pelo seu amor caloroso, se importando e sonhando juntamente comigo os meus sonhos e projetos. À minha irmã Janine pelo apoio, ajuda e compreensão, e palavras de incentivo. Ao meu filho Davi, amo-te incondicionalmente. Marise, obrigada!

A minha orientadora Dra. Franceli da Silva, pela disposição, pelo evidente compromisso durante o período de orientação, pelo profissionalismo e preocupação, e pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram para o meu aperfeiçoamento técnico-científico e amadurecimento pessoal.

À Dr^a Karina Zanoti por sua confiança e incentivo ao primeiro passo desse trabalho, sua dedicação durante o período de orientação. Obrigado por toda ajuda, pelos conselhos e por seu exemplo de profissionalismo, que sem dúvidas é algo a ser seguido.

À família GEPLAM, pela ajuda nos momentos difíceis desta caminhada, pela amizade. Pelos conselhos profissionais, pela ajuda sem medir esforços e também pelos momentos de descontração, pela contribuição nos momentos em que as dúvidas surgiam, pela atenção e pela significativa contribuição nesse trabalho. Aqui incluo todos nessa grande família: Simone, Renata, Sara, Silvane, Mariane, Rosimar e Jamile, Daniele, Zuleide, Samiris, Maria, Léo, Thais e Jain. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria se concretizado. Obrigada!

A minha amiga Leda, pela força, pelo incentivo e por acreditar em mim, sabia que você é mais uma irmã que Deus me deu. As amigas e atuais colegas de trabalho, que através da amizade fizeram com que os momentos tensos e tristes se transformassem muitas vezes em momentos mais alegres. E também por fazerem os momentos alegres serem ainda mais especiais, vocês são “as estouradas”: Taty, Polly, Nanda, Paty, Nay, Oade, Manu, Keilan, Jôsy e claro, à Elba e a Dr. Leandro pelo compreensão.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta na execução desse trabalho.

*“...E aprendi que se depende sempre
De tanta muita diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas*

*E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que a gente pense estar...”*

(Caminhos do coração – Gonzaguinha)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO	09
 CAPÍTULO 1	
 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>minimum</i> SOBRE <i>Aspergillus niger</i> 20	
 CAPÍTULO 2	
 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>minimum</i>	44
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Autora: Joseane Souza do Carmo

Orientadora: Dr^a. Franceli da Silva

RESUMO: As plantas medicinais da família Lamiaceae são amplamente distribuídas no mundo, habitam em diferentes ecossistemas e são também cultivadas. O gênero *Ocimum* spp. , no qual estão inseridos os manjericões são espécies que possuem ciclo anual ou perene, dependendo das condições de cultivo. Seu óleo essencial está presente principalmente nas folhas. É valorizado nas indústrias de cosméticos, alimentícias, entre outras, e em especial desperta o interesse nas indústrias farmacêuticas, pois têm funções terapêuticas, tais como: sedativos, expectorantes, antipiréticos e outros. Além de sua utilização como medicamentos, também podem possuir atividades bioativas que atuam diretamente no controle de patógenos e pragas, podendo contribuir no uso de produtos naturais com menor impacto ambiental às áreas de cultivos. A ação antimicrobiana dos óleos essenciais é amplamente relatada em artigos científicos, principalmente no controle de patógenos fúngicos, que muitas vezes causam sérios danos a um grande número de culturas, levando à impactos significativos na economia agrícola. Esta pesquisa, visa contribuir com mais informações sobre a atividade antifúngica do óleo essencial e do extrato metanólico de manjericão (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) sobre o *Aspergillus niger* e a atividade antioxidante do manjericão. O *Aspergillus niger* tem despertado o interesse em pesquisas e estudos científicos, pois na região sisaleira, que compreende o semiárido da Bahia, é o agente causador da podridão vermelha do sisal, doença responsável por grande parte das perdas da cultura de sisal. Portanto, esta pesquisa foi dividida em dois Capítulos. No Capítulo 1, o objetivo foi o estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato metanólico de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* no controle de *Aspergillus niger*. A avaliação do potencial antifúngico foi determinada por três métodos: a concentração inibitória mínima (CIM), exposição aos voláteis e o método de difusão de ágar. Os

resultados obtidos mostram que o óleo essencial e o extrato metanólico de manjeriço foram eficiente sobre o fungo *A. niger*. No Capítulo 2, com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial visando verificar o potencial deste óleo para fins de produção de bioativos no futuro por três métodos químicos: o efeito bloqueador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfónico)] e pelo método do Poder Redutor. Observou-se que para ação antioxidante apresentada tanto pelo óleo essencial quanto pelo extrato metanólico, ambos tiveram melhor resultados nos cultivos solteiros. No entanto, para o extrato metanólico aplicado ao método ABTS percebe-se melhor resultado para o cultivo consorciado.

Palavras chaves: Plantas Medicinais, Manjeriço, Óleo Essencial, Extrato Metanólico

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND METHANOL EXTRACT OF *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* NO CONTROL OF *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.) AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Author: Joseane Souza do Carmo

Advisor: Dr^a. Franceli da Silva

ABSTRACT: The medicinal plants of the family Lamiaceae are widely distributed in the world, inhabit different ecosystems and are also cultivated. The genus *Ocimum* spp., in which are inserted the basils, popularly known also as alfavaca or alfavaca-smelling, are species that have annual or perennial cycle, depending on the culture conditions. Its essential oil is present mainly in the leaves, however, can be found in all parts of the plant. It is valued in the cosmetics, food industries, among others, and especially arouses interest in the pharmaceutical industries because they have therapeutic functions, such as: sedatives, expectorants, antipyretics and others. In addition to their use as medicines, they may also have bioactive activities that act directly in the control of pathogens and pests, and may contribute to the use of natural products with less environmental impact to crop areas. The antimicrobial action of essential oils is widely reported in scientific articles, mainly in the control of fungal pathogens, which often cause serious damage to a large number of crops, leading to significant impacts on the agricultural economy. This research aims to contribute with more information about the antifungal activity of essential oil and basil methanolic extract (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) on *Aspergillus niger* and the antioxidant activity of basil. *Aspergillus niger* has aroused interest in research and scientific studies, because in the sisal region, which comprises the semi-arid region of Bahia, it is the causal agent of sisal red rot, a disease responsible for most of the losses of the sisal crop, *Agave sisalana*, in this region. This generates economic and social impact in the region and in the State of Bahia, being one of the only sources of income for farmers in the sisaleira region. Therefore, this research was divided into two chapters. In Chapter 1, the objective was the study of the antimicrobial activity of the essential oil and the methanolic extract of *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* in the control of *Aspergillus niger*. The evaluation of the antifungal

potential was determined by three methods: the minimum inhibitory concentration (MIC), exposure to volatiles and the agar diffusion method. The results obtained show that the essential oil and the methanolic basil extract were efficient on the *A. niger* fungus. In Chapter 2, with the objective of evaluating the antioxidant activity of the essential oil in order to verify the potential of this oil for the purpose of bioactive production in the future by three chemical methods: the free radical blocking effect DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS [2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] and by the Reducing Power method. It was observed that for the antioxidant action presented by both the essential oil and the methanolic extract, both had better results in the single cultures. However, for the methanolic extract applied to the ABTS method, a better result is obtained for the intercropping.

Key words: Medicinal Plants, Basil, Essential Oil, Metanolic Extract

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Planta Medicinal

De acordo com a definição da ANVISA, plantas medicinais são consideradas todas aquelas que possuem capacidade de aliviar ou curar enfermidades e que tenham tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade, ou seja, possuem constituintes bioativos com ação terapêutica (Marques et al., 2016).

De acordo com Favorito e Firmo et al., 2011 plantas medicinais são definidas como matérias primas vegetais que podem conter um ou mais princípios ativos com atividade biológica, conferindo atividade terapêutica à saúde humana.

De acordo com Agunbiade et al (2015), diferentes tipos de plantas medicinais fazem parte da dieta humana desde os tempos pré-históricos. Esses vegetais são tipicamente de baixa caloria, baixo teor de gorduras, alto teor de proteínas, rico em fibras e algumas substâncias minerais, tais como potássio, cálcio, magnésio e sódio, sendo também ricos em fitoquímicos, como vitamina C, carotenoides, flavonoides e saponinas, que podem combater algumas doenças.

As plantas medicinais da família Lamiaceae são de grande diversidade e variedade com ampla distribuição no mundo, habitam em diferentes ecossistemas naturais e são bastante cultivadas (Carović-Stanko et al., 2016). São facilmente caracterizadas pelo caule ereto e ramificado podendo atingir de 50 a 100 cm de altura. Suas folhas possuem coloração variada, a partir de tons de verde ou roxo, podendo ser lisas ou onduladas. As flores são pequenas e dispostas em ramos eretos, geralmente em grupos de três, podendo assumir tons de branco, lilás ou vermelho (Simon, 1985; Mathias, 2010).

O *Ocimum* spp. também denominado de alfavaca, alfavaca-cheirosa ou manjerição comum pertencente a família Lamiaceae, é uma espécie que possui ciclo anual ou perene, dependendo do local de cultivo ou de acordo com as características agroecológicas próprias. Quanto ao clima, a cultura se adapta a condições climáticas variadas, podendo ser cultivado o ano todo. Além disso, tolera baixas temperaturas, porém seu desenvolvimento nessas condições é mais lento (Rosado et al., 2011).

A espécie de manjeriço (*Ocimum basilicum L. var minimum*) nativa da Índia é conhecida em todo o mundo devido às propriedades aromáticas e medicinais do óleo essencial obtido a partir de suas partes aéreas. O linalol e o eugenol são conhecidos como seus principais constituintes (Zabaras et al., 2001), no entanto, há variações consideráveis dos principais constituintes de óleos essenciais cultivados em diferentes regiões do mundo, a exemplo do linalol (52,7%) foi encontrado como componente principal em S.Tome, eugenol (75,5%) em Gabon e acetato de gerânio (69,48%) em Içel, Turquia, pesquisadores explicam que as diferenças foram devidos aos fatores ambientais e genéticos. (Onar et al., 2010; Telci et al., 2009).

Segundo Onar et al. 2010, o manjeriço é facilmente cultivado em casa, podendo ser uma alternativa de repelentes porque constituem uma fonte potencial de produtos químicos bioativos e normalmente não têm efeitos nocivos. Seu óleo essencial, que possui amidas, ésteres e outros compostos polifuncionais, são conhecidos por serem bons repelentes quando associados à outras culturas despertando interesse dos pesquisadores.

2. Importância do Óleo Essencial

O óleo essencial do *Ocimum* spp. está presente principalmente nas folhas, no entanto, pode ser encontrado em todas as partes da planta medicinal, é bastante valorizado nas indústrias de cosméticos, alimentícias, pesticidas, e em especial interesse para indústria farmacêutica; pois é utilizado como sedativo, expectorante e antipirético (Carović-Stanko et al., 2016).

Possui benefício para o alívio da fadiga mental, constipações, rinite, e como um tratamento de primeiros socorros para picadas de vespa e cobra. Além disso, em temperatura elevada é utilizado para o tratamento de náuseas, flatulências e disenteria (Özcan, 2002). As folhas in natura de *Ocimum* spp são usadas na medicina popular como diurético depurativo e vermífugo, também contra úlceras e bronquites (Pereira et al., 2015). Essa importância deve-se à presença de substâncias específicas tais como estragol, lineol, linalol, eugenol, metil cinamato, limoneno, geraniol, calareno e chavicol (Barros et al., 2014).

Quanto à composição do óleo essencial de folhas e inflorescências de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) verificou que houve variação na

composição do óleo em função da época. Nas folhas o componente majoritário foi o eugenol no verão, e o β -selineno e o trans-cariofileno no inverno. Nas inflorescências os níveis de eugenol foram baixíssimos e o 1,8-cineol foi o principal composto, sendo que no outono o seu teor foi reduzido (Marques, 2016).

Outro fator relevante na alteração do rendimento e composição química dos óleos essenciais é a precipitação. Chuvas intensas e constantes podem resultar na perda de substâncias hidrossolúveis presentes, principalmente, nas folhas e flores. Recomenda-se aguardar aproximadamente três dias após o cessar das chuvas para realizar a coleta, para que os teores de óleo essencial possam voltar ao normal. Por outro lado, estudos realizados com o intuito de avaliar a influência do estresse hídrico sobre a composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* demonstraram que, sob condições de estresse, houve redução do rendimento de massa seca total, ocorrendo, porém, um rendimento de óleo duas vezes maior. Os seus componentes tiveram alterações significativas, havendo redução no percentual de sesquiterpenos e aumento no percentual de linalol e metilchavicol (Simon *et al.*, 1992).

3. Cultivo de Plantas Medicinais em Consórcio e Fatores Ambientais

Quanto ao cultivo, segundo autores a associação de culturas é um sistema antigo e é praticado amplamente nas regiões tropicais, sobretudo por pequenos agricultores. Em horticultura, o sistema de cultivo misto ou intercalado tem despertado a atenção de pesquisadores, principalmente pela riqueza das interações ecológicas, do arranjo e manejo das culturas e da importância econômica (Vieira *et al.*, 2012). Estudos de consórcio de culturas estão contribuindo para a descoberta da avançada tecnologia da consorciação em relação ao monocultivo, quanto ao aumento da produtividade das espécies vegetais (Cecílio Filho *et al.*, 2008). Para Frison *et al.* (2011) há um reconhecimento generalizado da importância da manutenção da diversidade e variedade de culturas em sistemas de produção, a fim de evitar a vulnerabilidade e perda da colheita generalizada como resultado do efeito de um biótico particular ou estresse abiótico em uma monocultura geneticamente uniforme.

Na produção em consórcio de hortaliças com espécies medicinais visa diversificar o sistema produtivo, trabalhando com a biodiversidade funcional do

local e ainda produzindo alimentos isentos de agrotóxicos e agroquímicos (Carvalho; Filho, 2009). O consórcio de espécies destaca-se por oferecer aos produtores, o manejo de culturas, substituindo sistemas simplificados por diversificados, aumentando a produtividade por unidade de área. É necessário mais estudos sobre novos tipos de consórcios, uma vez que a introdução de espécies medicinais no sistema pode garantir maior opção de renda e contribuir no equilíbrio do agroecossistema, reduzindo os prejuízos ambientais e de custos causados pelos insumos químicos. Além disso, a utilização de hortaliças de fácil manuseio, de ciclos curtos e de ótima adaptação contribui para o cultivo consorciado (Maia et al., 2010; Santo et al., 2013).

A qualidade e eficiência das plantas medicinais dependem da identificação correta, fatores ambientais, condições de cultivo, época de colheita e condições de secagem. Assim, uma planta medicinal pode ser eficaz quando cultivada em determinado ambiente e ineficaz sob outras condições ambientais, devido a alterações no metabolismo secundário, na produção e armazenamento de princípios químicos desejáveis (Castro et al., 2004; Bouredja et al., 2017), pois muitas substâncias químicas presentes nos vegetais podem levar ao surgimento de um efeito alelopático, o qual se refere à capacidade que as plantas têm de interferir na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras, por meio de substâncias que estas liberam na atmosfera, ou quase sempre no solo (Arashiro et al., 2011). O óleo essencial é uma das substâncias ativas provenientes do metabolismo secundários das plantas medicinais (Milevskaya et al., 2017).

4. Metabolismo Secundário

As plantas medicinais produzem uma variedade de compostos orgânicos de baixo peso molecular, geralmente ramificado em duas grandes classes: metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento, enquanto os metabolitos secundários atuam como moléculas de defesa para proteger as plantas em condições adversas influenciadas por uma série de fatores bióticos e abióticos (Afrin et al., 2015). Os metabolitos secundários possuem alta valorização na indústria de biopesticidas onde são utilizados para o tratamento mais seguro de doenças

(Suroowan et al., 2017). Por exemplo, o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Sumit et al., 2015). Um grande número de plantas apresenta propriedades importantes de compostos antifúngicos, antimicrobianos e antioxidantes em seus óleos essenciais e extratos. Essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença a ser controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação dos produtos (Silva et al., 2005).

5. Podridão Vermelha do Sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta de grande importância econômica na região Nordeste do Brasil. No entanto, a podridão vermelha do tronco, tem sido o principal problema fitossanitário desta cultura, causando danos econômicos consideráveis (Leal et al., 2016).

A planta do sisal é uma cultura com características bem específicas, com folhas pontiagudas e espinhos nas pontas, medindo cerca de 9 cm de largura e aproximadamente 1,5 metros de comprimento, quando a planta se torna adulta em média 8 anos, em algumas espécies pode chegar na fase adulta em até 15 anos. Um dos aspectos do sisal é emitir apenas uma floração em todo ciclo de vida, morrendo logo em seguida (Seagri, 2017). Originada no México, região de Yucatan, pertence à família Agavaceae e ao gênero *Agave*. A espécie mais cultivada é a *Agave sisalana* Perrine e foi introduzida no Brasil, na Bahia, na região de Madre de Deus e Maragogipe, por volta de 1903, trazidos da Flórida por uma empresa americana (Wikipedia, 2017). O sisal necessita de clima quente e grande luminosidade, condições que encontrou na região do nordeste brasileiro para o estabelecimento e expansão do seu cultivo. Além disso, devido suas características com folhas carnosas e suculentas, epiderme cutinizada e redução de estômatos, o sisal adaptou-se bem à região semi-árida, onde encontrou condições favoráveis para o seu crescimento. Teve sua disseminação inicialmente no estado da Paraíba e só depois na Bahia (CNA, 2017). Suas fibras industrialmente modificadas rendem cerca de 82 milhões de dólares por ano para o Brasil, além de gerar mais de meio milhão de empregos (Souza, 2010).

Os subprodutos do sisal após o desfibramento e/ou beneficiamento também podem ser aproveitados. A mucilagem, após ser retirada a bucha, é utilizada como adubo orgânico e na alimentação de rebanho bovino e caprino, mas em pequenas quantidades e sem o tratamento adequado. O suco do sisal é rico em hecogenina e é usado como medicamento ou bioinseticida, no controle de larvas nos primeiros estágios de vida de nematóides e carrapatos. O substrato restante ainda pode ser usado para o cultivo de cogumelos comestíveis (Souza, 2010). O sisal é importante na agricultura familiar dos municípios da região sisaleira da Bahia, uma vez que gera renda pela venda de produtos derivados e pela exportação da fibra natural. No entanto, nos últimos anos a cultura vem sofrendo em sua produção devido à podridão vermelha, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* (Soares et al., 2006).

O gênero *Aspergillus* constitui um grupo de fungo filamento variado e com importância em diversos segmentos da sociedade. Organismos pertencentes a esse grupo possuem importância agrícola, científica, cultural, farmacêutica, industrial e patológica. Podem ser isolados de vários ambientes, sendo encontrados em quase toda natureza, causando podridão em órgãos vegetais, crescendo e se reproduzindo em diferentes fontes, mostrando uma enorme flexibilidade nutricional (Baker; Bennett, 2008; Varga et. al., 2011). A espécie *Aspergillus niger*, dentre todas do gênero, é a mais fácil de ser identificada devido à característica micelial esbranquiçada a amarelada de onde partem conídios escuros.

No caso dos fungos são mais de 10.000 espécies podem causar doenças em plantas, além da destruição e limitação da produção de micotoxinas que chegam a gerar perdas significativas em produtos agrícolas no mundo (Pandey et al., 2017). Outros trabalhos mostram o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (Schwan-estrada e Stangarlin, 2003). Skotti, et al. 2016, também relatam que muitos patógenos fúngicos causam sérios danos a uma grande quantidade de culturas com impactos significativos para a economia agrícola.

A podridão vermelha, também conhecida como podridão do caule, caracteriza-se por apresentar os seguintes sintomas: amarelecimento e murcha das folhas,

com a descoloração avermelhada do caule até a base das folhas, aliado ao apodrecimento do tronco, causando o desprendimento do solo e morte da planta. As folhas murchas não servem para o desfibramento e comercialização da fibra. As folhas de sisal afetadas por essa doença perdem a sua turgescência, não se prestam ao desfibramento e morrem com o progresso dos sintomas (Sá, 2013). A podridão vermelha é fatal para a planta infectada, que sobrevive por algum tempo, em função da natureza progressiva do apodrecimento causado pelo fungo (EMBRAPA, 2017). Para penetrar e infectar os tecidos da planta *A. niger* necessita de lesões mecânicas ou fisiológicas, com isso, ferimentos causados devido ao corte das folhas para o desfibramento e aqueles causados por instrumentos utilizados para realização de tratamentos culturais, constituem importantes meios para penetração desse fitopatógeno (Sá, 2013).

A única forma de evitar maior propagação da doença nas áreas de produção é a utilização de medidas preventivas, tais como arrancar e queimar plantas que apresentarem os sintomas; plantar rebentos vindos de áreas sadias para implantação de novos campos; utilizar o resíduo do desfibramento como adubação orgânica para evitar estresses nutricionais à planta; e manter por maior tempo a umidade do solo e o plantio consorciado com outras culturas (Magalhães, 2013). Diante deste cenário esse trabalho busca por alternativa na prevenção e controle do fitopatógeno *A. niger* causador da podridão vermelha no sisal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUNBIADE, S.O. et al. Evaluation of the Nutritional, Phytochemical Compositions and Likely Medicinal Benefits of Vernonia amygdalina, Talinum triangulare and Ocimum basilicum Leafy-Vegetables. **Advan. Biol. Res.**, 9 (3): 151-155, 2015.

ARASHIRO, M. P. et al. Cultivo consorciado entre *Achillea Millefolium* L. e *Rosmarinus officinalis* L. e seu efeito no rendimento do óleo essencial, biomassa e atividade antimicrobiana. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 3, p. 373-380, 2011.

BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. p.554-556, 2008.

BARROS, et al. Extração do óleo de manjeriço usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1499-1505, ago, 2014.

CNA. Sisal: problemas e soluções. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 20/10/2017.

EMBRAPA – Cultivo do Sisal. Disponível em: (<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>). Data de Acesso: 16 de Maio de 2017.

FAVORITO, P.A. et al. Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, especial, p.582-586, 2011.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, 1829, 2010.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**. São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

GAMA, E.V.S. et al. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agron. Sustain. Dev.** 649–656, 2015.

GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. (Ed.). The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. **Boca Raton**: CRC Press, 3-11, 2016.

LEAL, T. T. B., OLIVEIRA, F. E. R., OLIVEIRA, V. C., GONZALEZ, S. D. P., SILVA, R. M., REIS, A. S., SILVA, F. Extrato de *Pimenta dioica* no controle *in vitro* de *Aspergillus niger*, patógeno da cultura do sisal. **Magistra**, V. 28, 254-260, 2016.

MAGALHÃES, V. C. Uso De Isolados Bacterianos No Controle Da Podridão Vermelha Do Sisal. **Dissertação**, 2013.

MARQUES, M. A. A.; LIMA, D. A.; ANDREOTTI, C. E.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; LOURENÇO, E. L. B. Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no Brasil. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, 183-188, 2016.

ÖZCAN M., CHALCHAT J.-C. SLOŽENÍ SILIC Z *Ocimum basilicum* L. a *Ocimum minimum* L. tureckého původu. **Czech J. Food Sci.**, 20: 223–228, 2002.

PANDEY, A.K., KUMAR, P., SINGH, POOJA, TRIPATHI, N.N., BAJPAI, V.K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Front. Microbiol.** 7:2161. doi: 10.3389/fmicb.2016.02161, 2017.

PEREIRA, C. et al. A Comparison of the Nutritional Contribution of Thirty-nine Aromatic Plants used as Condiments and/or Herbal Infusions. **Plant Foods Hum Nutr.** 70:176–183, 2015.

ROSADO, L. D. S. et al. Influência do processamento da folha e tipo de Secagem no teor e composição química do óleo Essencial de manjeriço cv. Maria bonita. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr., 2011.

SÁ, J. O. Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e Actinobactérias. Cruz das Almas, 2013. 136p. **Tese** (Doutorado em Ciências Agrárias). UFRB, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. ; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, Out. 2017.

SEAGRI. A cultura do sisal. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Sisal>. Acesso em: 10 out. 2017.

SIMON, J. E.; REISS-BUBENHEIM, D.; JOJY, R. J. *et al.* Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research** 4: 71-75. 1992.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. DE S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. DA S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, **Anais**. BA. 2006.

SOUZA, L. S. S. Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do Sisal. **Dissertação**, Área de Concentração: Fitotecnia, 2010.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, **The Netherlands**, v. 69, 1-17, 2011.

WIKIPEDIA. Sisal. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sisal>. Acesso em: 10 out. 2017.

CAPÍTULO 1

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* SOBRE *Aspergillus niger*
var. *niger* (van Tiegh.)¹**

¹ Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Industrial Crops, em versão na língua inglesa.

Atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato metanólico de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* sobre *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.)

Resumo: Os óleos essenciais e os extratos de plantas medicinais são fontes importantes de compostos antimicrobianos e antifúngicos. O óleo essencial de manjerição é muito valorizado comercialmente, devido à presença de substâncias específicas como estragol, lineol, linalol, eugenol, metil cinamato, limoneno, geraniol, calareno e chavicol. Algumas plantas produzem esses compostos secundários, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou serem precursores no desenvolvimento de produtos agrícolas. O microrganismo *Aspergillus niger* se destaca tanto pela frequência de ocorrência quanto pela severidade da doença causada no sisal, a podridão vermelha. O objetivo no trabalho foi avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial e dos extratos metanólicos de manjerição (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) sobre o fungo fitopatogênico de *A. niger*. Os óleos essenciais foram extraídos pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Os extratos foram obtidos a partir dos resíduos sólidos provenientes da hidrodestilação do óleo essencial, após seco em estufa, foram submetidos a uma extração com o solvente metanol. O isolado de *A. niger* foi proveniente da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. A avaliação da atividade antimicrobiana foi pelos métodos de concentração inibitória mínima (CIM), exposição aos voláteis e o método de difusão de ágar. Os tratamentos foram compostos por cinco dosagens de cada óleo e extrato, nas concentrações de 15, 10, 5, 2,5, 1,25 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ e 30, 25, 20, 15, 10 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O óleo essencial e o extrato metanólico de manjerição mostraram se eficiente sobre o fungo *A. niger*. Os resultados encontrados foram promissores no uso de óleos essenciais e os extratos metanólicos de manjerição no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha do sisal.

Palavras chaves: plantas medicinais, manjerição, ação antimicrobiana, fungo fitopatogênico.

Antimicrobial activity of essential oil and *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* methanolic extract I. in the control of *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.)

Abstract: Essential oils and extracts of medicinal plants are important sources of antimicrobial and antifungal compounds. The essential oil of basil is highly appreciated commercially due to the presence of specific substances such as estragole, lineol, linalool, eugenol, methyl cinnamate, limonene, geraniol, calareno and chavicol. Some plants produce these secondary compounds, which can be used for the development of new natural defensives or be precursors in the development of agricultural products. The microorganism *Aspergillus niger* stands out as much for the frequency of occurrence as for the severity of the disease caused in the sisal, the red prodigion. The objective of the work was to evaluate the in vitro antifungal potential of the essential oil and the methanolic extracts of *Ocimum minimum* L. in the control of the phytopathogenic fungus of *A. niger*. The essential oils were extracted by the hydro-distillation process in Clevenger apparatus. The extracts were obtained from the solid residues from the hydrodistillation of the essential oil, after drying in the greenhouse, they were subjected to a continuous extraction in Soxhet apparatus with methanol solvent. The isolate of *A. niger* was obtained from the culture collection of the Agricultural Microbiology Laboratory of the UFRB. The evaluation of the antimicrobial activity was by the methods of minimum inhibitory concentration (MIC), exposure to volatiles and agar diffusion method. The treatments were composed of five doses of each oil and extract, in the concentrations of 15, 10, 5, 2.5, 1.25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and 30, 25, 20, 15, 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively. The essential oil and the methanolic extract of *O. minimum* L. were efficient in the control of the *A. niger* fungus. The results found are promising in the use of essential oils and methanolic extracts of *O. minimum* L. in the control of *Aspergillus niger*, which causes red sisal rot.

Key words: medicinal plants, basil, antimicrobial action, phytopathogenic fungus.

INTRODUÇÃO

A indústria está cada vez mais interessada nos estudos de plantas medicinais e seu uso diverso em diferentes regiões do mundo. Algumas plantas produzem compostos secundários, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou serem precursores no desenvolvimento de produtos agrícolas (Bouredja et al., 2017). O Brasil possui uma das maiores biodiversidade de plantas do mundo, pelo tipo do clima e flora específicos (Penido et al., 2016).

De acordo com Marques et al., 2016 plantas medicinais são consideradas todas as plantas que possuem capacidade de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade, ou seja, possuem constituintes bioativos com ação terapêutica. As plantas medicinais podem conter um ou mais princípios ativos com atividade biológica útil à saúde humana (Favorito et al., 2011; Firmo et L., 2011).

As plantas medicinais da família Lamiaceae possuem grande diversidade e variedade com ampla distribuição, habitam em diferentes ecossistemas naturais e são bastante cultivadas (Carović-Stanko et al., 2016).

Os óleos essenciais aromáticos estão presentes principalmente nas folhas, no entanto, eles podem ser encontrados em todas as partes das plantas medicinais. São de grande interesse para indústrias de cosméticos, alimentícias, pesticidas, e em especial interesse para a farmacologia; pois é utilizado como sedativo, expectorante, antipirético (Carović-Stanko et al., 2016). Os óleos essenciais e os extratos de plantas medicinais são fontes importantes de compostos antimicrobianos e antifúngicos, a exemplo do gênero *Ocimum* spp. (Milevskaya et al., 2017). Diversos trabalhos com óleos essenciais têm indicado o seu potencial no controle de bactérias (Silva Et Al., 2010; Demuner Et Al., 2011; Nascimento Et Al., 2011) e de fungos fitopatogênicos (Veloso Et Al., 2012). A inibição do desenvolvimento de fungos pode ser tanto por sua ação direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de resistência a diversos patógenos (Perini et al., 2011; Seixas et al., 2011; Garcia et al., 2012; Passos et al., 2012).

A espécie de manjeriço (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) nativa da Índia é conhecida em todo o mundo devido às propriedades aromáticas e medicinais do óleo essencial obtido a partir de suas partes aéreas. O linalol e o eugenol são conhecidos como seus principais constituintes (Zabaras et al., 2001). Segundo Onar et al. 2010, as plantas de manjeriço facilmente cultivado em casa, podem ser uma fonte alternativa de repelentes porque constituem uma fonte potencial de produtos químicos bioativos e normalmente não têm efeitos nocivos. Seu óleo essencial incluindo amidas, ésteres e outros compostos polifuncionais são conhecidos por serem bons repelentes, despertando muito interesse dos pesquisadores.

As plantas medicinais produzem uma variedade de compostos orgânicos de baixo peso molecular, geralmente ramificado em duas grandes classes: metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento, enquanto os metabolitos secundários atuam como moléculas de defesa para proteger as plantas em condições adversas influenciadas por uma série de fatores bióticos e abióticos, ou seja, atuam na adaptação da planta (Afrin et al., 2015). Os metabolitos secundários possuem alta valorização na indústria onde são utilizados para o tratamento mais seguro no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Sumit et al., 2015, Suroowan et al., 2017).

Algumas espécies de fungos podem causar doenças em plantas, ecossistemas e meio ambiente podendo gerar perdas significativas de produtos agrícolas (Pandey et al., 2017). Skotti, et al. 2016, também relatam que muitos patógenos fúngicos causam sérios danos a uma grande quantidade de culturas com impactos significativos para a economia agrícola. Entre eles o gênero *Aspergillus* spp. é considerado um importante fitopatógeno de plantas no mundo, causando a Podridão vermelha do sisal (Ellis et al., 2014).

Diante disso no presente trabalho teve-se por objetivo avaliar o potencial antifúngico in vitro do óleo essencial e dos extratos metanólicos de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* no controle do fungo fitopatogênico de *A. niger*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

A produção de mudas das espécies medicinais foi realizada em casa de vegetação na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, município de Cruz das Almas, BA. As mudas de manjerição foram produzidas a partir de sementes, obtidas de empresa comercial, utilizando como substrato areia lavada, composto orgânico na proporção 2:1 e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Posteriormente as mudas ao atingirem aproximadamente 10 cm de altura foram transplantadas para uma escola municipal da zona rural no município de Santo Antônio de Jesus, Bahia. Realizou se adubação no plantio com esterco bovino na dose de 100 kg ha⁻¹. A espécie *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* foi cultivada em consórcio com as culturas de manjerição, tomate e cenoura e sem estarem em consórcio, somente manjerição. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com dois tratamentos (consorcio e solteiro) e quatro repetições para cada tratamento. A espécie foi coletada de acordo com o ciclo de cada cultura. Após a colheita, os componentes (folhas e caules) das plantas foram desidratados em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C por 72 horas, até alcançar massa constante, para posteriores análises.

Extração de Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido a partir das plantas secas, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger de vidro, utilizando-se 50 g de plantas homogeneizadas submetidas às 2h de destilação para cada amostra (Santos et al., 2014). As mesmas foram colocadas num balão de fundo redondo com uma capacidade de 5 L com 3 L de água destilada. Depois de recolher o óleo essencial, foi adicionado sulfato de sódio para retirar o excesso da água, o óleo foi armazenado em frasco de vidro e mantido em refrigeração até análise (Santos et al., 2014).

Preparo do Extrato Vegetal

O material vegetal (folhas e caules) foi obtido no Laboratório de Fitoquímica da UFRB em Cruz das Almas, a partir do resíduo da extração do óleo essencial. Após esse processo, foram secos em estufa com circulação de ar a 40°C até

massa constante. Em seguida, pulverizado em moinho de facas, visando padronizar o tamanho de partículas do pó da planta, pesado e armazenado em sacos de papel identificados mantidos em temperatura ambiente. As folhas e os caules secos e triturados foram primeiramente submetidos à extração exaustiva por maceração a frio com Metanol em erlemeyer de 2 litros, durante 72 horas. A quantidade de solvente colocado sobre o material vegetal foi o suficiente para cobrir a amostra e, durante a maceração os recipientes ficaram armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período, realizou-se a filtragem e a concentração do extrato, que ocorreu sob pressão reduzida por meio da rotaevaporação em temperatura constante de 40°C, obtendo-se o extrato bruto Metanólico. O processo foi repetido por três vezes (Matos, 1997).

Testes antifúngicos:

A avaliação do potencial antifúngico foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da UFRB em Cruz das Almas e determinada por três métodos: a concentração inibitória mínima (CIM), exposição aos voláteis e o método de difusão de ágar.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada a metodologia descrita através das técnicas de microdiluição em caldo (Eloff 1998; Kusucu et al., 2004). O microrganismo usado nesse estudo foi previamente obtido da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. Os tratamentos (Consórcio e Solteiro) foram compostos por cinco dosagens de cada óleo e extrato, nas concentrações de 15, 10, 5, 2,5, 1,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 30, 25, 20, 15, 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. Para controles foram utilizados: *A. niger*, diluente Tween 20 (10%) e DMSO (20%), Ciclopirox Olamina 10mg/ml, óleo e extrato e o meio de cultivo batata e dextrose (BD). O delineamento foi inteiramente casualizados com cinco repetições por tratamento.

Inicialmente foram preparadas soluções mãe dos óleos essenciais e extratos metanólicos em Tween 20 (10%) e DMSO (20%) respectivamente, na concentração de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial e de 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato metanólico. As soluções dos óleos essenciais e extratos metanólicos foram

distribuídas, em triplicata na primeira fileira de uma placa de 96 poços, contendo 140 µL de cada concentração e 10µL do microrganismo com um volume final de 150µL por poço. A suspensão dos microrganismos foi ajustada a uma concentração de 10⁶ CFU/mL. Após a adição de 100 µL de suspensão de esporos as placas foram vedadas com filme PVC e incubadas em B.O.D. por 72 horas a 28°C. A avaliação se deu através da observação do crescimento do microrganismo nos poços visualmente comparado ao controle positivo.

Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), foi realizado o cultivo das amostras onde não houve crescimento visualmente, com o objetivo de avaliar o efeito fungicida ou fungistático das amostras.

Germinação de Esporos

A avaliação da inibição da germinação de esporos se deu adicionando na placa de Elisa 100 µL do meio BD, em poços de placas de microtitulação. Em seguida adicionou-se 100 µL do óleo essencial e do extrato metanólico nas concentrações pré-estabelecidas e 100 µL da suspensão de esporos de *A. niger* na concentração 10⁶ CFU/mL. Os controles foram constituídos pelos diluentes do óleo e do extrato (controle negativo), meio de cultivo batata e dextrose (BD) sem adição do óleo e extrato (controle do meio), meio de cultura e microrganismo e controle positivo (controle com antifúngico). As placas foram incubadas em câmara de crescimento BOD a 37° C e após 12 a 16 horas da montagem do experimento observaram-se no tratamento controle 70% de esporos germinados, adicionando-se 10 µL de lactofenol para paralisar a germinação. A avaliação foi realizada por meio da contagem aleatória dos esporos, registrando-se o número de esporos germinados e não germinados no total de 100 esporos (Eloff 1998; Kusucu et al., 2004). A porcentagem de inibição da germinação de esporos dos óleos essenciais e dos extratos em cada concentração foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \frac{\text{GERM DO CONTROLE} - \text{GERM DO TRATAMENTO}}{\text{GERM DO CONTROLE}} * 100$$

Exposição aos voláteis

Neste método foi realizada a exposição dos fungos aos voláteis presentes no óleo essencial, no centro da tampa da placa de Petri foi adicionado um disco

de papel filtro estéril com o óleo essencial nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5 µL além do controle com com o diluente Tween 20 (10%), controle do fungo. Na base da placa foi adicionado o meio de cultura B.D.A com *Aspergillus niger*. A avaliação do crescimento micelial se deu através da medição a cada dia do diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais (longitudinal e transversal) finalizando com o crescimento por completo da colônia na testemunha totalizando 10 dias. A porcentagem de inibição dos óleos essenciais em cada concentração foi calculada através da fórmula:

$$I = (DTT-DTC) / DTT *100$$

Onde: DTT= diâmetro no tratamento testemunha; DTC= diâmetro no tratamento controle.

A esporulação foi determinada por meio da contagem do número de esporos produzido nas diferentes concentrações após o 10º dia de inoculação através da câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico. A porcentagem de inibição da esporulação foi calculada através da fórmula utilizada para inibição do crescimento micelial substituindo o diâmetro pelo número de esporos contabilizados (10^6 conídios.mL⁻¹) (Royse and Ries, 1977).

Difusão em Ágar

No método de diluição em meio de cultura o óleo essencial e o extrato metanólico de *O. minimum* L. nas concentrações (5, 10, 15 µL) e (20, 25, 30 µL) foi diluído em Tween 20 (10%) e DMSO (20%) respectivamente, e adicionado ao meio de cultura B.D.A. após esterilização em autoclave a 120°C. Após a homogeneização do meio com o óleo essencial estes foram distribuídos em placas de Petri além do tratamento controle sem adição de óleo. A avaliação do crescimento micelial e da esporulação se deu da mesma maneira descrita na metodologia anterior (Royse and Ries, 1977).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Germinação de esporos

Nos resultados da CIM dos óleos essenciais e dos extratos metanólicos de manjeriço observou-se que não houve diferença entre os resultados qualitativos dos óleos essenciais e dos extratos metanólicos de manjeriço produzidos individualmente e consorciados. Para o óleo essencial de manjeriço a concentração mínima inibitória foi $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, enquanto para o extrato metanólico foi de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Nesse estudo, tanto o óleo quanto o extrato tiveram atividade antimicrobiana com ação fungistática.

Segundo Mohr et al., 2017 este efeito antifúngico pode ser explicado pela composição química do óleo essencial. Compostos com anéis aromáticos e grupos fenol são capazes de formar ligações de hidrogênio com os locais ativos da enzima alvo, sendo a principal causa para os efeitos antimicrobianos do óleo essencial. Outros compostos como álcoois, aldeídos e ésteres também contribuem para a atividade antimicrobiana (Belletti et al., 2004). Os dois principais compostos encontrados no óleo essencial de manjeriço, linalol e 1,8-cineol, têm atividade antimicrobiana conforme relatado anteriormente na literatura (Pandey et al., 2014). O linalol pode causar desnaturação e desidratação proteica de células vegetativas, o que provoca a morte de microrganismos em contato com o óleo essencial. O linalol e o eugenol os principais constituintes do óleo essencial de manjeriço conferindo a atividade antimicrobiana ao óleo essencial e extrato metanólico. De acordo com Sethi et al., 2013 que testaram a atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais do gênero *Ocimum*, todos cultivados na Índia, observaram que a CIM do óleo extraído de *O. gratissimum* foi de $62,5 \mu\text{g} / \text{mL}$, os valores encontrado neste estudo ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) com o óleo essencial e o extrato metanólico ($20 \mu\text{g} / \text{mL}$) de manjeriço cultivados na Bahia apresentou uma melhor CIM em comparação ao estudo citado. Em outro estudo de Joshi, 2013 demonstrou que o CIM do óleo essencial de manjeriço para o controle do *Aspergillus* e *Penicillium* foi inferior a $1000 \mu\text{g} / \text{mL}$. Este resultado afirma a eficácia do óleo essencial como um inibidor dos fungos fitopatogênicos, corroborando com nossos resultados.

Os resultados da inibição da germinação de esporos de *A. niger* na Figura 1 (expressos em porcentagem) com óleo essencial de manjericão foi observada a partir da concentração de $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$, tanto para os cultivos solteiros quanto para os cultivos consorciados, percebe-se uma redução dessa germinação a partir da concentração de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Na Figura 2 (expressos em porcentagem), essa inibição da germinação de esporos de *A. niger* a partir do extrato metanólico foi a partir da concentração $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, tanto para os cultivos solteiros quanto para os cultivos consorciados, no entanto, percebe-se uma redução dessa germinação já na concentração $15 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

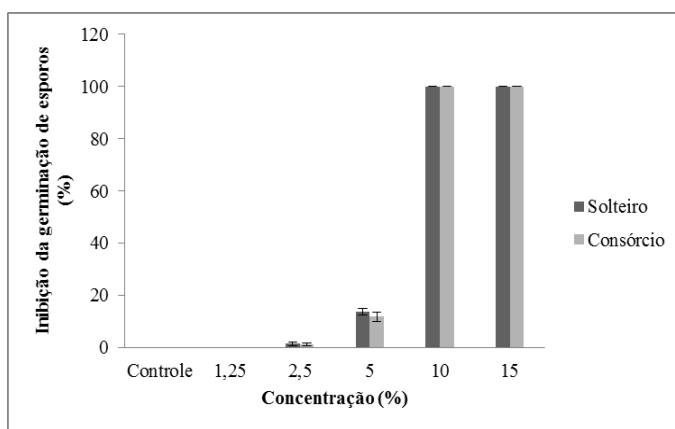


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações (%) do óleo essencial de manjericão na inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger*.

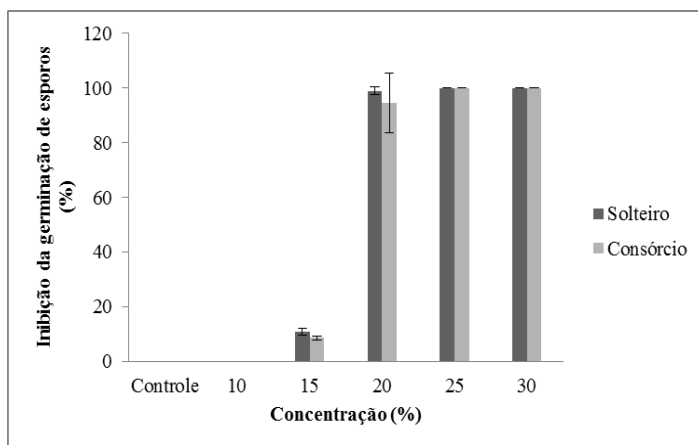


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações (%) do extrato metanólico de manjericão na inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger*.

De acordo com Schwan-Estrada et al., 2003 a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial

de plantas medicinais pode constituir mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas. Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais como *Ocimum basilicum* tem indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial, a germinação de esporos e a esporulação de fungos patogênicos, confirmados também neste estudo.

Exposição aos voláteis

O fungo *A. niger* quando submetido à diferentes concentrações do óleo essencial de manjeriço demonstrado na Figura 3, mostrou uma inibição em seu crescimento melhor entre os cultivos consorciados, com uma maior inibição do crescimento na concentração $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) na Figura 4, verifica-se na concentração $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ houve diferença significativa entre os cultivos solteiros e consorciados. No entanto, a média do índice da velocidade de crescimento entre as concentrações manteve similares. No gráfico do efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjeriço na esporulação em (cm^2) do fungo *A. niger*, Figura 5, percebe-se tanto entre os cultivos solteiros e consorciados como também entre as concentrações 2,5 e $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

De acordo com Simões et al., 2000, os compostos voláteis presentes no óleo essencial podem induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos. Uma possível atribuição para a redução do potencial de inibição pode ser à volatilização dos constituintes dos extratos ou óleos, e/ou à instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais que modificam o interior das placas de Petri.

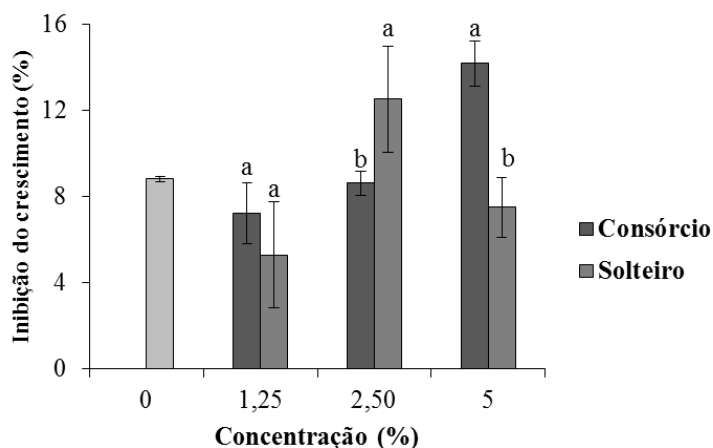


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjericão na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger*. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

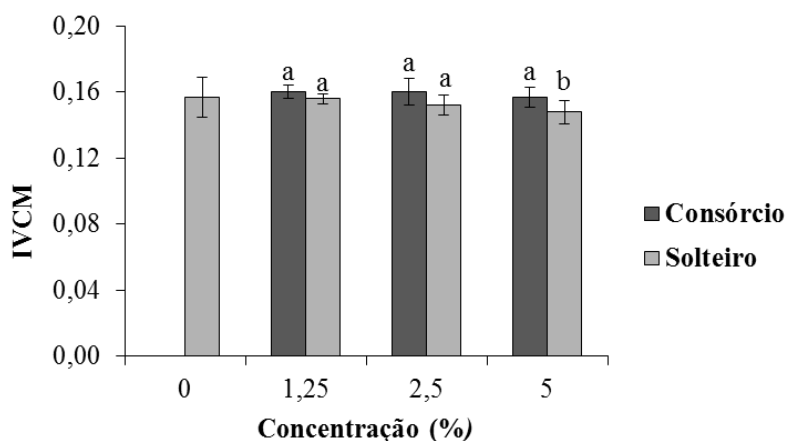


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjericão no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Aspergillus niger*. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

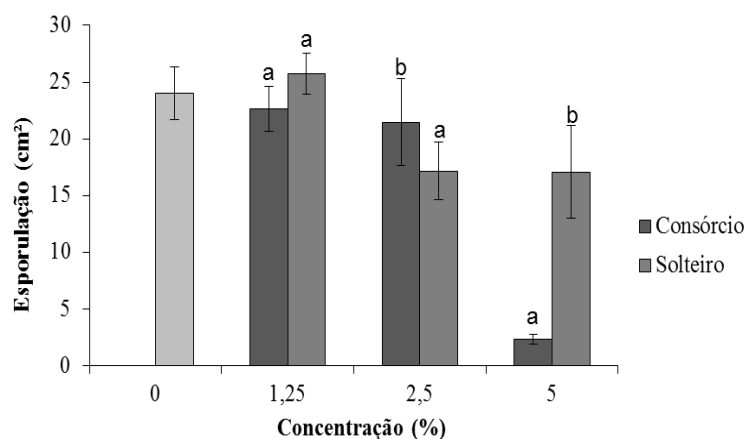


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjeriço na esporulação (cm²) do fungo *Aspergillus niger*. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Difusão em Ágar

O efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjeriço na inibição do crescimento micelial, no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e na esporulação do fungo *Aspergillus niger* para os testes *in vitro* de difusão em ágar está representado na Figura 6. Para a inibição do crescimento micelial do fungo *A. niger* percebe-se uma diferença de comportamento entre os cultivos consorciados e solteiros. Apresentando uma maior inibição para o cultivo consorciado na concentração 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e para o cultivo solteiro na concentração 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) observa-se uma diferença estatística entre os cultivos consórcios e solteiros na concentração 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, tendo um maior IVCM para o cultivo consorciado. Já nas concentrações 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 15 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ o maior IVCM foi maior para o cultivo solteiro. Na esporulação do fungo *Aspergillus niger* não houve diferença estatística entre os cultivos consórcios e solteiros. No entanto, percebe-se uma melhor esporulação na concentração 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o cultivo solteiro, já nas concentrações 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 15 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ houve uma maior esporulação nos cultivos consorciados.

Nos testes *in vitro* com o extrato metanólico representados na Figura 7, esse estudo apresentam melhor inibição do crescimento micelial para o cultivo

solteiro na concentração $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, já nas concentrações $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $30 \mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentou melhor inibição do crescimento para o cultivo consorciado. Para IVCM observe-se uma diferença estatística entre os cultivos consórcios e solteiros para as concentrações $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, sendo o maior IVCM para o cultivo consorciado. Para concentração $30 \mu\text{L.mL}^{-1}$ não houve diferença estatística e nem no IVCM entre os cultivos consórcios e solteiros. Quanto à esporulação do fungo *A. niger* percebe-se um melhor resultado nas concentrações $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, para os cultivos consorciados. Já na concentração $30 \mu\text{L.mL}^{-1}$ a esporulação foi melhor para o cultivo solteiro.

Pandey et al., 2014 relatam que os óleos essenciais derivados de várias espécies de *Ocimum* foram estudadas como ativos contra várias bactérias Gram-positivos e Gram-negativas, bem como contra leveduras e fungos devido aos seus constituintes terpênicos. Recentemente, óleos essenciais e extratos de plantas medicinais demonstraram ter efeitos antimicrobianos. Além disso, relataram a atividade antifúngica do óleo de *O. basilicum* contra *Aspergillus ochraceus* e descobriu que o óleo era efetivo em 500 mg / L . Faria et al. (2006) identificaram atividade positiva do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, sendo o eugenol o composto ativo, sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria* spp. (isolados de cenoura e tomate), *Rhizoctonia* sp. e *Botryosphaeria rhodina*, por meio do método de difusão em ágar.

Pandey et al. trabalhou também na atividade antimicrobiana de *O. sanctum* contra sete bactérias (*Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhi*), e dois fungos filamentosos (*Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*) e uma levedura (*C. albicans*) e observou que o crescimento microbiano foi 100% inibido com óleo a 700 mg / L para bactérias e 300 mg / L para fungos. Recentemente, Singh et al. investigou que o óleo essencial de *O. canum* inibiu fortemente o crescimento micológico de sete espécies de fungos patogênicos pós-colheita (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Mucor* sp., *Penicillium italicum*, *Penicillium oxalicum* e *Rhizopus arrhizus*).

A utilização de extratos vegetais ressurgiu como uma opção diferenciada e promissora para o manejo integrado em proteção de plantas. Estes produtos são considerados uma alternativa de controle de fitopatógenos, demonstrando ótimos

resultados, não causando malefícios ao meio ambiente e aos seres vivos (Santos et al., 2013). Vários extratos já foram estudados para o controle de doenças e fungos, mostrando sua eficiência no controle de microrganismos causadores de grandes perdas na produção agrícola (Zanandrea et al., 2004, Itako et al., 2009, Brum et al., 2014, Gama et al., 2015). Um estudo utilizando o extrato aquoso de Pimenta dioica nas concentrações de 25% e 50% mostraram-se eficientes na inibição do crescimento micelial do *A. niger*, sendo que a concentração de 50% inibiu totalmente a esporulação do patógeno. Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) nas concentrações estudadas os melhores resultados foram alcançados nos tratamentos com 25% e 50% de extrato (Leal et al., 2016).

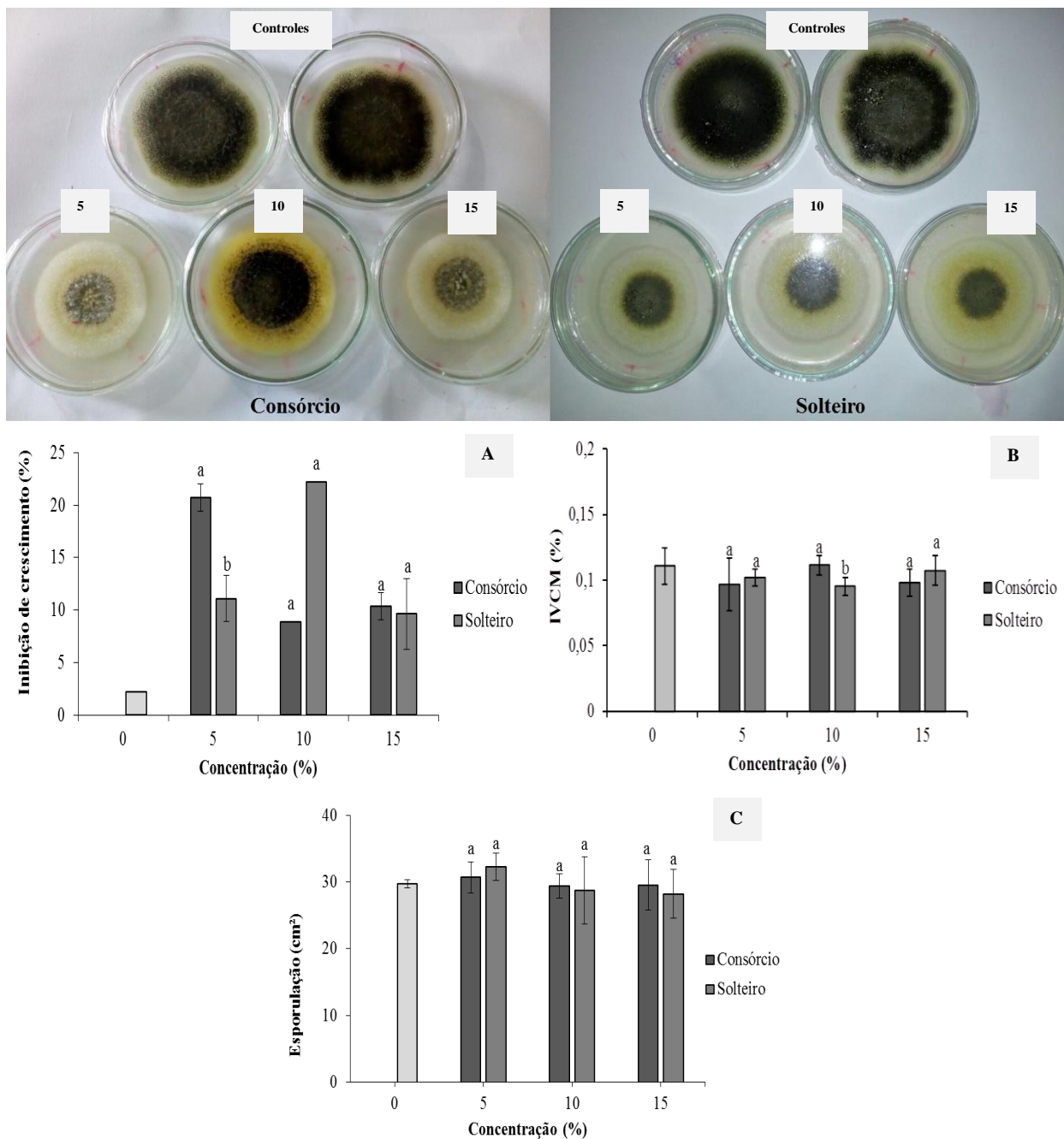


Figura 6. (A) Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de manjericão na inibição do crescimento da colônia, (B) índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e (C) na esporulação do fungo *Aspergillus niger*. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

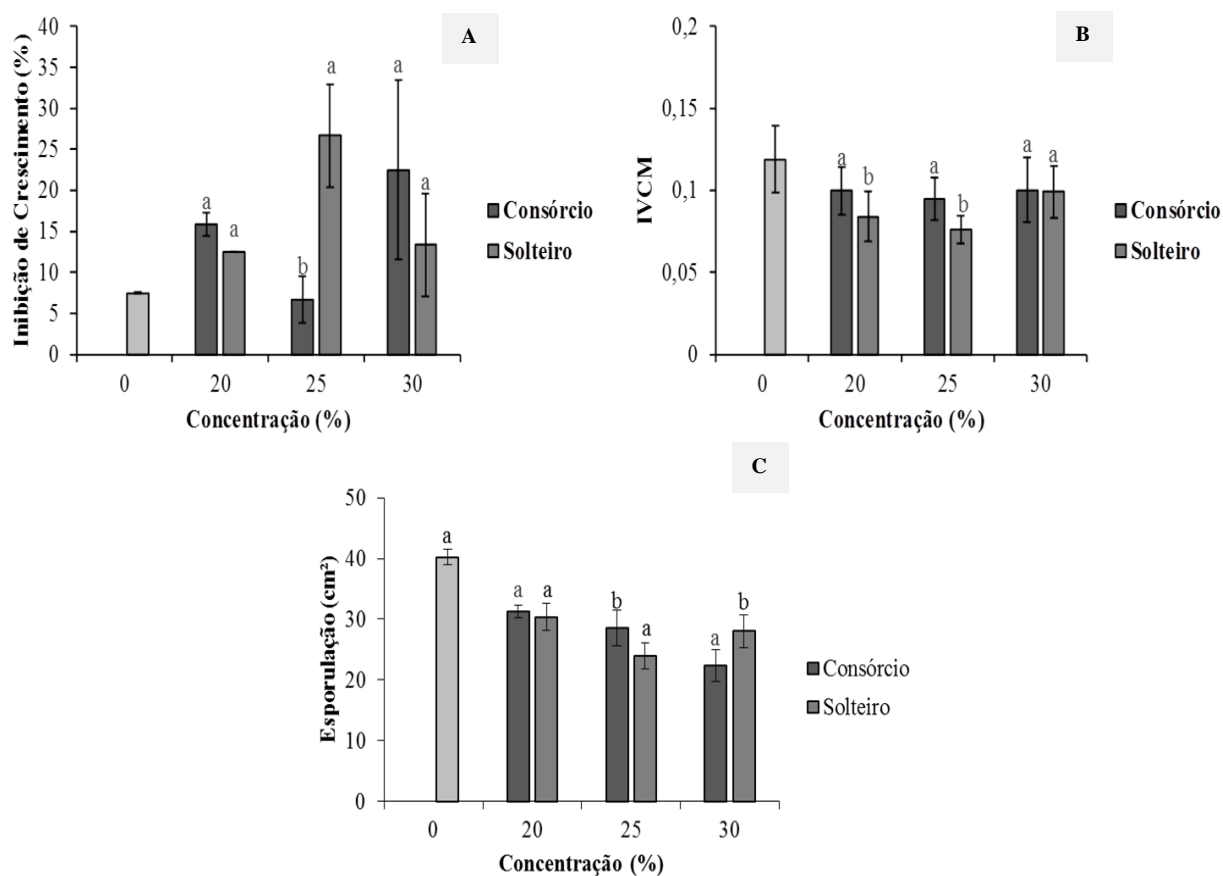
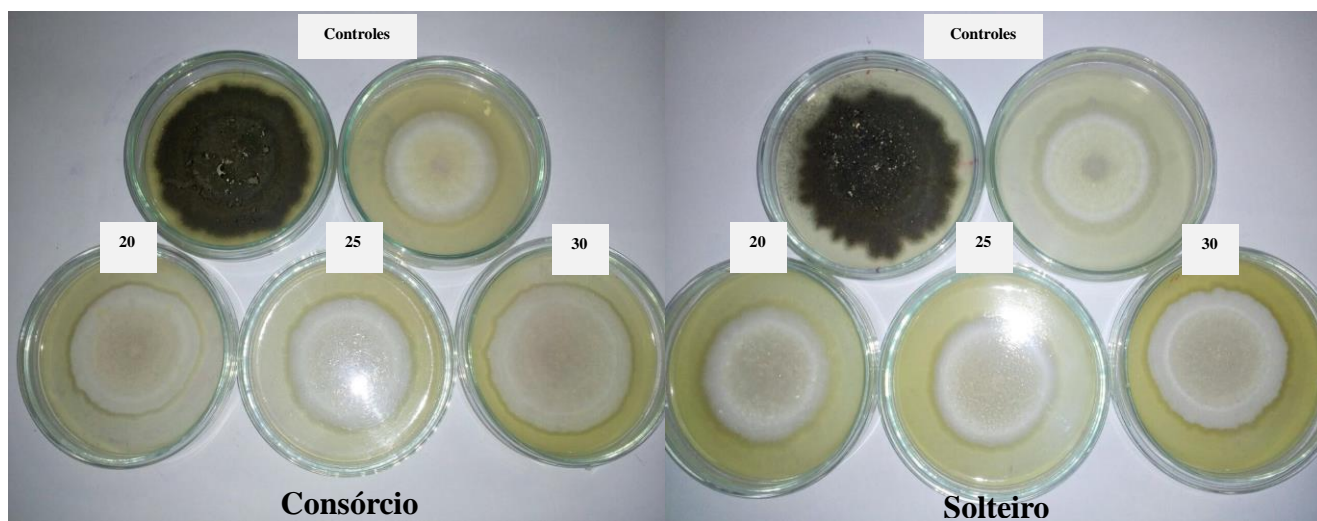


Figura 7. (A) Efeito de diferentes concentrações do extrato metanólico de manjeriço no diâmetro colônia, (B) índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e (C) na esporulação do fungo *Aspergillus niger*. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que tanto os óleos essenciais como os extratos metanólicos de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum*, oriundos do processo de hidrodestilação atuam no controle de *Aspergillus niger* nas concentrações testadas tanto no cultivo solteiro como no consorcio.

Os óleos essenciais apresentaram controle do *A. niger* em menores concentrações para os testes voláteis e difusão em ágar ($1,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) respectivamente. No entanto, como os extratos são subprodutos do processo de hidrodestilação cabe uma avaliação do seu potencial de uso, visando otimizar sua produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRIN, S.; HUANG, J.; LUO, Z. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants. **Sci. Bull**, 60(12):1062–1072, 2015.

BELLETTI N, NDAGIJIMANA M, SISTO C, GUERZONI ME, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.** 52: 6932-6938 <http://dx.doi.org/10.1021/jf049444v>, 2004.

BOUREDJA, N.; MESSAOUDI, N.; BENYAMINA, K. Ethnobotanical and floristic study of medicinal plants in the region of oued tlealt, algeria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Vol. 8(3), 1199-1204, 2017.

BRUM, R. B. C. S., CASTRO, H. G., CARDON, C. H., PEREIRA, A. S., CARDOSO, D. P., & SANTOS, G. R. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. **Magistra**, 26 (3), 365-375, 2014.

CAROVIĆ-STANKO, K.; PETEK, M.; GRDIŠA, M.; PINTAR, J.; BEDEKOVIĆ, D.; HERAK ĆUSTIĆ, M.; SATOVIC, Z. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae as Functional Foods – a Review. *Czech J. Food Sci.*, 34, 2016 (5): 377–39. citronela em função da adubação orgânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.12, p.1707-1713, 2012, 2016.

DEMUNER, A.J. et al. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v.16, n.2, p.1181-1191, 2011.

ELLIS, M.L., JIMENEZ, D.R., LEANDRO, L.F., MUNKVOLD, G.P. Genotypic and phenotypic characterization of fungi in the *Fusarium oxysporum* species complex from soybean roots. **Phytopathology**. 104, 1329-1339, 2014.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, 64: 711-713, 1998.

FAVORITO, P.A. et al. Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, especial, 582-586, 2011.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciênc. agrotec.** [on line]. vol.38, n.2, pp. 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

GAMA, E. V. S., SILVA, F., SANTOS, I., MALHEIRO, R., SOARES, A. C. F., PEREIRA, J. A., & ARMOND, C. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agronomy for Sustainable Development**, 35, 649-656, 2015.

Gandhi, S.G.; Mahajan, V.; Bedi, Y.S., 2015. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*. 241, 303–317.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, p.48-57, 2012.

ITAKO, A. T., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., TOLENTINO JR. J. B., & CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, 76 (1), 75 – 83, 2009.

JOSHI R. K. Chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. **Indian J. Pharm. Sci.** 75: 457-462, 2013. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.119834>.

KUSUCU, C.; RAPINO, B.; MCDERMOTT, L.; HADLEY, S. Comparison of the Semisolid Agar Antifungal Susceptibility Test with the NCCLS M38-P Broth

Microdilution Test for Screening of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, 42, 1224, 2004.

MARQUES, M. A. A.; LIMA, D. A.; ANDREOTTI, C. E.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; LOURENÇO, E. L. B. Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no Brasil. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, 183-188, 2016.

MILEVSKAYA, V.V.; TEMERDASHEV, Z.A.; BUTYL'SKAYA, T.S.; KISELEVA, N.V. Determination of Phenolic Compounds in Medicinal Plants from the Lamiaceae Family. **Journal of Analytical Chemistry**. 72, No. 3, 342–348, 2017.

MOHR, F.B.M. LERMEN, C. GAZIM, Z.C. GONÇALVES, J.E. ALBERTON, O. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genetics and Molecular Research** 16 (1), 2017.

NASCIMENTO, J.C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. *Magistra, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 361 - 371, Jul./Set. 2014. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.83, n.3, p.787-799, 2011.

ONAR, H.C.; HASDEMIR, B.; YUSUFOGLU, A. Chemical Composition and Repellent Activity of the Essential Oil of *Ocimum minimum* L. on *Drosophila* Species. **Asian Journal of Chemistry** Vol. 22, No. 2, 1131-1135, 2010.

PANDEY AK, SINGH P AND TRIPATHI NN. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 4: 682-694, 2014. <http://dx.doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C77>.

PANDEY, A. K., SINGH, P., TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an Overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 4(9): 682-694, 2014.

PANDEY, A.K., KUMAR, P., SINGH, POOJA, TRIPATHI, N.N., BAJPAI, V.K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Front. Microbiol.** 7:2161. doi: 10.3389/fmicb.2016.02161, 2017.

PASSOS, J.L. et al. Chemical Characterization of Volatile Compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their Antifungal Activity. **Molecules**, v.17, n.10, p.11447-11455, 2012.

PENIDO, A.B.; MORAIS, S.M.; RIBEIRO, A.B.; SILVA, A.Z. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, VOL. 46(4) 2016: 345 – 354, 2016.

PERINI, V.B.M. et al. Efeito de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and biodiversity**, v.4, n.1, p. 70-77, 2013.

ROYSE, D.; RIES, S. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. **Phytopathology** 68, 603–607, 1977.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Informe técnico: Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Belém, 2004.

SANTOS, P. L., PRANDO, M. B., MORANDO, R., PEREIRA, G. V. N., & KRONKA, A. Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, 9 (17), 2562-2576, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos, **Floresta** 30(1/2): 129-137, 2003.

SEIXAS, P.T.L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, no. spe, p. 523-526, 2011.

SETHI S, PRAKASH O, CHANDRA M, PUNETHA H, et al. Antifungal activity of essential oils of some *Ocimum* species collected from different locations of Uttarakhand. **Indian J. Nat. Prod. Resour.** 4: 392-397, 2013.

SILVA, C.J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, n.1, p.104-108, 2010.

SIMÕES, C.M.O. ;SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: **UFRGS/UFSC**, Cap.18. 1102p., 2000.

SKOTTI, E.; KOUNTOURI, S.; KAIAFA, M.; BOUCHAGIER, P.; TSITSIGIANNIS, DIMITRIOS I.; POLISSIOU, M.; TARANTILIS, PETROS A. Biological activity of selected Greek medicinal and aromatic plants extracts on *Alternaria alternata*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. 28, 796-804, 2016.

SOUZA, L. S. S., & SOARES, A. C. F. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. **Tecnológica**, 17 (2), 124-128, 2013.

SUROOWAN, S.; JAVEED, F.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; NOOR, M.J.; KAYANI, S.; JAVED, A.; MAHOMOODALLY, M.F. Ethnoveterinary health management practices using medicinal plants in South Asia – a review. **Vet Res Commun**, 41:147–168, 2017.

VELOSO, R.A. et al. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim Zabaras, D.; Wyllie, S.G. The Effect of Mechanical Wounding on the Composition of Essential Oil from *Ocimum Minimum* L. Leaves. **Molecules**, 6, 79-86, 2001.

ZANANDREA, I., JULIANO D. S., ANDRÉA, B. M., JULIANE, L., & VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14, 1 (supl.), 14-16, 2004.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum basilicum* L. var. *minimum*²

² Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, em versão na língua inglesa.

Atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato metanólico de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum*

Resumo: Os óleos essenciais e extratos são produtos naturais derivados de plantas medicinais, que possuem potencial no controle de doenças em plantas, pois possuem características antifúngicas, antioxidantes, antibacterianas e inseticidas, além disso, são pouco tóxicos ao meio ambiente e ao ser humano (Tomazoni et al., 2013). A avaliação do potencial antioxidante foi determinada por três métodos químicos: o efeito bloqueador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e pelo método do Poder Redutor. Aos resultados utilizando o método de DPPH, os valores EC50 para o óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) foram 1,653 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 1,356 mg mL⁻¹ para o solteiro. Já para o extrato metanólico de manjeriço foram 0,518 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 1,418 mg mL⁻¹ para o solteiro. Quando o óleo essencial de manjeriço foi submetido ao método ABTS os valores EC50 foram 1,35 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 0,999 para o cultivo solteiro. Para o extrato metanólico de manjeriço submetido ao método ABTS os valores EC50 foram 0,416 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 0,800 para o cultivo solteiro. O extrato metanólico de manjeriço foi submetido ao método do Poder Redutor, apresentando valores EC50 de 1,352 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 0,753 para o cultivo solteiro. Observe-se que para ação antioxidante apresentada tanto pelo óleo essencial quanto pelo extrato metanólico, ambos tiveram melhor resultados nos cultivos solteiros. No entanto, para o extrato metanólico aplicado ao método ABTS percebe-se melhor resultado para o cultivo consorciado.

Palavras-chave: Antioxidante, óleo essencial, extrato metanólico.

Antioxidant activity of the essential oil and the methanolic extract of *Ocimum minimum* L.

Abstract: Essential oils and extracts are natural products derived from medicinal plants, which have potential in the control of diseases in plants, as they have antifungal, antioxidant, antibacterial and insecticidal properties, and are also very toxic to the environment and to humans say, Tomazoni et al., 2013). The evaluation of the antioxidant potential was determined by three chemical methods: the free radical blocking effect DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS [2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and the Reducing Power method. To the results using the DPPH method, the EC50 values for the essential oil of *Ocimum minimum* L. were 1.653 mg mL⁻¹ for the consortiated culture and 1.356 mg mL⁻¹ for the single. Already for the methanolic extract of *Ocimum minimum* L. were 0.518 mg mL⁻¹ for the consortiated culture and 1.418 mg mL⁻¹ for the single. When the *Ocimum minimum* L. essential oil was subjected to the ABTS method, the EC50 values were 1.35 mg mL⁻¹ for the consortiated culture and 0.999 for the individual culture. For the methanolic extract of *Ocimum minimum* L. subjected to the ABTS method the EC50 values were 0.416 mg mL⁻¹ for the consortiated culture and 0.800 for the single culture. The minimal methanolic extract of *Ocimum* L. was subjected to the Reducing Power method, presenting EC50 values of 1.352 mg mL⁻¹ for the consortiated culture and 0.753 for the single culture. It is observed that for antioxidant action presented both by the essential oil and by the methanolic extract, both had better results in the single crops. However, for the methanolic extract applied to the ABTS method, a better result is perceived for the consortiated crop.

Key words: Antioxidant, essential oil, methanolic extract.

INTRODUÇÃO

Os extratos e óleos essenciais de plantas medicinais estão cada vez mais despertando o interesse no mercado de alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas devido a sua ampla utilização pelos consumidores e sua exploração por potencial de uso multifuncional (Riahi et al., 2013). Em particular, os óleos essenciais que desperta grande interesse pelo seu uso terapêutico na medicina humana, devido suas propriedades anticancerígenas, antiviral, antibacteriana e propriedades antioxidantes (Buchbauer, 2010). Os óleos essenciais e extratos são produtos naturais derivados de plantas medicinais, que possuem potencial no controle de doenças em plantas, pois possuem características antifúngicas, antioxidantes, antibacterianas e inseticidas e além disso, são pouco tóxicos ao meio ambiente e ao ser humano (Tomazoni et al., 2013). Dentre as várias espécies de plantas com ação antioxidante, algumas tem se destacado, como o *Ocimum basilicum*, que tem sido usado como planta condimentar e aromática e possui características medicinais e atividade contra patógenos de espécies vegetais (Leite et al., 2012).

Um estudo com compostos naturais para identificar antioxidantes como "moléculas capazes de reagir com radicais", Valgimigli, 2012 define os antioxidantes como o poder de redução para neutralizar o estresse oxidativo causado por radicais. Abordagem comprovada através de vários testes antioxidantes desenvolvidos com extratos naturais ou fitoquímicos isolados, como base na reação do potencial antioxidante com alguns radicais persistentes coloridos (por exemplo, DPPH ou ABTS) ou com algumas espécies não-radicaux oxidantes tais como íons Fe^{3+} (por exemplo, o Poder redutor) (Bakkali, et al., 2008; Adorjan,2010). Já para Amorati, et al. os antioxidantes são compostos capazes de abrandar ou retardar a oxidação de um material oxidável, independente da quantidade de material utilizada para tal reação protetora. O fato que o estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre a produção e eliminação de radicais livres, tem grande importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular (Gonçalves et al., 2015).

A oxidação é um processo natural dos organismos para a produção de energia. Por outro lado, uma produção descontrolada de radicais livres (RL) está

envolvida no aparecimento de muitas doenças. No sentido de amenizar as patologias geradas por meio de uma produção excessiva e descontrolada de radicais livres, tem-se observado uma busca crescente por novas fontes de antioxidantes obtidos a partir de produtos naturais (Duarte et al., 2014).

Os radicais livres são definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência. Essa configuração faz com que sejam altamente instáveis e quimicamente muito reativos, comportando-se como doadores ou aceptores de elétrons e sejam capazes de existência independente em intervalos de tempos variáveis (Gonçalves et al., 2015; Lobo et al., 2010). O efeito cumulativo dos radicais livres no organismo implica em doenças como câncer, aterosclerose, isquemia cerebral e envelhecimento. Antioxidantes que sequestram os radicais livres, previnem e apresenta alto potencial terapêutico contra as doenças citadas acima, o que tem gerado uma busca de novos potenciais antioxidantes derivados de plantas utilizadas na medicina popular (Lima et al., 2015).

O efeito protetor exercido por plantas medicinais tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, produtos secundários do metabolismo vegetal (ACHKAR et al., 2013; NOVAES et al., 2013). O metabolismo secundário atua no processo de defesa, para proteger as plantas em condições adversas influenciadas por uma série de fatores bióticos e abióticos (Afrin et al., 2015). Os metabolitos secundários possuem alta valorização na indústria de biopesticidas onde são utilizados para o tratamento mais seguro de doenças (Suroowan et al., 2017). Por exemplo, o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Sumit et al., 2015). Um grande número de plantas apresenta propriedades importantes de compostos antifúngicos, antimicrobianos e antioxidantes em seus óleos essenciais e extratos. Essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença a ser controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação dos produtos (Silva et al., 2010).

A espécie *Ocimum basilicum* L. var. *mininum* conhecida em todo o mundo devido às propriedades aromáticas e medicinais do seu óleo essencial é nativa da

Índia, e tem como seus principais constituintes o linalol e o eugenol com ação antioxidante. Segundo Onar et al. 2010, as plantas de manjeriço facilmente cultivado em casa, podem ser uma alternativa de repelentes porque constituem uma fonte potencial de produtos químicos bioativos e normalmente não têm efeitos nocivos. Seu óleo essencial incluindo amidas, ésteres e outros compostos polifuncionais são conhecidos por serem bons repelentes quando associados à outra cultura, além disso, a inalação dos vapores da infusão das folhas de manjeriço ou tomar um banho melhoram as condições da função respiratória, despertando interesse dos pesquisadores. Diante disso, no presente estudo o objetivo foi avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. var. *minimum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

A produção de mudas das espécies medicinais foi realizada em casa de vegetação na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, município de Cruz das Almas, BA. As mudas de manjeriço foram produzidas a partir de sementes, obtidas de empresa comercial, utilizando como substrato areia lavada, composto orgânico na proporção 2:1 e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Posteriormente as mudas ao atingirem aproximadamente 10 cm de altura foram transplantadas para uma escola municipal da zona rural no município de Santo Antônio de Jesus, Bahia. Realizou se adubação no plantio com esterco bovino na dose de 100 kg ha⁻¹. A espécie *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* foi cultivada em consórcio com as culturas de manjeriço, tomate e cenoura e sem estarem em consórcio, somente manjeriço. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com dois tratamentos (consorcio e solteiro) e quatro repetições para cada tratamento. A espécie foi coletada de acordo com o ciclo de cada cultura. Após a colheita, os componentes (folhas e caules) das plantas foram desidratados em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C por 72 horas, até alcançar massa constante, para posteriores análises.

Extração de Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido a partir das plantas secas, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger de vidro, utilizando-se 50 g de plantas homogeneizadas submetidas às 2h de destilação para cada amostra (Santos et al., 2014). As mesmas foram colocadas num balão de fundo redondo com uma capacidade de 5 L com 3 L de água destilada. Depois de recolher o óleo essencial, foi adicionado sulfato de sódio para retirar o excesso da água, o óleo foi armazenado em frasco de vidro e mantido em refrigeração até análise (Santos et al., 2014).

Preparo do Extrato Vegetal

O material vegetal (folhas e caules) foi obtido no Laboratório de Fitoquímica da UFRB em Cruz das Almas, a partir do resíduo da extração do óleo essencial. Após esse processo, foram secos em estufa com circulação de ar a 40°C até massa constante. Em seguida, pulverizado em moinho de facas, visando padronizar o tamanho de partículas do pó da planta, pesado e armazenado em sacos de papel identificados mantidos em temperatura ambiente. As folhas e os caules secos e triturados foram primeiramente submetidos à extração exaustiva por maceração a frio com Metanol em erlemeyer de 2 litros, durante 72 horas. A quantidade de solvente colocado sobre o material vegetal foi o suficiente para cobrir a amostra e, durante a maceração os recipientes ficaram armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período, realizou-se a filtragem e a concentração do extrato, que ocorreu sob pressão reduzida por meio da rotaevaporação em temperatura constante de 40°C, obtendo-se o extrato bruto Metanólico. O processo foi repetido por três vezes (Matos, 1997).

Atividade Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi determinada por três métodos químicos: o efeito bloqueador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)] e pelo método do Poder Redutor.

Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

Avaliação da capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi realizada de acordo com o método descrito por Hatano et al. (1988). Primeiramente preparou-se uma solução de DPPH a 0,0024% e separou-se 3mL de metanol para ser utilizado como branco (controle). Para o controle do DPPH foi adicionado à reação de 300 µL de metanol com 2,7 mL de DPPH. Na análise da atividade antioxidante das amostras, 2,7 mL de DPPH foram adicionados a 300 µL de cada concentração previamente preparada (1,25; 2,5; 5, 10 e 15 mg mL⁻¹) do óleo essencial e (0,31; 0,625; 1,25, 2,5 e 5 mg mL⁻¹) do extrato metanólico diluído em metanol. As análises foram realizadas em triplicata. As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível, modelo Genesys™, em comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos óleos essenciais em sequestrar o radical DPPH e a determinação quantitativa do método baseou-se na variação da absorvância obtida por uma perda da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presente na amostra de óleo ou do extrato. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em metanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução metanólica transparente. Para cada concentração ensaiada em triplicata foi calculada a média e o desvio padrão das absorvâncias medidas, utilizando o programa Excel 2010. Com a média das absorvâncias foi calculada a porcentagem de inibição do radical DPPH (que corresponde à quantidade de DPPH sequestrado) conforme a seguinte equação: % de efeito de eliminação= [(ADPPH-AS)/ADPPH] × 100, onde: As é a absorvância da solução com a amostra e ADPPH é a absorvância da solução de DPPH. Ainda com o auxílio do programa Excel foram traçados gráficos correlacionando-se a porcentagem de DPPH sequestrado e as concentrações testadas de cada óleo, com objetivo de calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE₅₀).

ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]

O método ABTS foi realizado como descrito por Sánchez et al. (2007), com base na capacidade de uma amostra para inibir o radical ABTS. O efeito de

eliminação ABTS foi calculado como a porcentagem de descoloração ABTS, utilizando a mesma fórmula utilizada para o método DPPH. As concentrações utilizadas foram (1,25; 2,5; 5, 10 e 15 mg mL⁻¹) do óleo essencial e (0,31; 0,625; 1,25, 2,5 e 5 mg mL⁻¹) do extrato metanólico.

Determinação do poder redutor

Na determinação do poder redutor será seguida a metodologia descrita por Berker et al., (2007). Assim, utilizou-se 1 mL das concentrações do extrato metanólico (0,31; 0,625; 1,25, 2,5 e 5 mg mL⁻¹) de cada amostra que foi colocada em tubo de ensaio, no qual também foi adicionado 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2M (pH= 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. Em seguida a mistura foi incubada a 50°C durante 20 minutos Após o arrefecimento foi adicionado 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% e os tubos foram agitados vigorosamente no aparelho Vortex. Em seguida foi retirado da solução 2,5 mL do sobrenadante e acrescentado 2,5 mL de água destilada, mais 0,5 mL de cloreto férrico a 1% e esperou-se 2 minutos para ler as absorvâncias espectrofotometricamente a 700nm. Durante a redução do Íon de Fe³⁺ para Fe²⁺ na presença de compostos antioxidante ocorre uma variação da coloração verde intenso para um amarelo claro.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F e aplicado o teste de Turkey (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

A atividade antioxidante utilizando o método de captura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil-DPPH, sendo os resultados obtidos expressos com valores CE₅₀ (mg mL⁻¹), refletindo a concentração à qual o composto proporcionou redução de 50%, para o óleo essencial de manjeriço foram 1,653 mg mL⁻¹ para

o cultivo consorciado e 1,356 mg mL⁻¹ para o solteiro. Na análise de variância para atividade antioxidante apresentou diferença significativa entre os tratamentos consórcio e solteiro ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey (Figura 1). Observa-se que o cultivo solteiro obteve uma média inferior ao consórcio, apresentando maior capacidade antioxidante.

Os valores médios da Concentração Eficaz, CE₅₀ (mg mL⁻¹) do método DPPH, obtidos utilizando o extrato metanólico de manjeriço podem ser observados na Figura 2. Percebe-se que o cultivo solteiro também obteve média inferior ao consórcio com valor de CE₅₀ de 0,518 mg mL⁻¹, apresentando uma capacidade antioxidante melhor, enquanto o cultivo consorciado obteve o valor de 1,418 mg mL⁻¹.

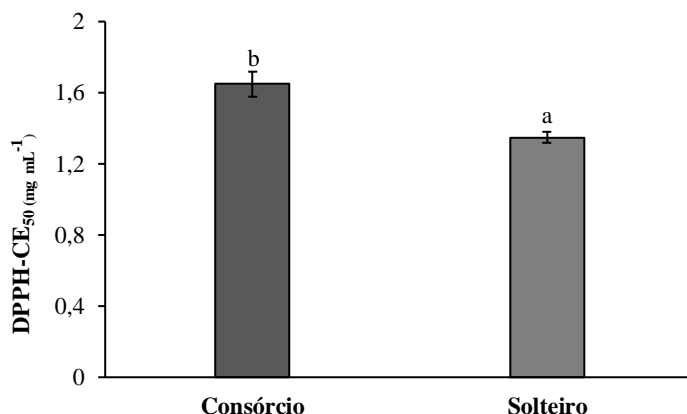


Figura 1: Valores médios do CE₅₀ (mg mL⁻¹) do método DPPH, obtidos do óleo essencial de manjeriço em função do consórcio. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

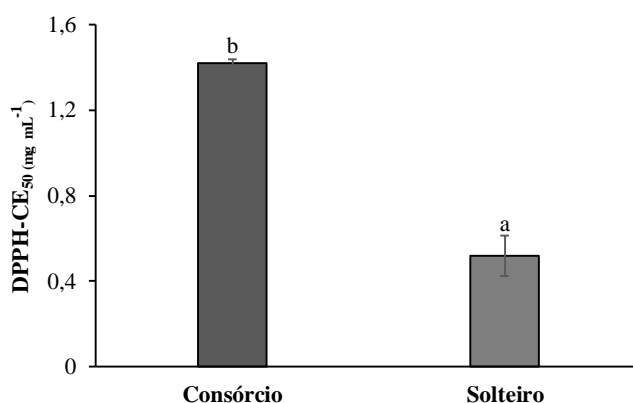


Figura 2: Valores médios do CE₅₀ (mg mL⁻¹) do método DPPH, obtidos do extrato metanólico de manjeriço em função do consórcio. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Em estudo realizado por Machado (2015), o autor observou resultados positivos da ação antioxidante do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L., no entanto, o cultivo consorciado obteve média inferior ao solteiro com valor de CE_{50} de $1,23 \text{ mg mL}^{-1}$, apresentando uma capacidade antioxidante aumentada, em relação ao cultivo solteiro obteve o valor de $1,55 \text{ mg mL}^{-1}$.

De acordo com os resultados obtidos por Pereira (2007), um estudo realizado com o extrato bruto e o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. foram avaliados quanto ao potencial antioxidante. O extrato bruto apresentou 96,39% de inibição da oxidação lipídica, e o óleo essencial, 92,44% de inibição. Apesar da pouca diferença entre as porcentagens, o extrato bruto apresentou valor maior, por ser obtido por extração exaustiva em Soxhlet. Após 72 horas, quando o controle já apresentava o ácido linoléico completamente oxidado, o óleo essencial e o extrato bruto de alfavaca ainda inibiam quase que inteiramente a oxidação.

A presença de muitos compostos ativos em espécies de *Ocimum* fornece proteção contra a indução de radicais livres danos oxidativos de componentes celulares. Bunarathep et al. relatou o comparativo da atividade antioxidante de óleos essenciais de quatro espécies de *Ocimum* (*O. basilicum*, *O. canum*, *O. gratissimum* e *O. sanctum*) pelo método DPPH e descobriu que *O. gratissimum* foi o mais antioxidante seguido do *O. sanctum*, *O. canum* e *O. basilicum* com valores de CE_{50} 30,20; 767,82; 8.343,19 e 47.057,45 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. Trevisan et al. avaliou a capacidade antioxidante dos óleos essenciais obtido por hidrodestilação à vapor de cinco espécies de o gênero *Ocimum*, entre eles, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum*, *O. gratissimum*, *O. micranthum* e *O. tenuiflorum* (syn. *O. sanctum*), utilizando ensaios por DPPH. Os resultados obtidos foram alta capacidade antioxidante evidente para todos os óleos, mas o melhor foi obtido pelo *O. tenuiflorum* (syn. *O. sanctum*) ($CE_{50} = 0,46 \mu\text{L} / \text{mL}$) em comparação com *O. basilicum* var. *purpurascens* ($CE_{50} = 1,84 \mu\text{L} / \text{mL}$).

ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e Determinação do poder redutor

Quando o óleo essencial de manjeriço foi submetido ao método ABTS, apresentou sua atividade antioxidante com valores CE_{50} (refletindo concentração à qual o composto proporcionou redução de 50%) de $1,35 \text{ mg mL}^{-1}$ para o cultivo

consorciado e de 0,999 para o cultivo solteiro, em concordância com os resultados anteriores pelo método de DPPH, onde o cultivo solteiro apresenta uma melhor atividade antioxidante que o cultivo consorciado (Figura 3).

Na Figura 4, o extrato metanólico de manjeriço quando submetido ao método ABTS, os valores de CE_{50} foram 0,416 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 0,800 para o cultivo solteiro. Nesse caso, observa-se que o consórcio obteve média inferior ao solteiro apresentando uma maior capacidade antioxidante.

O extrato metanólico de manjeriço foi submetido ao método do Poder Redutor, apresentando valores CE_{50} de 1,352 mg mL⁻¹ para o cultivo consorciado e 0,753 para o cultivo solteiro (Figura 5).

Para análise de variância para atividade antioxidante do óleo essencial e extrato pelo método ABTS, todos apresentaram diferença significativa entre os tratamentos consórcio e solteiro ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Uma pesquisa avaliando o potencial da atividade antioxidante de *O. americanum*, mostrou efetividade do extrato metanólico apresentando: $23,8 \pm 1,3$ $\mu\text{molTE} / \text{g}$ (para DPPH), $1,94 \pm 0,05$ $\mu\text{molTE} / \text{g}$ (para ABTS) e $47,9 \pm 0,7$ mol TE / g (para Poder redutor) (Dibala et al., 2016). Comparado com os resultados apresentados nesse estudo (Figuras 2, 4 e 5), o extrato metanólico de *Ocimum minimum* L. obteve um melhor potencial da atividade antioxidante.

Segundo Sarikurkcu et al. (2015), a capacidade antioxidante não pode ser totalmente descrita por um método único, as capacidades antioxidantes do óleo de *O. vulgare* foram testadas com vários métodos diferentes. Para a eliminação de radicais livres (DPPH e ABTS) e Poder redutor os resultados são expressos como trolox equivalentes (mg TEs / g de óleo), apresentando resultados para *O. vulgare* de 57.23mg TEs / g de óleo para DPPH e 176.41mg TEs / g de óleo para ABTS . Além disso, o óleo de *O. vulgare* não teve efeito sobre o radical DPPH. Essas diferenças nas capacidades de eliminação de radicais livres podem ser explicadas pelos principais componentes do óleo essencial. Nessa direção, o thymol e carvacrol são considerados como eliminadores efetivos de radicais livres. Resultados semelhantes demonstraram que o Origanum rico em thymol-carvacrol e outros óleos essenciais tiveram fortes atividades de eliminação pelo método DPPH e ABTS (Bisht et al., 2009; Hyun et al., 2014; Loizzo et al., 2009). O

poder de redução dos óleos essenciais pode servir como indicador significativo para verificar o potencial de atividade antioxidante.

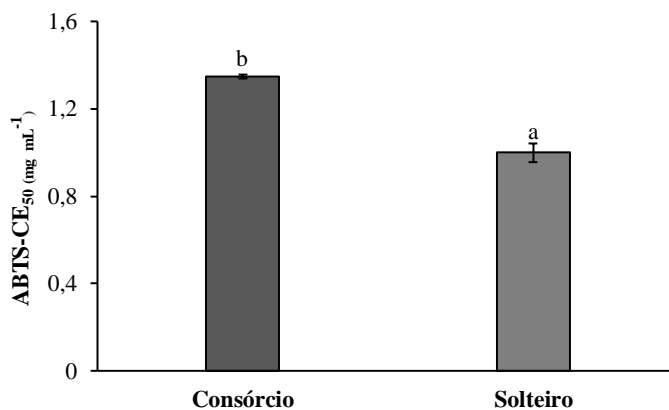


Figura 3: Valores médios do CE_{50} (mg mL^{-1}) do método ABTS, obtidos do óleo essencial de manjericão em função do consórcio. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

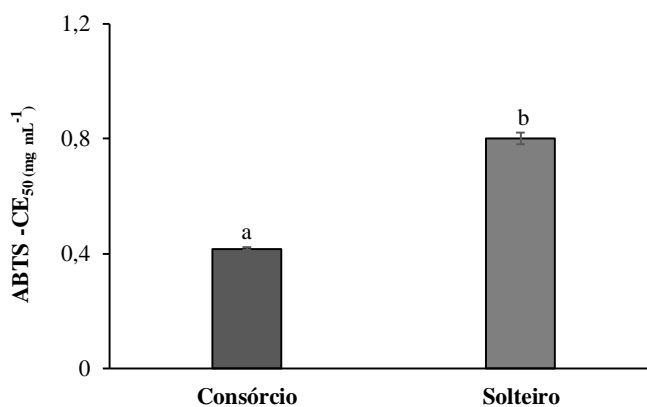


Figura 4: Valores médios do CE_{50} (mg mL^{-1}) do método ABTS, obtidos do extrato metanólico de manjericão em função do consórcio. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

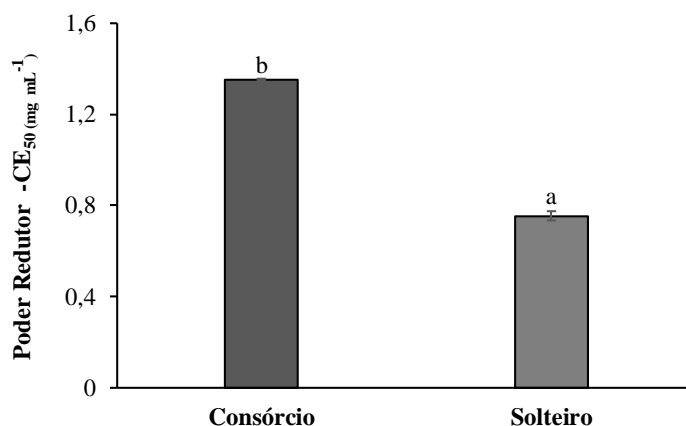


Figura 5: Valores médios do CE₅₀ (mg mL⁻¹) do método Determinação do Poder Redutor, obtidos do extrato metanólico de manjerição em função do consórcio. Barras com a mesma letra, não diferem significativamente, à 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Para entender o mecanismo da atividade antioxidante dos óleos essenciais, é necessário compreender a composição química dos mesmos. Apesar da grande diversidade química observada, os principais componentes dos óleos essenciais podem ser classificados em terpenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e fenilpropanoides (Amorati, et al., 2013). Segundo Machado, 2015, para os óleos de *O. basilicum* foram encontrados cerca de 77% de monoterpenos e 21% de sesquiterpenos. Para Botrel et al., (2010), os monoterpenos são os principais constituintes da família Lamiaceae.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os óleos essenciais de manjerição nas concentrações testadas apresentaram potencial antioxidante. Sendo as melhores concentrações para o cultivo solteiro. Os resultados para os extratos nas concentrações testadas tiveram variação entre os métodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398- 406, ago./dez. 2013.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour Fragrance J.** 2010, 25, 407–426.

AFRIN, S.; HUANG, J.; LUO, Z. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants. **Sci. Bull**, 60(12):1062–1072, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chem. Toxicol.** 2008.

BISHT, D., CHANOTIYA, C.S., RANA, M., SEMWAL, M. Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpene compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. **Ind. Crop. Prod.** 30, 422–426, 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V. Variações no teor e na composição volátil de *hyptismarruboides*. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química nova**, v.33, n.1, 33-37, 2010.

BUCHBAUER, G. Biological activities of essential oils. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press/Taylor & Francis Group, **Boca Raton**, pp.235–280, 2010.

DIBALA, C. I. et al. Chemical Composition, Antioxidant And Antibacterial Properties Of Extracts From *Ocimum Americanum* L. Against Multi-Resistant Food Bacteria. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Volume 5, Issue 12, 1549-1567, 2016.

DUARTE, A. F. S. et al. 2014. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl. (Rubiaceae).

GONÇALVES, J. H. T. et al. Atividade Antioxidante, Compostos Fenólicos Totais e Triagem Fitoquímica de Ervas Condimentares Desidratadas. **Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde**, 486-497, 2015.

HYUN, T.K., KIM, H.C., KIM, J.S. Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. **Ind. Crop Prod.** 52, 611–616, 2014.

LIMA NETO, G.A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, 69-1077, 2015.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LOIZZO, M.R., MENICHINI, F., CONFORTI, F., TUNDIS, R., BONESI, M., SAAB, A.M., STATTI, G.A., DE CINDIO, B., HOUGHTON, P.J., MENICHINI, F., FREGA, N.G. Chemical analysis antioxidant anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. **Food Chem.** 117, 174–180, 2009.

MACHADO, E. S. Avaliação Do Consórcio De Manjeriçã *Ocimum Basilicum* L. E ALFACE *Lactuca Sativa* L. Submetidos À adubaçã Orgânica. Dissertaçã. **Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**. 2015.

NOVAES, G. M. et al. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 535- 539, ago./dez. 2013.

ONAR, H.C.; HASDEMIR, B.; YUSUFOGLU, A. Chemical Composition and Repellent Activity of the Essential Oil of *Ocimum minimum* L. on *Drosophila* Species. *Asian Journal of Chemistry* Vol. 22, No. 2 (2010), 1131-1135. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 607-614.

RIAHI,

L.,ELFERCHICHI,M.,GHAZGHAZI,H.,JEBALI,J.,ZIADI,S.,AOUADHI,C.,CHOGRANI,H., ZAOUALI, Y.,ZOGHLAMI,N., MLIKI,A. Phytochemistry,antioxidantand antimicrobial activitiesoftheessentialoilsof *Mentha rotundifolia* L. inTunisia. **Industrial CropsandProducts**, 49,883–889, 2013.

SARIKURKCU, C. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**, 70, 178–184, 2015.

SAMANIEGO SÁNCHEZ C., TRONCOSO GONZÁLEZ AM, GARCÍA-PARRILLA MC, QUESADA GRANADOS JJ, LÓPEZ GARCÍA DE LA SERRANA H, LÓPEZ MARTÍNEZ MC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Anal Chim Acta**. 2007 Jun 12;593(1):103-7. Epub 2007 Apr 24.

SILVA, C.J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, n.1, p.104-108, 2010.

SUROOWAN, S.; JAVEED, F.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; NOOR, M.J.; KAYANI, S.; JAVED, A.; MAHOMOODALLY, M.F. Ethnoveterinary health management

practices using medicinal plants in South Asia – a review. **Vet Res Commun**, 41:147–168, 2017.

TOMAZONI, E. Z. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2, p. 1-5, nov., 2013.

VALGIMIGLI, L. Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. In *Essential Oils as Natural Food Additives*; Valgimigli, L., Ed.; **Nova Science Publishers**: New York, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado indica o potencial da planta medicinal *Ocimum basilicum* L. var. *mininum* estudada no controle do fungo fitopatogênico *A. niger* causador da doença Podridão Vermelha no sisal e na indução de alguns mecanismos de defesa das plantas. O controle de doenças de plantas, baseados na utilização de óleos essenciais e/ou na atividade biológica definida, com baixa ou nenhuma toxidez, teria grande utilidade prática. A pesquisa comprova que são válidas as iniciativas de estudos com cultivos consorciados de manjeriço com agroecossistemas, pois podem aumentar a diversidade de produtos (antimicrobiano e antioxidante) do agricultor, e ainda a melhoria do seu sistema de produção.