

19. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Extracto de propóleos y *Plectranthus amboinicus* en el tratamiento de semillas de cebolla para control de *Aspergillus* sp.

Lívero Carvalho, Beatriz; Possas de Souza, Emanuele; Varini Santos dos Anjos, Louyne; Gomes Nakada Freitas, Pâmela; Ismael Inácio Cardoso, Antonio; Silveira Amador, Talita
beatrizlivero@outlook.com; maanu.pss@gmail.com; louyne_gav@hotmail.com;
pamelanakada@dracena.unesp.br; ismaeldh@fca.unesp.br; talitamador@hotmail.com

Facultad de Ciencias Agrarias y Tecnológicas

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Resumen

Con gran preocupación por la salud y la necesidad de la preservación del medio ambiente, la búsqueda por fuentes alternativas de control de enfermedades viene creciendo en la agricultura. Las recientes investigaciones muestran la variedad de productos naturales que poseen eficiencia para el control de patógenos en su composición. El objetivo fue evaluar el efecto de extracto de propóleos y *Plecthanthus amboinicus* (menta-pimienta) en el tratamiento de semillas de cebolla inoculadas con *Aspergillus* sp. Las semillas utilizadas de cebolla fueron inoculadas con el hongo *Aspergillus* sp., y los tratamientos fueron soluciones de propóleos y *P. amboinicus* en las siguientes concentraciones: 0; 5; 15 y 25%, con agitación de cinco minutos. El experimento fue montado en factorial 2 x 4 en delineamiento enteramente casualizado con cinco repeticiones. Para las soluciones de *P. amboinicus* hubo la preparación de medios de cultivo con BDA (papa-dextrosa-agar) e insertados discos de 5 mm del hongo, para que hubiera la verificación del efecto *in vitro* en el desarrollo del patógeno. Las características evaluadas fueron: diámetro del halo de crecimiento del hongo (prueba *in vitro*); test de sanidad; primer conteo de germinación; germinación; masa seca de plántula; tamaño de raíz primaria y parte aérea de plántula, y análisis de emergencia. Los extractos de menta-pimienta y de propóleos no fueron eficientes en el control del hongo *Aspergillus* sp. También el extracto de menta-pimienta puede haber provocado fitotoxicidad, desencadenando menores valores para la mayoría de las características de calidad fisiológica de estas semillas, en comparación con el extracto de propóleos.

Palabras clave: *Allium cepa*, extracto vegetal, menta-pimienta

Introducción

Con el uso indiscriminado de los agrotóxicos, la sociedad ha cobrado más para que el uso de esos productos sea cada vez más restringido (BRASIL, 2003). Así, muchos estudios han buscado formas alternativas para disminuir el uso y mantener en seguro tanto la salud humana como el medio ambiente. En la mayoría de los casos, se ha estudiado el efecto de los extractos (DIAS et al., 2000, AMARAL et al., 2002), exudados vegetales (ROCHA; CAMPOS, 2004) y aceites esenciales (PANDEY et al.), y como alternativa al control, que son productos que en muchos estudios ya mostraron eficiencia en el control de patógenos.

Los productos naturales son útiles en el manejo de diversas enfermedades, principalmente en la agricultura orgánica, pues representan una alternativa que además de servir de control, protege la labranza del ataque de microorganismos (BRASIL, 2003; SALGADO et al., 2003). Esto ocurre debido a que tienen principios activos que producen compuestos tóxicos a los patógenos (SALGADO; CAMPOS, 2003).

Con el abundante uso de antimicrobianos producidos a partir de hongos y bacterias, hubo selección de patógenos resistentes a éstos. Por eso, el fitoterápico es utilizado como alternativas en los tratamientos contra diferentes patógenos, porque sus

compuestos han demostrado eficiencia en el control de diversos microorganismos. Este hecho posiblemente es por la interacción de innumerables moléculas que existen en los extractos (CARVALHO et al., 2014).

Los extractos vegetales y aceites esenciales son focos de diversos estudios para que haya reducción en el uso de fungicidas sintéticos y que poseen resultados positivos en el control de patógenos. Las investigaciones recién realizadas con extractos y aceites esenciales han demostrado potencial de las plantas medicinales en control de patógenos, pues poseen acción antifúngica que inhibe el crecimiento y germinación de esporas (BORGES et al., 2013).

Estudios realizados por Portilho et al. (2013), demostraron que extractos de propóleos poseen potencial antibacteriano, anti-inflamatorio y antifúngico, además de las propiedades farmacoterapéuticas, pues el propóleo es ampliamente utilizado como alternativa para sustitución a los antibióticos.

El hongo *Aspergillus* sp., es conocido por atacar semillas y causar graves pérdidas, daño, lesiones muerte de plantas y semillas, entre diversos otros. La preocupación del ataque de hongos se debe no sólo a las manifestaciones al inicio del cultivo, pero también en plantas ya adultas, por lo que el tratamiento

eficiente de semillas es de gran importancia en la agricultura (CARVALHO et al., 2012).

Y, por cuenta de los diversos estudios con resultados positivos utilizando extractos vegetales de plantas medicinales, el presente estudio tiene relevancia para el tratamiento alternativo de semillas, sin agredir el medio ambiente.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue verificar el efecto en el control y en la calidad fisiológica de semillas de cebolla inoculadas con *Aspergillus* sp. y tratadas con *Plectranthus amboinicus* y extracto de propóleos, además de verificar el efecto de *P. amboinicus* en el control de *Aspergillus* sp. *in vitro*.

Materiales y Métodos

El experimento fue desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Estadual Paulista / Facultad de Ciencias Agrarias y Tecnológicas del Campus de Dracena-SP, en período de agosto a noviembre de 2017.

La especie estudiada fue semillas de *Allium cepa* (cebolla), cv Bella Vista, exentas de cualquier tratamiento. Las semillas fueron inoculadas con *Aspergillus* sp. en medio BDA (papa-dextrosa-agar) junto con restritor hídrico manitol en la concentración de 33 g L⁻¹ para obtención de -0,8 MPa de potencial hídrico (MACHADO et al 2001). Este

procedimiento se utiliza para evitar la germinación de semillas en la prueba de sanidad. Después del desarrollo completo del hongo en este medio, las semillas permanecieron en una capa (Figura 1), por período de 9 horas (ANJOS et al., 2017) para que podrían ser infectadas, siguiendo de secado natural a temperatura ambiente (25°C) por 72 horas.

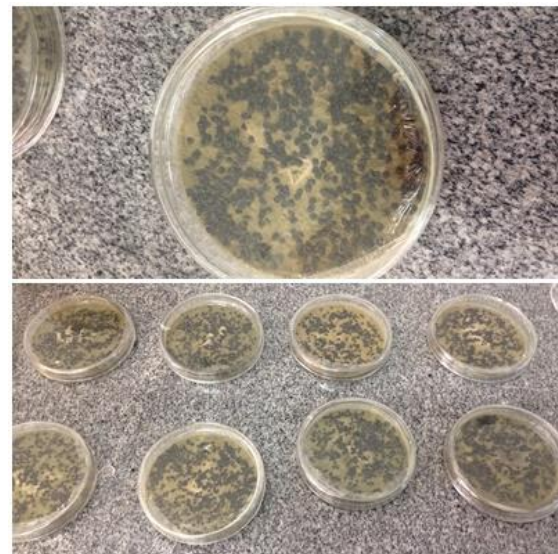


Figura 1. Semillas de cebollas inoculadas con *Aspergillus* sp.

Foto: Archivo personal, 2017.

El experimento fue desarrollado en esquema factorial 2 x 4 (2 extractos y 4 concentraciones). Los tratamientos consistieron en dos extractos (propóleos y *P. amboinicus*) en cuatro concentraciones (0, 5, 15 y 25%) y las semillas fueron tratadas con agitación de 220 rpm durante 5 minutos. El extracto de propóleo fue obtenido listo y para realizar el tratamiento se utilizó 30 ml, siendo este agua + extracto de propóleo. Ya para la menta-pimienta, el extracto fue preparado. Las

plantas fueron cosechadas a las 11 horas, en la huerta de la universidad. Las hojas fueron trituradas en 500 ml de agua en licuadora, y después fue filtrada. Después del tratamiento, se retiró el exceso de las soluciones en las semillas a 25 ° C con ayuda de criba, y colocadas sobre papel toalla para secar por 72 horas. El delineamiento fue enteramente casualizado con cinco repeticiones. Después del secado, se aplicaron las pruebas para evaluación de la calidad fisiológica y sanitaria.

Las características evaluadas fueron: primer conteo de germinación (%), que evalúa el porcentaje de plántulas normales después de 6 días; germinación (%), que se realiza junto con el primer conteo y que evalúa el porcentaje de plántulas normales después de 12 días (BRASIL, 2009a); masa seca de plántula: se recogieron todas plántulas normales de la prueba de germinación y colocadas en cámara de flujo de aire (40 ° C) para secar y posteriormente evaluar la masa (mg); tamaño de la parte aérea y de raíz primaria, se muestrearon al azar de 10 plántulas normales de la prueba de germinación, expresada en centímetros; sanidad (%): de acuerdo con la normativa vigente en la que se utilizó el método del papel filtro en placas de Petri, siendo estas humedecidas con agua y 10% de 2,4-D para que no hubiera germinación de las semillas (BRASIL, 2009b), permaneciendo en cámara por siete días,

con temperatura de 25°C y bajo régimen alternado de luz y oscuridad por 12 horas, contabilizado la porcentaje de *Aspergillus* sp. en microscopio estereoscópico (BRASIL, 2009b); análisis de emergencia: fue sembrado en bandejas de polietileno de 162 agujero utilizando sustrato para mudas. La cuenta fue hecha después de 12 días de la siembra y contabilizó el porcentaje de plántulas normales. Las bandejas se mantuvieron en invernadero. Se prepararon concentraciones de *P. amboinicus* con medios de cultivo BDA, utilizandose 95 ml de BDA + 5 ml de la concentración. Después de solidificado, fue puesto disco de 5 mm de *Aspergillus* sp. en el centro de la placa de Petri para verificar el efecto *in vitro* del desarrollo del patógeno, que fue evaluado por el diámetro del halo y expresado en centímetros.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza, los extractos fueron comparados por el test t y para las concentraciones se ajustó análisis de regresión a 5% de probabilidad.

Resultados y Discusión

Con el montaje de las pruebas fisiológicas y sanitarias en semillas de cebolla inoculadas y tratadas en concentraciones de extracto de propóleos y menta-pimienta, realizaron las evaluaciones y los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Hubo diferencia significativa para la fuente de variación "Extracto" en

las características de germinación, tamaño de raíz primaria y parte aérea, emergencia y porcentaje de *Aspergillus* sp. (Tabla 1).

Tabla 1. Medias de las concentraciones del estudio para germinación, tamaño de raíz primaria (TR) y parte aérea (TPA), emergencia y porcentaje de *Aspergillus* sp. en semillas de cebolla inoculadas con *Aspergillus* sp. y tratadas con extracto de menta-pimienta y propóleos. Dracena-SP, 2017.

Extracto	Germinación (%)	TR (cm)	TPA (cm)	Emergencia (%)	<i>Aspergillus</i> sp. (%)
Menta-pimienta	60 b ¹	0,35 b	1,17 b	50 a	98 a
propóleos	80 a	1,42 a	3,58 a	45 b	96 b
CV (%) ²	17,2	28,2	26,9	12,9	3,3

¹Medias en misma columna no difiere por el test t al nivel de 5% de probabilidad.

²CV (%): coeficiente de variación.

Observase en la Tabla 1 que el extracto de propóleos se destacó para las características de germinación (80%), tamaño de raíz primaria (1,42 cm) y tamaño de parte aérea de plántula (3,58 cm), cuando comparado al extracto de menta-pimienta, lo cuál afectó el vigor de las semillas de cebolla.

Cuanto la emergencia y el porcentaje de *Aspergillus* sp. en semillas de cebolla inoculadas y tratadas con los extractos (Tabla 1), ocurrió el inverso. Hubo destaque para la menta-pimienta en relación al extracto de propóleos. Se observó 50 y 45% en la prueba de

emergencia, y 98 contra 96% de *Aspergillus* sp. para el extracto de menta-pimienta y propóleos, respectivamente. Es importante destacar que la diferencia fue sólo cinco puntos porcentuales, por lo que es poco relevante para la prueba de emergencia.

En la prueba de sanidad, los resultados mostraron que ni uno de los dos extractos lograron controlar el hongo *Aspergillus* sp. porque obtuvieron resultados cercanos al 100%, y baja diferencia entre sí (dos puntos porcentuales, 98 contra 96%).

Según Oliveira et al. (2006), la menta-pimienta presenta propiedades en su composición que poseen actividades antimicrobianas y esas propiedades están directamente relacionadas a los compuestos timol y carvacol, que varían de acuerdo con el extracto utilizado. En algunos casos se encontró 70% en el total de estos compuestos, así como en otro, que se detectó sólo 28%.

En el trabajo realizado por Pinheiro et al. (2015), la menta poseen concentración de 0,12% tuvo mayor eficiencia que la utilización de algunos herbicidas. En este estudio, los autores compararon la utilización de herbicidas sintéticos y

alternativos para que mostrase que algunos casos, el tratamiento alternativo también son efectivos.

A pesar de estas características, la eficiencia del extracto de menta-pimienta depende principalmente de las concentraciones de los compuestos que presentan (AGUIAR, 2004).

Souza et al., (2017) demostraron la eficiencia lineal de actuación del extracto de propóleos en el control del hongo *Penicillium* sp. Una vez que se aumentaba las concentraciones, limitándose al 20%, hubo total inhibición del crecimiento micelial del hongo, en la prueba realizada *in vitro*. Aunque el presente trabajo no presentó el mismo resultado de Souza et al. (2017) en cuanto a la prueba de sanidad, en las pruebas de germinación y vigor (Tabla 1), se observó que el extracto de propóleos no afectó la calidad fisiológica de las semillas de cebolla.

En este estudio, realizándose la prueba *in vitro* inoculándose el *Aspergillus* sp. en medio BDA junto con las concentraciones de menta-pimienta, y no hubo diferencia significativa, observándose 72 mm de media general de las concentraciones del diámetro del halo de desarrollo del hongo, significando que este extracto no proporcionó efecto antimicrobiano, contradiciendo la afirmación de Oliveira et al. al. (2006).

En cuanto a los resultados inferiores observados en semillas tratadas con extracto de menta, una posible explicación

es el hecho de que puede haber ocurrido una posible fitotoxidez (Tabla 1).

Los resultados de masa seca por plántula (Tabla 2), ocurrió efecto significativo de la interacción de los extractos con las concentraciones. En la concentración 0%, no hubo diferencia estadística, lo que ya se esperaba, pues en los dos tratamientos, esa concentración se utilizó sólo agua para tratar las semillas. Hubo superioridad de los resultados para extracto propóleos en la concentración de 5 y 15% con valores de 72 y 50 mg, respectivamente. En la mayor concentración (25%), ocurrió lo opuesto, observado mayor valor para el extracto de propóleos (68 mg) en relación a menta-pimienta (40 mg). Este resultado refuerza la discusión de la Tabla 1, pues demuestra que en la mayor concentración el extracto de menta-pimienta perjudicó las características fisiológicas de la semilla de cebolla (germinación, tamaño de raíz primaria y parte aérea).

Tabla 2. Masa seca de plántulas de cebolla inoculadas con *Aspergillus* sp. y tratadas con concentraciones de extracto de menta-pimienta y propóleos. Dracena-SP, 2017.

Extracto (%)	materia seca (mg)	
	menta-pimienta	propóleo
0	39 a ¹	54 a
5	72 a	46 b
15	50 a	24 b
25	40 b	68 a
CV (%) ²	29,7	

¹Medias seguidas por la misma letra en la línea no difieren entre sí por el test t al nivel de 5% de probabilidad.

² CV (%): coeficiente de variación.

Se observó una diferencia significativa para el primer conteo de germinación y para el porcentaje de *Aspergillus* sp. en función de la fuente de variación concentración de extracto, ajustándose regresión lineal para ambas características. En el caso de las semillas de cebolla, observóse en primer conteo de germinación diferencia sólo de cinco puntos porcentuales, partiendo de 20 a 15% (referentes a la concentración 0 y 25%), es decir, aumentando la concentración del extracto, afectó maiormente el vigor de las semillas de cebolla (Figura 3).

En la prueba de sanidad, se partió de la menor a la mayor concentración, de 99 a 92% de contaminación con *Aspergillus* sp (Figura 3). Aunque se ha producido una diferencia significativa, se observa que los extractos no proporcionaron control eficaz contra el *Aspergillus* sp.

Insertar figuras en el espacio que crea conveniente.

Conclusiones

Los extractos de menta-pimienta y de propóleos no fueron eficientes en el control del hongo *Aspergillus* sp., mediante las concentraciones de estudio.

El extracto de menta-pimienta utilizado en el tratamiento de semillas de cebolla

puede haber provocado fitotoxicidad, desencadenando menores valores para la mayoría de las características de calidad fisiológica de semillas, en comparación con el extracto de propóleos.

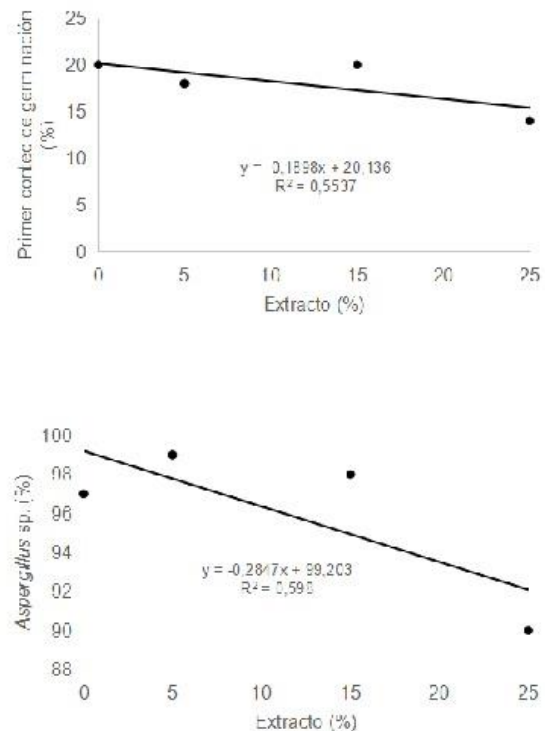


Figura 3. Media de los extractos de menta-pimienta y extracto de propóleos para el primer conteo de germinación y porcentaje de *Aspergillus* sp. en semillas tratadas de cebolla inoculadas con *Aspergillus* sp. Dracena-SP, 2017.

Bibliografía

Amaral, D.R., Oliveir, A.D.F., Campos, V.P., Carvalho, D.A. (2002). Efeito de extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne*

- exigua* do café. *Nematologia Brasileira*, 26(1), 43-48.
- Borges, D.I., Alves, E., Moraes, M.B., Oliveira, D.F. (2013). Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação deurediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 15(3), 325-331.
- Brasil. Constituição Federal. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. (*Lei dos Orgânicos*) 2003.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 200p.
- Carvalho, H. P., Souza, P. E., Abreu, M. S., Guimarães, R. M., Carvalho, M. L. M., Reis, R. G. E. (2012). Efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente etiológico da mancha manteigosa, na germinação e viabilidade de sementes de cafeeiro, 34(2), 264-271.
- Dias, C.R., Schwan, A.V., Ezequiel, D.P., Sarmiento, M.C., Ferraz, S. (2000). Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira*, 24,(2), 203-210.
- Machado, J. C., Oliveira, J.A., Vieira, M. G. G. C., Alves, M. C. (2001). Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. *Revista Brasileira de Sementes*, 23, 95-101.
- Oliveira, R. A. G., Lima, E. O., Souza, E. L., Vieira, W. L., Freire, K. R. L., Trajano, V. N., Lima, I. O., Silva-Filho, R. N. 2007. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 17: 186-190.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H. N., Kumar S. (2000). Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *Journal of Phitopathology*, 148(7-8), 501-502.
- Pinheiro, P. F.; Queiroz, V. T.; Rondelli, V. M.; Costa, A. V.; Marcelino, T. P.; Pratisoli, D. (2013). Chemical characterization and toxicity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciência e Agrotecnologia.*, 37, 138-144.
- Rocha, F. S., Campos, V. P. (2004) Effect of exudates of plant cell culture on second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, 29(3), 294-299.
- Salgado, S. M. L.; Campos, V. P. (2003). Ecloração e mortalidade *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. *Fitopatologia Brasileira*, 28(2), 166-170.

Salgado, S. M. L.; Campos, V. P. Eclosão
e mortalidade de juvenis de segundo
estádio de *Meloidogyne exigua* em
óleos essenciais. *Nematologia
Brasileira*, 27(1), 17- 22, 2003.