

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Campus de Botucatu - Rubião Junior**

**COMPOSIÇÃO DE ÓLEO VOLÁTIL DE MANJERICÃO (*Ocimum  
basilicum* L. - Lamiaceae) EM PLANTAS SADIAS E INFECTADAS POR  
VÍRUS**

**ALICE NAGAI**

**BOTUCATU**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Campus de Botucatu - Rubião Junior**

**COMPOSIÇÃO DE ÓLEO VOLÁTIL DE MANJERICÃO (*Ocimum  
basilicum* L. - Lamiaceae) EM PLANTAS SADIAS E INFECTADAS POR  
VÍRUS**

**ALICE NAGAI**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos e supervisão da Profa Dra Carmen Sílvia Fernandes Boaro

**BOTUCATU**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Nagai, Alice.

Composição de óleo volátil de manjeriço (*Ocimum basilicum* L. em plantas sadias e infectadas por vírus / Alice Nagai. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

1. Manjeriço 2. Plantas medicinais 3. Botânica

Palavras-chave: *Ocimum basilicum* L.; Óleo volátil; Manjeriço

Dedico esse trabalho a minha família, que sempre esteve ao meu lado apoiando minhas decisões e comemorando cada etapa realizada com êxito.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado o presente da vida e ter me capacitado a executar as atividades com sabedoria.

Agradeço à professora doutora Déborah Yara Alves Cursino dos Santos, por ter me orientado com dedicação e atenção.

À Lígia Maria Lembo Duarte, do Instituto Biológico, pelos ensinamentos e pela atenção.

Aos colegas de laboratório, pelos auxílios e conversas durante a realização dos experimentos.

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

## RESUMO

*Ocimum basilicum* L., popularmente conhecido como manjeriço, é uma planta pertencente à Lamiaceae, cujo óleo volátil possui diversas atividades biológicas, tais como antifúngica, anti-giardíase, antioxidante, antibacteriana, antileishmaniose, inseticida, dentre outras. É constituído principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. A composição de metabólitos secundários nas plantas, dos quais os óleos voláteis fazem parte, pode sofrer influência de diversos fatores. Neste trabalho, foi investigada a influência das doenças virais no perfil dos óleos voláteis do manjeriço. Para isso, sementes de *Ocimum basilicum* L. cv. Genovese foram semeadas e mantidas em casa de vegetação. Ao atingirem tamanho adequado (dois pares de folhas acima das cotiledonares), foram inoculadas com vírus não identificado, isolado de manjeriço, além do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Tobacco mosaic virus* (TMV). O óleo volátil de plantas sadias e infectadas foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e analisado em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas revelaram a presença de metileugenol e  $\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico como principais componentes, sendo que a porcentagem de metileugenol diminuiu significativamente nas plantas infectadas com o vírus não identificado. Houve mudanças na composição do óleo volátil, sendo alguns componentes encontrados apenas nas plantas sadias e outros somente nas infectadas.

**Palavras-chaves:** óleo volátil, *Ocimum basilicum* L., manjeriço.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
OBJETIVOS.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. PREPARO DAS PLANTAS .....	15
2.1.1. Sementes.....	15
2.2. INOCULAÇÃO DO VÍRUS .....	16
2.2.2. Transmissão por afídeos .....	16
2.3. IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS .....	17
2.3.2. Testes sorológicos .....	17
2.4. EXTRAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL.....	18
2.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4. CONCLUSÕES.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
ANEXO .....	30



## 1. INTRODUÇÃO

Dentro de Lamiales, encontra-se Lamiaceae que é formada por ervas ou arbustos, sendo as árvores encontradas com menor frequência. Seus representantes são comumente aromáticos, apresentando muitas espécies economicamente importantes, tanto pelo uso de seus óleos voláteis quanto pelo uso como condimentos (Souza & Lorenzi, 2005; Judd *et al.*, 2008). Essa família possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies, dos quais 26 gêneros e 350 espécies estão presentes no Brasil.

*Ocimum basilicum* L., pertencente à Lamiaceae e originária da Ásia (Oriente Médio) e do norte da África, é conhecida popularmente como alfavaca, alfavaca-doce, manjericão, manjericão-doce, manjericão-de-flor-branca, manjericão-de-folha-larga, manjericão-dos-cozinheiros, manjericão-de-molho, manjericão-grande, remédio-de-vaqueiro e erva-real (Balmé, F., 1982; Castro & Chemale, 1995). Como várias outras espécies da família, *O. basilicum* L. é bastante cultivada no Brasil (Souza & Lorenzi, 2005) e, dentre as espécies desse gênero, possui maior destaque por sua importância econômica, sendo cultivada em todo o mundo (Marotti *et al.*, 1996). Essa espécie é usada como matéria-prima para a indústria de fármacos e óleos, além de ser empregada também na culinária (Reis *et al.*, 2007), conferindo aos molhos e às sopas um particular e agradável sabor. É também empregada em infusões e decocções para curar e prevenir diversas afecções, tais como inflamação da garganta, vertigens, espasmos, resfriados e vômitos (Balmé, 1982). Além disso, o óleo volátil, cujo alto valor econômico é atribuído à presença de fenilpropanoides, como eugenol, chavicol e seus derivados, e de terpenoides, como linalol, limoneno e metil cinamato (Sifola & Barbieri, 2006), pode ter atividade anti-giardíase (Almeida *et al.*, 2007), antileishmaniose (Zheljazkov *et al.*, 2008), antifúngica (Hussain *et al.*, 2008), antibacteriana (Opalchenova & Obreshkova, 2003; Hussain *et al.*, 2008), anti-oxidante (Lee *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2008), tripanocida (Santoro *et al.*, 2007), inseticida (Kéita *et al.*, 2001), dentre outras.

O cultivo do manjericão para obtenção de seu principal metabólito secundário, o óleo volátil, é uma alternativa promissora para pequenos fazendeiros no Brasil, visto que o preço para o tipo mais valioso desse óleo pode alcançar até US\$ 110,00/Kg (May *et al.*, 2008). Em 1993, a produção mundial do óleo foi de 43 toneladas, equivalendo a 2,8 milhões de dólares (Lawrence, 1993).

Morfologicamente, é uma planta herbácea, medindo de 0,50 a 0,80 metros, perene, ramosa, semi-ereta, com ramos eretos, quadrangulares, verde-claros e aromáticos. Quando esses ramos são novos, apresentam-se pilosos e quando maduros, são mais celulósicos. Suas folhas são simples, opostas, pecioladas, ovais ou oval-lanceoladas com bordos lisos ou dentados, verde-claros nas duas faces, tenras e muito aromáticas. Nas folhas, mesmo nas mais jovens, encontram-se estruturas especializadas denominadas tricomas glandulares, onde há a síntese e o armazenamento dos óleos voláteis. Essas estruturas encontram-se tanto na face abaxial quanto na adaxial e podem ser de dois tipos, peltado ou capitado. Os tricomas capitados possuem uma célula formando a base, outra que forma uma haste e uma cabeça constituída por uma célula alongada ou oval ou duas células amplas, enquanto que os peltados diferem pela constituição da cabeça do tricoma ser de quatro amplas células (Castro & Chemale, 1995; Werker *et al.*, 1993). Possui flores pequenas, zigomorfas e diclamídeas. O cálice é profundamente bilabiado com um lábio superior largo e arredondado e quatro inferiores estreitos e agudos. A corola possui coloração branca ou levemente rosada, também bilabiada com o lábio superior tetralobulado. Possui quatro estames, sendo didínamos e filetes com apêndices. O gineceu é tetrapartido, com um estilete ginobásico longo, flexuoso e bifurcado. Possui inflorescência em espigas terminais longas e o florescimento ocorre durante quase todo o ano, exceto no inverno. Seus frutos são constituídos de núculas lisas, escuras e compridas e as sementes, de núculas ou frutículos (Castro & Chemale, 1995).

Sabe-se que o metabolismo secundário das plantas pode ser alterado por fatores bióticos e abióticos, incluindo a exposição de uma planta a patologias e, em termos de produção agrícola, é possível que elas possam causar danos consideráveis no rendimento de plantas medicinais (Bruni *et al.*, 2005).

Dentre as patologias supracitadas, não se pode deixar de considerar a possível influência de doenças virais no metabolismo secundário das plantas hospedeiras, pois elas podem afetar a fragrância e as propriedades funcionais e farmacológicas, ocasionando perda na qualidade do óleo volátil (Bruni *et al.*, 2006).

Sabe-se que a atividade biológica e o valor comercial de um óleo volátil são estritamente correlacionados com sua composição química e abundância relativa de seus componentes. Assim, um controle rotineiro para verificar o estado de sanidade de plantas que produzem esse metabólito secundário deve ser considerado (Bruni *et al.*, 2007).

Fatores que agravam o gerenciamento de doenças do manjeriço são sua localização

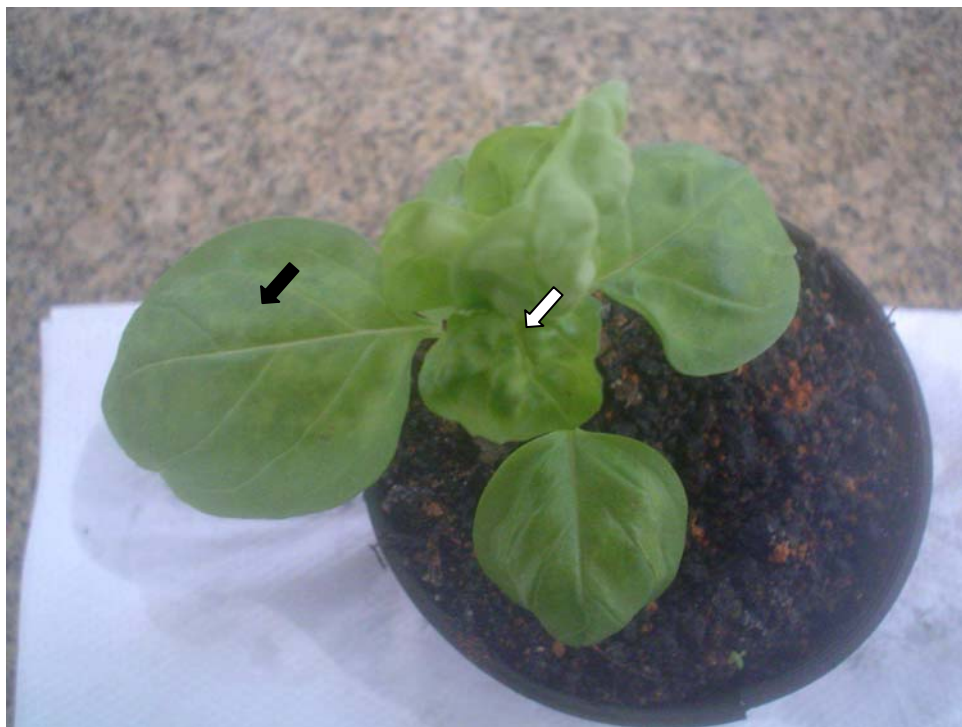
tropical e seu hábito de vida perene. O clima dos trópicos fornece condições favoráveis para o desenvolvimento de diversas doenças e a perenidade da planta possibilita a presença de tecidos susceptíveis por longo período (Ploetz, 2007). Além disso, sua propagação é feita por estacas, eliminando-se a espiga de flores e a maioria das folhas. Elas são enraizadas a meia-sombra, em solo arenoso e úmido (Castro & Chemale, 1995). Nesse tipo de propagação as infecções virais são frequentes, podendo causar significativos problemas econômicos em razão da redução da aceitabilidade do consumidor e do valor de mercado (Mollov & Hayslett, 2007). Assim como ocorre com outros produtos de consumo agrícolas, as doenças funcionam como um significativo obstáculo, afetando tanto o rendimento, quanto a qualidade de uma forma geral do manjeriço (Garibaldi *et al.*, 1997). Os sintomas das infecções virais são bastante visíveis nas folhas, afetando diretamente o valor do produto e a renda do produtor (Sanz *et al.*, 2001)

Atualmente, define-se vírus como uma ou um conjunto de moléculas de ácido nucleico, normalmente envolvida(s) por uma ou mais capas protetoras de proteína ou lipoproteína, que é(são) capaz(es) de mediar sua própria replicação somente no interior de uma célula hospedeira, sendo dependente da maquinaria de síntese proteica dessa célula (Matthews, 1992).

Os vírus estão no segundo lugar entre os patógenos de plantas que acarretam maior prejuízo, perdendo apenas para os fungos. Nos países em desenvolvimento, que dependem de uma ou mais colheitas, medidas que controlem as doenças virais são inadequadas e as colheitas são afetadas mais seriamente. As infecções virais geralmente reduzem a qualidade e a quantidade de produtos agrícolas ou hortícolas (Matthews, 1992), sendo que seus sintomas podem afetar as folhas (clareamento das nervuras foliares, mosaico, necrose, clorose, pontos amarelos ou marrons, listras entre as nervuras, enrolamento, má formação, dentre outras) (Figuras 1 e 2), podem reduzir o crescimento da planta ou não induzir a floração, sendo que esses sintomas podem se intensificar se a planta estiver infectada com mais de um vírus (Hudaib *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Plantas cultivadas de manjericão. A. Manjericão infectado com vírus apresentando sintomas nas folhas (seta); B. Manjericão sadio.



**Figura 2.** Planta de manjericão infectada por vírus. Detalhe das folhas apresentando sintomas de bolhosidade (seta branca) e mosaico (seta preta).

Há diferentes tipos de transmissão de vírus em plantas. Os principais são:

**1. Passagem direta com a planta viva:** Esse tipo de transmissão pode ocorrer através da semente ou por pólen infectado, por propagação vegetativa ou por enxertia.

Provavelmente, muitos dos vírus transmitidos por sementes também o são por pólen de plantas infectadas. Embora a transmissão por sementes seja um meio bastante efetivo de introduzir o vírus na colheita nos estágios iniciais, apenas um quinto dos vírus conhecidos é transmitido dessa maneira (Matthews, 1992).

A propagação vegetativa, assim como a enxertia, são modos muito eficientes de perpetuação e disseminação dos vírus, pois, uma vez infectada de forma sistêmica, qualquer parte vegetativa utilizada nesse tipo de propagação estará infectada também (Matthews, 1992).

**2. Por outros organismos:** Invertebrados, fungos e a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* podem ser responsáveis pela transmissão de vírus de plantas, sendo que o principal método de disseminação de muitos vírus no campo, causando severos prejuízos econômicos, é a transmissão por invertebrados. Ela possui considerável interesse biológico, uma vez que se tem demonstrado que alguns vírus são capazes de multiplicação no interior dos vetores (Matthews, 1992). Dentre os 22 filos de invertebrados, apenas 3 possuem muitos indivíduos que se alimentam de plantas – Arthropoda, Nematoda e Crustacea. Dentro de Arthropoda, a classe Insecta possui 9 ordens com membros fitófagos e possíveis vetores de vírus. São elas: Collembola, Orthoptera, Dermaptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Thysanoptera e Hemiptera, sendo que a subordem Homoptera merece destaque pelo grande número de espécies vetores de vírus. A classe Arachnida possui apenas uma ordem, Acari, que possui famílias com vetores de vírus (Hull, 2002).

**3. Transmissão mecânica:** Esse método possui grande importância, uma vez que a virologia experimental de plantas utiliza esse tipo de transmissão para experimentos a respeito de vírus e estudos de eventos iniciais na interação entre um vírus e as células suscetíveis à infecção (Matthews, 1992).

Em muitas circunstâncias, apenas a fricção na superfície foliar com objeto contendo o inóculo é necessária para garantir transmissão viral eficiente. Entretanto, a inoculação é muito mais eficiente quando material abrasivo como carborundum é adicionado ao inóculo ou espalhado sobre as folhas antes da inoculação, pois aumentam as lesões locais foliares que facilitam a entrada do vírus (Matthews, 1992).

Um inóculo eficiente para alguns vírus e hospedeiros pode ser obtido triturando-se o material foliar em almofariz com o auxílio de pistilo e congelando-o. Quando esse material não processado é utilizado como inóculo, os componentes do hospedeiro como polifenóis e polissacarídeos podem atuar como inibidores na infecção. Caso existam inibidores no inóculo, uma maneira eficiente de melhorar a eficiência da inoculação é lavar as folhas com água imediatamente após esse processo (Matthews, 1992).

Quando a inoculação é eficiente, os vírus podem ficar confinados na folha inoculada e sua replicação pode permanecer indetectada ou podem se mover sistematicamente pela planta, através da passagem lenta de uma célula a outra por meio de plasmodesmos ou do movimento rápido pelos tecidos vasculares, usualmente o floema (Matthews, 1992).

A defesa contra vírus e outros microrganismos patogênicos pode ser feita por metabólitos secundários, que são compostos orgânicos que não parecem ter função direta no crescimento e desenvolvimento de vegetais, defendendo-os contra vários herbívoros. Além disso, apresentam outras funções importantes como suporte estrutural (lignina) ou pigmentos (antocianinas) (Taiz & Zeiger, 2004). Podem ser divididos em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, sendo que esse último não está envolvido com a produção de óleos voláteis (Taiz & Zeiger, 2004).

Os óleos voláteis são uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis e acredita-se que sejam sintetizados por todos os órgãos da planta nas células de tricomas glandulares e armazenados em espaço extracelular formado pela cutícula e pela parede celular, em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou nos próprios tricomas glandulares (Taiz & Zeiger, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). Em *Ocimum basilicum* L. há a presença de fenilpropanoides na composição de seu óleo volátil (Sifola & Barbieri, 2006).

Na natureza, exercem papel importante na proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, insetos e contra herbívoros, pois reduzem sua palatabilidade, além de poder atrair outros insetos a fim de favorecer a dispersão do pólen e das sementes (Bakkali *et al.*, 2008). São utilizados pelo homem como matéria-prima para a indústria de perfumes e condimentar (Machale *et al.*, 1997) e, apesar de necessitarem de mais avaliações clínicas para possíveis aplicações como adjuvantes dos medicamentos atuais, há diversos estudos a respeito do potencial terapêutico dos óleos voláteis e dos seus constituintes aromáticos voláteis para prevenir e tratar doenças (Edris, 2007), pois eles possuem a grande vantagem de serem desprovidos de riscos genotóxicos a longo prazo (Bakkali *et al.*, 2008).

Eles podem ser extraídos utilizando-se diversas técnicas, tais como hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor, extração utilizando solvente, sob pressão ou com fluido supercrítico (Edris, 2007). O tipo de extração é escolhido de acordo com o propósito do uso do óleo, uma vez que seu perfil químico difere não apenas no número de moléculas, mas também no tipo estereoquímico das moléculas extraídas (Bakkali *et al.*, 2008).

Tanto fatores bióticos quanto abióticos alteram a produção dessas substâncias, ocasionando em perdas no rendimento de plantas medicinais (Bruni *et al.*, 2005).

No caso do manjericão, foi observada variação na composição do óleo volátil de acordo com a velocidade do ar e a temperatura de secagem dessa planta, sendo que, para obtenção de maior teor de óleo com maior concentração de linalol, a temperatura de secagem deve ser de 54,4°C e a velocidade do ar correspondente a 1,9 m/s (Soares *et al.*, 2007). Conjuntamente, a época do ano e o horário da colheita também interferem no teor do óleo, mas não em sua composição. Silva *et al.* (2003) demonstraram que o teor de óleo obtido de plantas coletadas em janeiro foi maior que as coletadas em agosto. Essa diferença pode ter ocorrido devido às plantas colhidas no mês de janeiro apresentarem maior quantidade de partes jovens na porção terminal, onde poderia ocorrer maior síntese de óleo volátil. Ainda, as plantas coletadas em janeiro no período da manhã, às 8 horas, apresentaram maior quantidade de óleo do que as coletadas às 16 horas. Em contrapartida, outro estudo revelou maior quantidade de óleo volátil de manjericão durante o inverno, sugerindo que as altas temperaturas no verão podem ocasionar evaporação parcial de alguns dos constituintes do óleo (Hussain *et al.*, 2008). Foi observada também diminuição significativa do conteúdo total do óleo volátil das folhas frescas de manjericão quando expostas a alto sombreamento (Chang *et al.*, 2008). Outro fator que causa variação no óleo volátil é o armazenamento da planta em embalagens de PVC a 10°C após ter sido coletada, ocorrendo decréscimo no conteúdo do óleo volátil e aumento nos conteúdos de eugenol e linalol (Silva *et al.*, 2005).

Dentre os fatores bióticos, as doenças virais influenciam, possivelmente, a produção de metabólitos secundários, afetando a qualidade dessas substâncias (Bruni *et al.*, 2006). Em *Salvia sclarea*, a presença do *Broad bean wilt virus* (BBWV), um *Fabavirus*, reduziu o rendimento do óleo volátil, além de alterar qualitativamente sua composição (Hudaib *et al.*, 2001). Em *Agastache anethiodora* foi relatada variação considerada na qualidade da composição do óleo volátil devido à presença do *Cucumber mosaic virus* (CMV), além de perda de 88% no rendimento do óleo (Bruni *et al.*, 2007).

## OBJETIVOS

Devido à utilização do manjericão nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, a comparação do rendimento e da composição do óleo volátil de *Ocimum basilicum* L. de indivíduos sadios e infectados por vírus pode fornecer informações que possibilitem o melhor aproveitamento econômico dessa planta e de seus produtos.

O presente trabalho visa estudar a composição do óleo volátil de *Ocimum basilicum* L. em duas condições, a saber, plantas infectadas por vírus e sadias.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nas dependências de dois laboratórios em colaboração. O cultivo, os ensaios para produção das plantas infectadas e sadias, além dos procedimentos de identificação do vírus foram realizados no Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, sob orientação da Dra Lígia Maria Lembo Duarte. A extração e análises dos óleos voláteis foram feitas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP.

### 2.1. PREPARO DAS PLANTAS

#### 2.1.1. Sementes

As sementes de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) variedade Genovese foram semeadas em bandejas com terra esterilizada e deixadas em casa de vegetação com irrigação por duas vezes ao dia até que as plantas estivessem com o tamanho adequado para o transplante para vasos, ou seja, com pelo menos duas folhas primárias.



## **2.2. INOCULAÇÃO DO VÍRUS**

### **2.2.1. Transmissão mecânica**

Os inóculos foram preparados a partir de folhas de manjeriço, naturalmente infectadas, obtidas no comércio, trituradas em almofariz em presença de solução tampão de fosfato a 0,01M e sulfito de sódio a 0,5%, pH 7,0, para evitar a liberação de substâncias que poderiam levar à oxidação do extrato e dificultar a transmissão. O extrato obtido (inóculo) foi, em seguida, friccionado no segundo par de folhas acima das cotiledonares de plantas saudas de manjeriço e de espécies indicadoras de Amaranthaceae, Chenopodiaceae e Solanaceae, previamente polvilhadas com o abrasivo carborundum 400 mesh. Também foram inoculados o *Cucumber mosaic virus* (CMV), isolado de pimentão e *Tobacco mosaic virus* (TMV), isolado de petúnia, pertencentes aos gêneros *Cucumovirus* e *Tobamovirus*, respectivamente. Após as inoculações, as folhas foram lavadas em água corrente. Folhas de plantas saudas de cada espécie foram friccionadas somente com a solução tampão utilizada antes do preparo do inóculo (controle). As hospedeiras e as plantas de manjeriço foram mantidas em casas de vegetação até o aparecimento dos sintomas induzidos, cerca de 15 dias.

### **2.2.2. Transmissão por afídeos**

Os afídeos (*Myzus persicae*) foram coletados cuidadosamente com pincel umedecido com água e deixados em jejum por 30 minutos em placa de Petri devidamente isolada, coberta com filme plástico. Após esse período, os indivíduos foram colocados para se alimentar por 10 minutos em placa de Petri contendo folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) naturalmente infectadas com vírus. Então, foram transportados 5 indivíduos para cada bloco de plantas indicadoras de Amaranthaceae, Chenopodiaceae e Solanaceae e para plantas de manjeriço saudas, permanecendo por 10 minutos, sendo posteriormente retirados e as plantas armazenadas em cubículos com irrigação diária.

## **2.3. IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS**

Para a determinação da identidade do vírus foram realizados testes de transmissão mecânica (ver 2.2.1) e sorológicos, além de observações ao microscópio eletrônico de transmissão.

### **2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão – contrastação negativa**

Alíquotas dos extratos com suspeita da presença de vírus foram mantidas sobre telas de cobre, recobertas com filme “Formvar” por 5 min. Em seguida, as telas foram lavadas com água destilada, contrastadas negativamente com acetato de uranila 2% (Milne,1984) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico.

### **2.3.2. Testes sorológicos**

A relação sorológica e o diagnóstico dos vírus em estudo foram determinados por meio de ensaios imunoenzimáticos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA-indireto e/ou DAS-ELISA), de acordo com método empregado por Koenig (1981) e Almeida (2001), com algumas modificações.

Alíquotas de 50 µL de extrato, preparadas a partir de folhas das plantas natural ou experimentalmente infectadas (1/10 em tampão carbonato - TC) foram aplicadas nos poços da placa de poliestireno (2 h/ 37°C). A placa foi lavada por três vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M, pH 7,2 acrescido de “Tween” 20 a 0,5% (PBST) para, em seguida, receber o antissoro contra o CMV e TMV, diluído em PBST + polivinilpirrolidona a 2 % (PBSTPo). Após incubação, lavagem e secagem foram adicionados 50µL de anti-imunoglobulina de coelho conjugada à enzima fosfatase alcalina, diluída em PBSTPo. A reação foi visualizada aplicando-se 50µL do substrato da enzima *p*-nitrofenil fosfato, dissolvido a 1mg/mL em tampão substrato. A intensidade da reação foi determinada por meio da leitura de absorbância a 405 nm em leitor de ELISA. A reação será considerada positiva se a leitura de absorbância

de amostra de planta infectada for, pelo menos, 3 vezes maior que a leitura de amostra de planta sadia (controle negativo). Para cada tratamento foram efetuadas triplicatas.

#### **2.4. EXTRAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL**

O óleo volátil foi extraído da parte aérea de cinco plantas sadias e de cinco infectadas com vírus ainda não identificado, transmitido a partir de planta de manjeriço proveniente do comércio, todas com 42 dias, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 3 horas e armazenado a 4°C em frascos especiais para posterior injeção no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.

#### **2.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS**

As amostras foram analisadas em aparelho de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (Agilent CG/EM 6890/5975B) empregando uma coluna DB – 5 HT (30 m x 0,320 mm i.d. x 0,10 µM de filme). A temperatura inicial do forno foi de 45°C, aumentando 6°C/min. até atingir 200°C. Ao atingir essa temperatura, o forno foi aquecido 15°C/min. até 250°C, permanecendo por 1 minuto. A temperatura do injetor foi de 300°C. O gás carreador utilizado foi o hélio com fluxo de 1.3 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL com razão de split de 50. A temperatura da fonte foi de 230°C, do quadrupolo de 150°C e a voltagem da eletromultiplicadora (EM) de 70 eV.

Os componentes foram identificados comparando-se os espectros de massas correspondentes aos picos dos cromatogramas com espectros de substâncias conhecidas, no banco de dados da biblioteca NIST 05 MS.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A transmissão mecânica, a partir do inóculo contendo folhas de manjeriço naturalmente infectadas por vírus não identificado, CMV (*Cucumber mosaic virus*) ou TMV (*Tobacco mosaic virus*), não permitiu a visualização dos sintomas virais nas plantas indicadoras.

O vírus isolado de manjeriço, ainda não identificado, não induziu sintomas em plantas sadias, quando inoculado mecanicamente. A não visualização de sintomas pode ser atribuída a diversos fatores como estágio de desenvolvimento e nutricional da hospedeira, temperatura, fotoperíodo, concentração do inóculo, entre outros (Hull, 2002). Pode também estar relacionada com a variedade de manjeriço utilizada (Genovese) que é melhorada geneticamente e, embora não tenha informação disponível sobre a resistência de variedades desta Lamiaceae, é possível que seja resistente à transmissão viral. Além disso, o vírus pode não ter sido transmitido por inoculação mecânica a partir de manjeriço devido à presença de substâncias inibidoras de infecção viral liberadas no extrato (inóculo).

Na transmissão por afídeos, os sintomas de infecção viral foram evidentes (Figuras 1 e 2) e esses sintomas desempenham papel importante nos ensaios biológicos, uma vez que podem possibilitar o diagnóstico viral (Matthews, 1992). Convém destacar que os afídeos são eficientes vetores das espécies de vírus dos gêneros *Caulimovirus*, *Fabavirus*, *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Alfavirus*, *Macluravirus*, *Closterovirus*, *Sequivirus*, *Trichovirus*, *Waikavirus*, *Enamovirus*, *Luteovirus*, *Macluravirus*, *Nanavirus*, *Umbravirus*, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*. (Harris *et al.*, 2001).

A partir de observações ao microscópio eletrônico de transmissão, não foi possível visualizar partículas virais de amostras foliares do manjeriço infectado (material original) e de espécies inoculadas em preparações contrastadas negativamente. A impossibilidade de visualização de partículas virais, provavelmente ocorreu pela baixa concentração em que os vírus podem se encontrar na planta (Hull, 2002).

Visando avaliar a composição do óleo volátil de planta infectada por CMV e TMV, isolados destes vírus foram inoculados mecanicamente em plantas sadias de manjeriço e, após cerca de 20 dias, as plantas foram submetidas a testes sorológicos com antissoros contra estes vírus para a detecção.

Na tabela 1, encontram-se as absorvâncias obtidas do teste de ELISA. Os valores de absorvância encontrados para as plantas inoculadas com extrato foliar preparado a partir de manjeriço naturalmente infectados (M4) e para as plantas inoculadas com CMV foram de 0,08, valor considerado muito próximo ao controle negativo ((C-)MSa), indicando que o CMV não foi transmitido mecanicamente para plantas de manjeriço sadias. O resultado também foi negativo para o manjeriço inoculado com o material naturalmente infectado

(M4) mesmo que as plantas apresentassem sintomas de infecção viral, o que sugere que o vírus presente em M4, responsável pela infecção na natureza, não é o *Cucumber mosaic virus*.

Quanto ao teste sorológico com antissoro contra o TMV, foi inconclusivo, visto que houve reação inespecífica com amostra de planta sadia. De acordo com Almeida & Lima (2001), podem ter ocorrido três problemas com o extrato utilizado: i) contém determinantes antigênicos detectados pelo conjugado, ii) o antígeno (Ag) está em alta concentração, causando ligação não específica com o conjugado, iii) o Ag está em baixa concentração, não havendo cobertura eficiente da planta, deixando espaços que serão preenchidos pelo conjugado.

**Tabela 1. Resultado do ELISA-indireto realizado com antissoro contra o *Cucumber mosaic virus***

	M4	MI4	MCMV	(C -) MSa	C +
Absorbância (405 nm)	0,4	0,08	0,08	zero	1,4

M4 = manjerição naturalmente infectado; MI4 = manjerição inoculado com M4; MCMV = manjerição inoculado com CMV; (C-)MSa = controle negativo- manjerição sadio; C+ = controle positivo

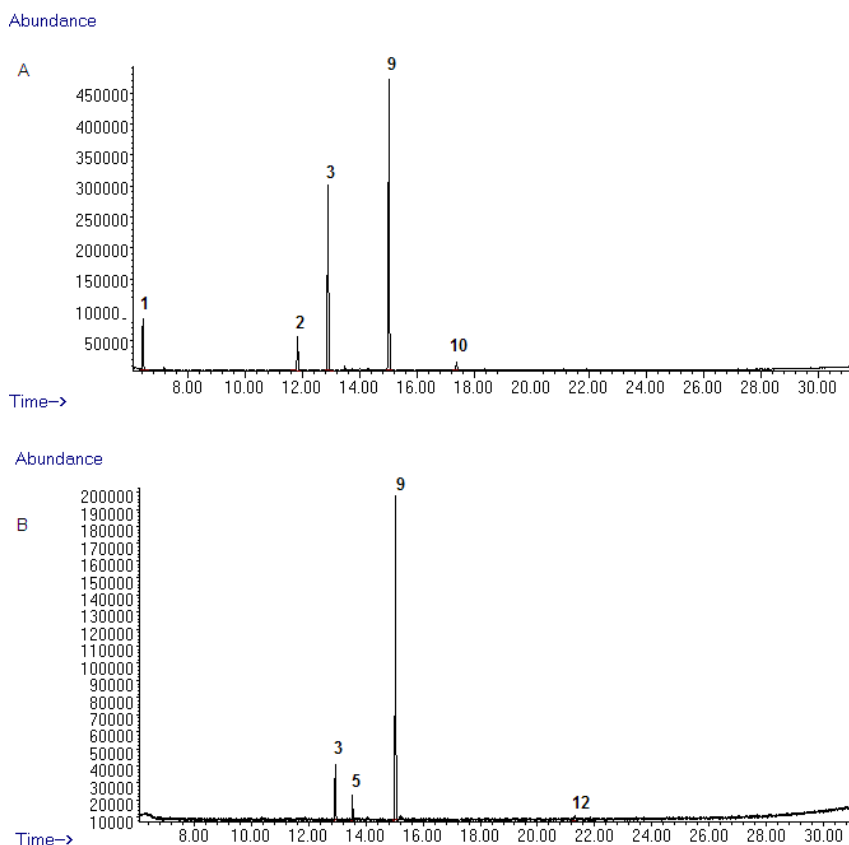
Os constituintes do óleo volátil de plantas sadias e infectadas encontram-se na tabela 2. A análise em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas mostrou que há dois principais componentes do óleo, tanto em plantas sadias quanto em plantas infectadas, enquanto que outros componentes foram encontrados apenas em algumas amostras.

Os cromatogramas apresentados na figura 3 apresentam a composição do óleo volátil da planta sadia 1, que é representativa das amostras sadias, e da infectada 2, representativa das amostras infectadas. Nos cromatogramas, os picos 3 e 9 (metileugenol e  $\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico, respectivamente) correspondem aos principais componentes em termos de quantidade. Na figura 4, encontram-se os espectros de massas dessas duas substâncias comparadas com substâncias referência presentes no banco de dados da biblioteca NIST 05 MS.

**Tabela 2.** Porcentagem dos constituintes do óleo volátil da parte aérea de indivíduos de *Ocimum basilicum* L. determinados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

	T.R (min)	Componentes (%)																		
		Sadia 1	Sadia 2	Sadia 3	Sadia 4	Sadia 5	Infecta da 1	Infecta da 2	Infecta da 3	Infecta da 4	Infecta da 5									
1. Linalol	6,445	9,786																		
2. Eugenol	11,844	5,943	1,154	7,091	4,95	2,036														
3. Metileugenol	12,920	35,615	43,233	31,752	30,623	48,106	13,14	14,045	13,029	31,108	24,256									
4. <i>Trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	13,505		4,381	1,945	6,11	4,471														
5. Bergamoteno	13,538						12,223	6,108												
6. 3 - careno	13,736		1,817		1,516															
7. $\beta$ - ocimeno	13,774											3,847								
8. $\beta$ -farneseno	14,029		1,966		2,391							5,403								
9. $\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico	15,033	46,91	43,021	55,301	49,475	44,455	57,559	77,6	65,825	49,578	65,056									
10. $\delta$ -cadineno	17,400	1,747			1,689															
11. (Z,E) - $\alpha$ -farneseno	21,555		3,478																	
12. N.I.*				3,912	3,245		6,846	2,247	20,796	5,535	9,739									

\* N.I. – Não identificado (corresponde à soma dos componentes não identificados de uma amostra).



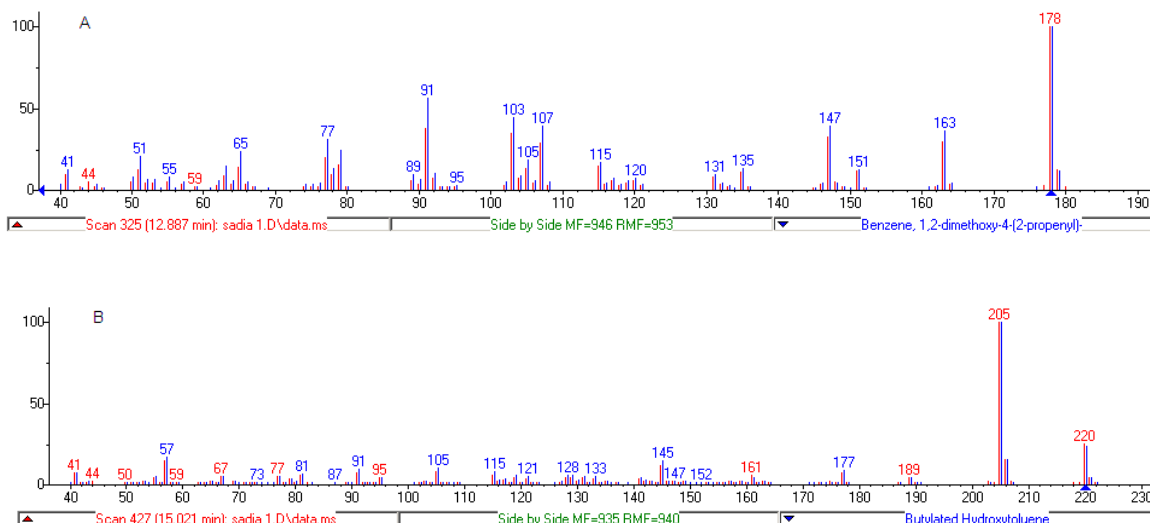
**Figura 3.** Cromatogramas das plantas sadia 1 (A) e infectada 2 (B).

As porcentagens dos componentes majoritários, metileugenol e  $\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico estão representadas na figura 5. Aplicando-se o teste t-Student a 5% de significância (Anexo 1), verificou-se que a quantidade média de metileugenol nas plantas sadias foi significativamente maior que nas plantas infectadas. Apesar de parecer que houve aumento na quantidade média de  $\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico nas plantas infectadas, a diferença entre elas e as plantas sadias não foi significativa.

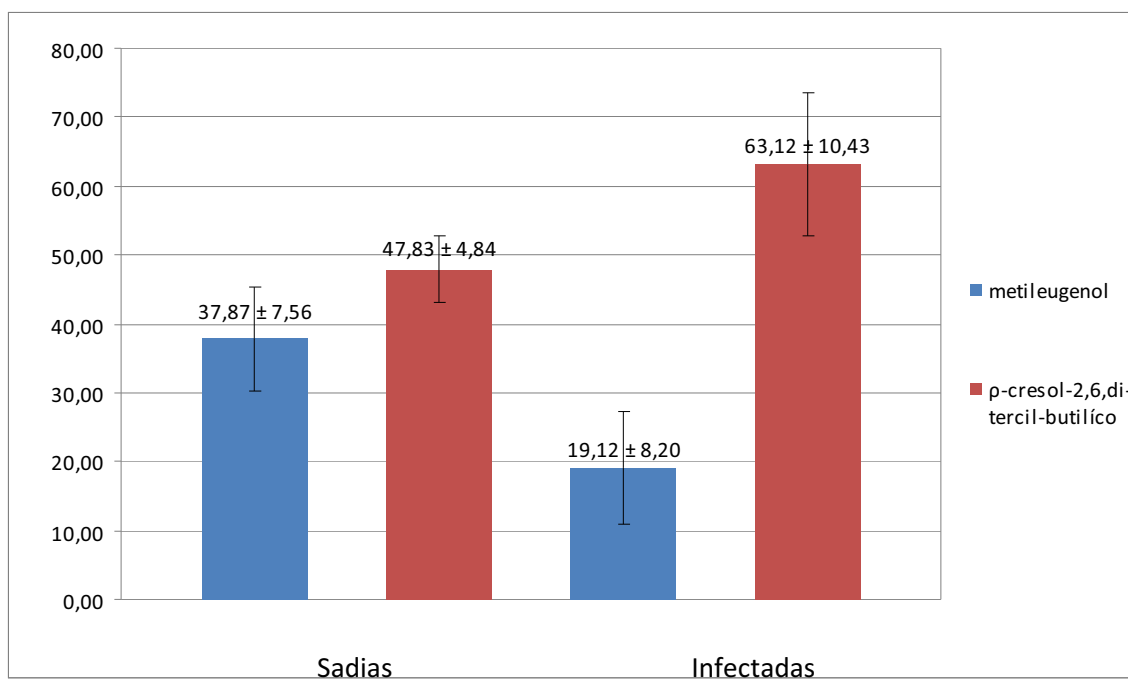
Os fenilpropanoides, classe de compostos que compreende o metileugenol, são possivelmente sintetizados e armazenados apenas nos tricomas peltados (Gang *et al.*, 2001). Então, a presença de vírus pode estar ligada a falhas na transcrição gênica relacionada à produção dessas estruturas ou mesmo na síntese das enzimas envolvidas na biossíntese dessa classe de compostos, como a fenilalanina amônia-liase (PAL).

Alguns componentes como o linalol e o eugenol foram encontrados apenas nas plantas sadias, enquanto outros como o bergamoteno somente nas infectadas. Essa variação na composição do óleo volátil após infecção viral também foi observada por Hudaib *et al.*

(2001). Além disso, maior porcentagem de compostos não identificados foi encontrada nas plantas infectadas.



**Figura 4.** Espectros de massas do metileugenol (A) e do *p*-cresol,2,6– di– tercil– butílico (B). Em vermelho, fragmentos de massas correspondentes da análise do óleo volátil da planta de manjeriço e em azul, fragmentos correspondentes ao componente presente no banco de dados da biblioteca NIST 05 MS.



**Figura 5.** Porcentagem média dos principais componentes presentes no óleo volátil de plantas de manjeriço sadias e infectadas.



## **4. CONCLUSÕES**

Os testes utilizados para identificação do vírus presente em manjeriço proveniente do mercado (M4) não foram conclusivos.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a infecção causada pelo vírus presente em M4 alterou a composição do óleo volátil das plantas de manjeriço, diminuindo significativamente, a 5% de significância, a produção de metileugenol nas plantas infectadas por vírus. Além disso, alguns componentes foram observados apenas em plantas sadias ou somente nas infectadas. Houve, também, maior porcentagem de substâncias não identificadas nas plantas infectadas pelo vírus.

Não foi possível avaliar a composição do óleo volátil em plantas de manjeriço inoculadas com CMV e TMV, visto que os vírus não foram transmitidos mecanicamente para plantas sadias de manjeriço da variedade Genovese.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.R. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitopatologia. In: ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. (Eds.) EMBRAPA Soja, Londrina, 186 p., 2001.

ALMEIDA, I.; ALVIANO, D. S.; VIEIRA, D. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; ROSA, M. S. S. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology research**. v.101, n.02, p.443-452, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – a review. **Food and chemical toxicology**. v.46, n.02, p.446-475, 2008.

BALMÉ, F. **Plantas medicinais**. 5ª ed. São Paulo: Ed. Hemus, 1982. 389p.

BRUNI, R.; PELLATI, F.; BELLARDI, M.G.; BENVENUTI, S.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; BIANCHI, A. Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infections. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n.04, p. 964-968, 2005.

BRUNI, R.; BELLARDI, M. G.; PARRELLA, G.; BIANCHI, A. Impact of alfalfa mosaic virus subgroup I and II isolates on terpene secondary metabolism of *Lavandula vera* D.C., *Lavandula x alardii* and eight cultivars of *L. hybrida* Rev. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.68, n.4-6, p.189-197, 2006.

BRUNI, R.; BIANCHI, A.; BELLARDI, M. G.; Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by **Cucumber mosaic virus (CMV)**. **Flavour and fragrance journal**. v.22, n.01, p.66-70, 2007.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas** – descrição e cultivo. Guaíba- agropecuária. 1995. 196p.

CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and experimental botany**. v.63, n.01-03, p.216-223, 2008.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy research**. v.21, n.04, p.308-326, 2007.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Virus taxonomy: **classification and nomenclature of viruses: eighth report on the international committee on the taxonomy viruses**. 2nd ed. Academic Press, 2005, 1259p.

GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K.N.; SIMON, J. E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant physiology**. v.125, n.02, p.539-555, 2001.

GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L.; MINUTO, G. Diseases of basil and their management. **Plant disease**. v.81 n.02, p.124-132, 1997.

HARRIS, K.F., ONEY, P. S. DUFFUS, J. E. **Virus-Insect-Plant Interactions**. London –UK, Academic Press, 2001. 376p.

HUDAIB, M.; BELLARDI, M. G.; RUBIES-AUTONELL, C.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-1. **Il Farmaco**. v. 56, n. 03, p. 219-227, 2001.

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2002. 1001p.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oil depends on seasonal variations. **Food chemistry**. v.108, n.03, p.986-995, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J.; **Plant systematics** – a phylogenetic approach. 3<sup>o</sup> ed. Sunderland – Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2008, 611p.

KÉITA, S. M.; VINCENT, C.; SCHMIT, J.P.; ARNASON, J. T.; BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of **Ocimum basilicum** L. and **O. gratissimum** L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control **Callosobruchus maculatus** (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. **Journal of stored products research**. v.37, n.04, p.339-349, 2001.

KOENIG, R. Indirect ELISA methods for the brad specificity detection of plant viruses. **Journal General Virology**, v.55, p.53-62, 1981.

LAWRENCE, B. M. A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries. In: JANICK J., SIMON (Ed.) **New crops**. New York: Wiley, 1993. P.620-627.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (**Ocimum basilicum** L.) and thyme leaves (**Thymys vulgaris** L.) and their antioxidant properties. **Food chemistry**. v.91, n.01, p.131-137, 2005.

MACHALE, K. W.; NIRANJAN, K.; PANGARKAR, V. G. Recovery of dissolved essential oils from condensate waters of basil and **Mentha arvensis** distillation. **Journal of chemical technology & biotecnology**. v.69, n.03, p.362-366, 1997.

MAROTII, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of basil (**Ocimum basilicum** L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.44, n.12, p. 3926-3929, 1996.

MATTHEWS, R.E.F. **Fundamentals of plant virology**. London: Academic Pres Limited, 1992. 405p.

MILNE, R.G. Electron microscopy for the identification of plant viruses in vitro preparations. **Methods Virol.**, v.7, p.88-120, 1984.

MOLLOV, D. S.; HAYSLETT, M. C. Identification and Characterization of a Carlavirus Causing Vein Necrosis of Coleus. **Plant disease.** v.91, n.06, p.754-757, 2007.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil – an essential oil from **Ocimum basilicum** L. – against multidrug resistant clinical isolates of the genera **Staphylococcus**, **Enterococcus** and **Pseudomonas** by using different test methods. **Journal of microbiological methods.** v.53, n.01, p.105-110, 2003.

PLOETZ, R. C. Diseases of tropical perennial crops: challenging problems in diverse environments. **Plant disease.** v.91, n.06, p.644-663, 2007.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. **Trypanosoma cruzi**: activity of essential oils from **Achillea millefolium** L., **Syzygium aromaticum** L. and **Ocimum basilicum** L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental parasitology.** v.116, n.03, p.283-290, 2007.

SANZ, N. T.; CHEN, T.H.; LAI, P. Y. A newly discovered mosaic disease of bush basil (**Ocimum basilicum**) in Taiwan. **Plant pathology bulletin.** v.10, n.04, p.155-164, 2001.

SIFOLA, M. I.; BARBIERI, G. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia horticulture.** v.108, n.04, p. 408-413, 2006.

SILVA, F. DA; SANTOS, R. H. S.; DINIZ, E. R.; BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; LIMA, R. R. DE. Teor e composição do óleo volátil de manjeriço (**Ocimum basilicum** L.) em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista brasileira de plantas medicinais.** v.06, n.01, p.33-38, 2003.

SILVA, F. DA; SANTOS, R. H. S.; ANDRADE, N. J. DE; BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; LIMA, R. R. DE; PASSARINHO, R. V. M. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.40, n.04, p. 323-328, 2005.

SOARES, R. D.; CHAVES, M. A.; SILVA, A. A. L. DA; SILVA, M. V. DA; SOUZA, B. S. Influência da temperatura e velocidade do ar na secagem de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) com relação aos teores de óleos voláteis e de linalol. **Ciência e agrotecnologia**. v.31, n.04, p.1108-1113, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática** – guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005. 640p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

WERKER, E.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N.; KATZIR, I. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Annals of botany**. v.71, n.01, p.43-50, 1993.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; TEKWANI, B.; KHAN, S. I. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function on harvesting. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.56, n.02, p.380-385, 2008.

## ANEXO

### Anexo 1 – Teste t-Student para os principais componentes dos óleos voláteis

Metileugenol (%)	SADIA	INFECTADA	DIFERENÇA
1	35,62	13,14	22,48
2	43,23	14,05	29,18
3	31,75	13,03	18,72
4	30,62	31,11	-0,49
5	48,11	24,26	23,55

$$= \frac{\sum \bar{D}_1}{n} = \frac{93,44}{5} = 18,69$$

$$S_D = \sqrt{1/n-1 \sum (D_i - D)^2}$$

$$S_D = \sqrt{1/5-1 (22,48 - 18,69)^2 + (29,18 - 18,69)^2 + (18,72 - 18,69)^2 + (-0,49 - 18,69)^2 + (23,55 - 18,69)^2}$$

$$S_D = 11,36$$

$$t_{\text{obs}} = \frac{\bar{D}}{S_D/\sqrt{n}} = \frac{18,69}{11,36/\sqrt{5}} = 3,69 \quad t(n-1) \alpha/2 = 2,77$$

$t_{\text{obs}} = 3,69 > 2,77$  (há diferença entre as porcentagens de metileugenol)

$\rho$ -cresol,2,6-di-terci-butílico (%)	SADIA	INFECTADA	DIFERENÇA
1	46,91	57,56	-10,65
2	43,02	77,60	-34,58
3	55,30	65,83	-10,53
4	49,78	49,58	0,20
5	44,46	65,06	-20,60

$$= \frac{\sum \bar{D}_1}{n} = \frac{-76,16}{5} = -15,23$$

$$S_D = \sqrt{1/n-1 \sum (D_i - D)^2}$$

$$S_D = \sqrt{\frac{1}{5-1} ((-10,65 - (-15,23))^2 + (-34,58 - (-15,23))^2 + (-10,53 - (-15,23))^2 + (0,20 - (-15,23))^2 + (-20,60 - (-15,23))^2}$$

$$S_D = 13,08$$

$$t_{\text{obs}} = \frac{\bar{D}}{S_D/\sqrt{n}} = \frac{-15,23}{13,08/\sqrt{5}} = -2,61 \quad t(n-1) \alpha/2 = 2,77$$

$t_{\text{obs}} = |-2,61| < 2,77$  (não há diferença entre as porcentagens de *p*-cresol, 2,6-di-terci-butílico)