

AÇÃO FUNGITÓXICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS DA CAATINGA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. Em *Vitis Vinifera* L.

Jéssica de S. LIMA (1); Jane O. PEREZ (2); Paulo N. BARROS (3); Luciana C. AZEVEDO (4); Renato B. MENDES (5); Renata A. PESSOA (6)

- (1) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano – IF SERTÃO-PE, BR 235, Km 22, Cx. Postal 170, PISNC, Zona Rural, CEP 56302-970, (87)38623800, e-mail: jessyka_llima@hotmail.com
(2) IF SERTÃO-PE, e-mail: jane.perez@ifsertao-pe.edu.br
(3) IF SERTÃO-PE, paulonogueirabarros@hotmail.com
(4) IF SERTÃO-PE, lucianac.azevedo@hotmail.com
(5) IF SERTÃO-PE, renato_bmendes@hotmail.com
(6) IF SERTÃO-PE, renatinhapessoa@hotmail.com

RESUMO

Em decorrência dos malefícios que os pesticidas vêm causando ao homem e à natureza torna-se imprescindível buscar medidas alternativas de controle de pragas e doenças, com o uso de produtos naturais, eficientes e de baixo impacto ambiental. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo testar *in vitro* o efeito fungitóxico de plantas nativas da caatinga, na forma de extratos vegetais, no crescimento micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal da podridão seca ou morte descendente em videira (*Vitis vinifera* L.). Foram utilizados os seguintes tratamentos: extratos etanólicos de plantas de alecrim do campo (*Lippia microphylla* Cham), aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), angico (*Anadenanthera macrocarp* Benth.), maniçoba (*Manihot aesculifolia* H.B.K), jurema preta (*Mimosa Hostilis* Mart.) e caatingueira rasteira (*Caesalpinia microphylla* Mart.). Os resultados obtidos indicam que o extrato de alecrim do campo (*Lippia microphylla* Cham.) promoveu o maior percentual de inibição do crescimento micelial do fungo *L.theobromae*. O resultado inferior dos extratos vegetais de jurema preta, maniçoba, catingueira, angico e aroeira, sobre o fungo testado pode ser atribuído a uma possível inadequação da dosagem testada. Novos estudos serão necessários para utilização deste extrato em testes *in vivo*, para que dessa forma seja possível identificar os melhores compostos a serem utilizados no manejo de doenças em sistema de cultivo orgânico e convencional de videiras, e assim promover a redução no uso de produtos químicos e a contaminação do meio ambiente.

Palavras-chave: morte descendente, controle alternativo, *Vitis vinifera* L.

1 INTRODUÇÃO

A produção de uva no Nordeste do Brasil concentra-se principalmente na região do Submédio São Francisco, localizada nos sertões pernambucano e baiano. Favorecida pela potencialidade dos recursos naturais e pelos investimentos públicos e privados nos projetos de irrigação, esta região está conhecendo uma grande expansão no plantio e na produção de uvas finas de mesa (SILVA & CORREIA, 2010). Essa rápida expansão da viticultura no Nordeste do Brasil favoreceu, ademais, o surgimento de diversos patógenos até então desconhecidos para a cultura da videira ou mesmo considerados sem importância econômica (FREIRE & OLIVEIRA, 2010).

As doenças em plantas sempre foram motivos de grandes preocupações devido às perdas que ocorrem. Por essas razões muitas entidades consideram que os fungicidas são insumos importantes e imprescindíveis para a produção mundial de alimentos (MARQUES et al., 2002).

Doenças fúngicas constituem uma das principais causas de perdas durante a fase de comercialização de frutos tropicais. O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Syn. = *Botryodiplodia theobromae*) é o causador da podridão-seca que ocorre em qualquer época do ano em diversos tipos de frutos tropicais. Esse patógeno pode causar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo além da seca descendente (“dry-back”) o cancro em ramos, caules e raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, que resultam na morte de mudas e enxertos. Sua capacidade de infectar frutos coloca-o dentre os mais eficientes patógenos disseminados por meio de sementes e causadores de problemas pós-colheita (FREIRE et al., 2003; TAVARES, 2002),

O Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e, também, o terceiro em mortalidade de câncer. O uso de produtos derivados da indústria química no controle de doenças na agricultura moderna tem sido amplamente questionado pela sociedade, em decorrência dos efeitos adversos causados por estes (KOEPP et al., 1986; PAULA Jr. et al., 2006). Dentre estes efeitos é possível enumerar a poluição da água e do ar, a contaminação de alimentos, o aumento da resistência de patógenos aos produtos e os seus efeitos sobre as plantas, os animais e o homem (SOUZA, 1998).

Em decorrência dos malefícios que os pesticidas vêm causando ao homem e à natureza torna-se imprescindível buscar medidas alternativas de controle de pragas e doenças, com o uso de produtos naturais, eficientes e de baixo impacto ambiental. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleos essenciais de plantas pode constituir, ao lado da indução da resistência, em uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas (DIAS, 1993).

O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que validam sua eficácia (HERNANDEZ et al., 1998; OWOLADE et al., 2000; SOUZA et al., 2002; MORAIS, 2004).

O uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais, têm sido relatados como potentes fungicidas e inseticidas naturais, onde os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissor para uma utilização prática no controle de fitopatógenos (FRANCO et al., 2000; SANTOS et al., 2004; BASTOS & ALBUQUERQUE., 2004). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo testar *in vitro* o efeito fungitóxico de plantas nativas da caatinga, na forma de extratos vegetais, sobre o crescimento micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal da podridão seca ou morte descendente em videira (*Vitis vinifera* L.).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Atualmente movimentos ecológicos a nível mundial têm cobrado uma maior importância, incentivando o uso de substâncias naturais para o controle de pragas e doenças de plantas, a tal ponto que muitos produtos de exportação devem adequar-se ao cultivo orgânico, sem ter recebido produtos químicos (STAUFFER, 2000).

Estudos recentes têm mostrado a importância dos químicos naturais como uma possível fonte de pesticidas alternativos biodegradáveis e não tóxicos sistêmicos. Pesticidas de origem vegetal são de baixo custo, de fácil aquisição e uma alternativa para países em desenvolvimento, onde os fungicidas sintéticos são escassos e representam um alto custo aos produtores (AMADIOHA, 2000).

Tanto o extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais como o alecrim (*Rosmarinus officinalles*), manjerona (*Origanum majorana*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), menstrato (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), orégano (*Origanum vulgare*), romã (*Punica granatum*) hortelã pimenta (*Mentha piperita*), eucalipto lima (*Eucalyptos citriodora*), arruda (*Ruta graveolens*), erva cidreira (*Lippia alba*) e carqueja (*Baccharis trimera*) têm sido utilizados para estudos, *in vitro*, de inibição de crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos (SCHWAN-ESTRADA, s.d.).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais e aromáticas, obtidos a partir da flora nativa, têm indicado o potencial de controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica(s) de elicitor (BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004).

Fazolin *et al.* (2002) citam que a diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários, podendo ser utilizados como inseticidas e/ou repelentes de pragas e/ou doenças, que, de acordo com Cardoso *et al.* (2001), são aqueles compostos produzidos pelas plantas para sua sobrevivência como alcalóides, flavonóides, taninos, quinonas, óleos essenciais, saponinas, heterosídeos cardioativos. Segundo Ming (1996), menos de 1% da flora brasileira foi pesquisada quimicamente. Portanto, fica evidente que há necessidade de intensificar a pesquisa na área com o intuito de fornecer informações da composição química e seus efeitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e cultivo do patógeno

O fungo *L.theobromae* foi obtido a partir de isolamentos de material vegetal da videira com sintomas de morte descendente. Após o isolamento e identificação do patógeno, foram obtidas culturas puras em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados em condições ambiente (25 ± 2 °C e UR de $65 \pm 1\%$), por oito dias. Após a obtenção da cultura pura, a mesma foi preservada em geladeira para posterior utilização.

3.2 Obtenção dos extratos etanólicos de espécies vegetais da caatinga

Foram utilizadas seis espécies de plantas da caatinga para os testes com os extratos etanólicos, sendo estas: alecrim do campo (*Lippia microphylla* Cham), aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), angico (*Anadenanthera macrocarp* Benth.), maniçoba (*Manihot aesculifolia* H.B.K), jurema preta (*Mimosa Hostilis* Mart.) e caatingueira rasteira (*Caesalpinia microphylla* Mart.). O método de extração foi por destilação a vácuo, com o Evaporador rotativo modelo BT 350 vertical da Biotec / Bomba de vácuo e pressão, modelo NT 613 da Marconi (Figura 1). As folhas foram lavadas em água corrente e desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% durante 15 minutos, e depois lavadas com água destilada para retirar o excesso de hipoclorito de sódio, e em seguida as folhas foram submetidas à secagem em estufa a 60 °C. Foram utilizados 100g de folhas secas, sendo imersas no álcool etílico PA (na proporção de 1:10) onde ficaram por 24h em infusão, em seguida foi realizado a filtragem com gaze estéril para separar as folhas da solução. Depois de filtrada a solução foi colocada no balão do evaporador rotativo, utilizando uma temperatura de 60 °C, rotação quatro, e um vácuo de 600mmHg.



Figura 1. Extração de extratos etanólicos de plantas da caatinga pelo método de destilação (Evaporador rotativo), Laboratório de Bioquímica, IF SERTÃO-PE, 2009.

3.3 Teste “*in vitro*” dos extratos etanólicos de plantas nativas da caatinga ao fungo *L. theobromae*

Esta etapa foi conduzida em uma capela de fluxo laminar em ambiente estéril, para evitar contaminações. De cada um dos extratos foi depositado 50µL no centro das placas de Petri com meio BDA, utilizando uma micropipeta (Figura 2A). Em seguida cada alíquota com 50µL dos tratamentos foi distribuída nas placas de Petri com a utilização de uma alça de Drigalski. A partir do isolado do fungo com oito dias de cultivo, foram retirados discos de micélio de 5 cm de diâmetro dos bordos das colônias. Estes discos, individualmente foram inseridos em placas de Petri com os respectivos tratamentos. A incubação das placas foi realizada por um período de sete dias. Para cada um dos 6 tratamentos, foram utilizados 5 repetições, sendo cada repetição representada por 1 placa de Petri. Na testemunha, foram adicionados 50µL de ADE (água destilada esterilizada) mais o disco de meio de cultura com o fungo.

As avaliações foram realizadas através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) realizado diariamente, com auxílio de uma régua milimetrada. (Figura 2B). A avaliação foi finalizada quando a testemunha absoluta atingiu 100% do seu crescimento micelial na placa de Petri. Avaliou-se a taxa de crescimento micelial, calculando-se a percentagem de inibição pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa estatístico SISVAR 5.0.

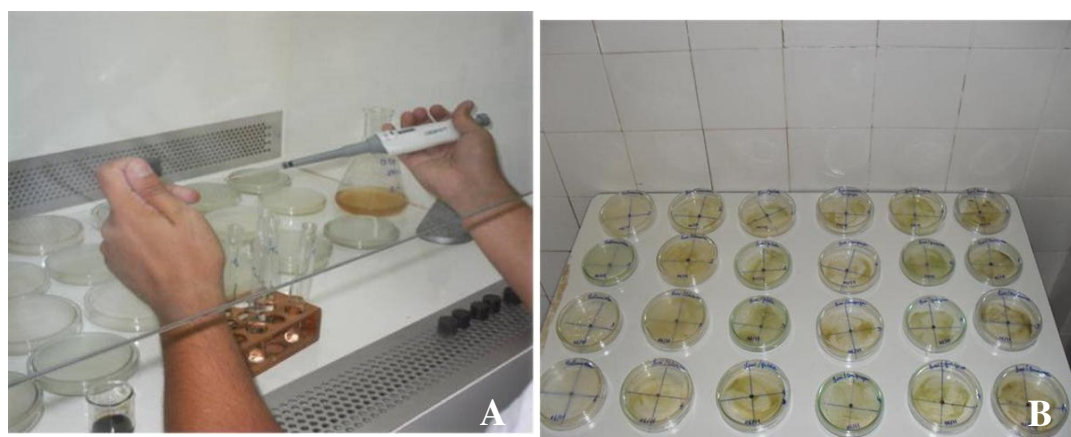
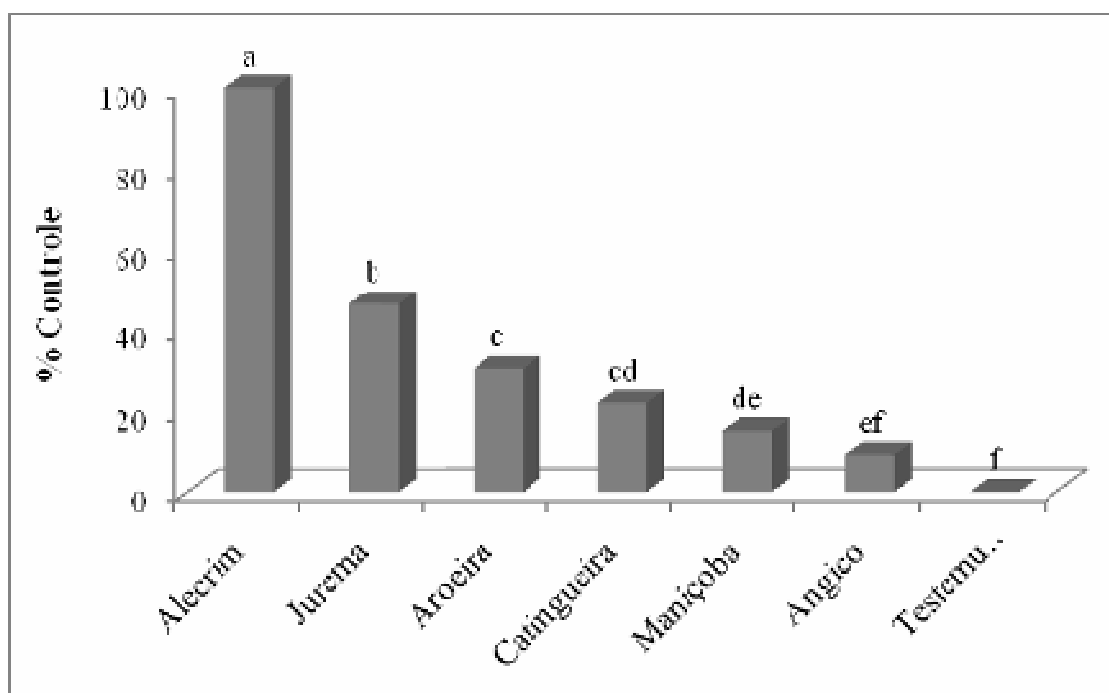


Figura 2. Teste “*in vitro*” de extratos (A) e crescimento micelial do fungo *L. theobromae* (B), Laboratório de Produção Vegetal, IF SERTÃO-PE, 2009.

4 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Observa-se na Figura 3, que os tratamentos apresentaram efeitos significativos comparados à testemunha e que o extrato etanólico de alecrim apresentou maior efeito inibitório sobre o crescimento do *L. theobromae*. Os extratos etanólicos de aroeira, catigueira, maniçoba e angico não diferiram entre si, estatisticamente. Foi avaliado também o percentual de controle dos extratos, verificando-se que o alecrim do campo obteve 100% de controle, Jurema Preta (46,45%), aroeira (30,34%), catigueira (21,89%), Maniçoba (15%), Angico (9,12%) e testemunha não obteve controle como esperado.

Silva e Bastos (2007), avaliando *in vitro*, a atividade fungitóxica de diferentes concentrações do óleo essencial extraído de dez espécies de *Piper* coletadas na região Amazônica, encontraram 100% de inibição na germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 3. Efeito dos diferentes extratos vegetais no crescimento micelial e controle *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* em *Vitis vinifera*. Petrolina, 2009.

De acordo os dados obtidos do gráfico (Figura 4) ao longo dos dias de avaliações, o tratamento com extrato etanólico de alecrim não obteve crescimento micelial do fungo *L. theobromae* comprovando a possível ação fungitóxica deste extrato como evidenciado para os resultados anteriores obtidos com *C. gloeosporioides*. Quanto aos demais tratamentos foram observados que a partir do 1º dia de avaliação já ocorria à formação de hifas e crescimento micelial. Mais uma vez o extrato de alecrim, destacou-se dos demais, inibindo totalmente o crescimento do fungo.

Na natureza, extratos vegetais produzem compostos voláteis que pode induzir, inibir a germinação ou o crescimento de microrganismos, desencadear alterações no desenvolvimento de plantas e fungos (FRENCH, 1992).

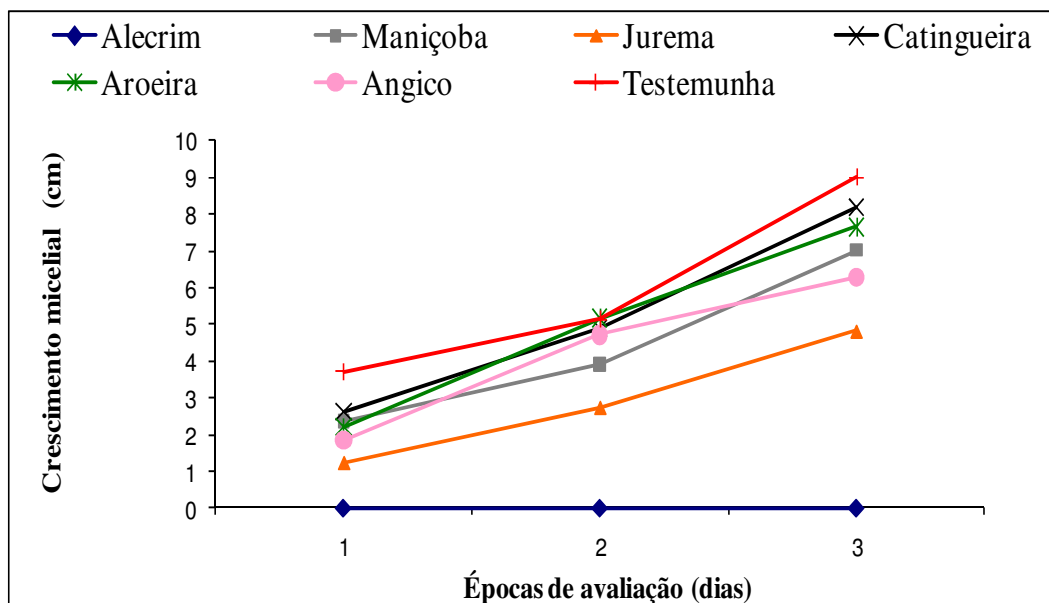


Figura 4. Taxa de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* da videira em meio de cultura BDA, *in vitro*, em função de diferentes extratos obtidos de plantas nativas da caatinga. Petrolina, 2009.

Pesquisas realizadas por Misra *et al.* (1992), Farooq *et al.* (2002), Azaz *et al.* (2002) e Kunle *et al.* (2003) mostraram que extratos vegetais, após fracionados, tornam-se muito mais eficientes. Assim, os resultados obtidos neste trabalho com a observação da eficiência do extrato etanólico do alecrim do campo no controle *L. theobromae*, evidenciam a necessidade de novos estudos, visando definir uma metodologia específica de extração, a melhor concentração e a composição química para que seja possível a sua utilização em larga escala no controle de doenças da videira, como uma alternativa à utilização de produtos químicos.

5 CONCLUSÕES

- O extrato de Alecrim do campo (*Lippia microphylla* Cham.) promoveu o maior percentual de inibição do crescimento micelial de *L. theobromae*.
- Os extratos vegetais de jurema preta, maniçoba, catingueira, angico e aroeira, não apresentaram efeito sobre o crescimento micelial fungo;
- Os extratos vegetais são misturas complexas e necessitam serem identificados e testados separadamente, visando elucidar a ação destes compostos sobre o comportamento de fitopatógenos.

6 AGRADECIMENTOS

- À FACEPE pelo financiamento da bolsa de pesquisa PIBIC/FACEPE/CNPq;
- Ao IF SERTÃO-PE pela oportunidade concedida na realização do Curso Superior de Tecnologia em Fruticultura irrigada;
- Ao Grupo de Pesquisa Fruticultura Irrigada do IF SERTÃO-PE e a professora Dra. Jane Oliveira Perez, pela orientação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADIOHA, A. C. **Controlling Rice blast “in vitro” and “in vivo” with extracts of *Azadirachta indica*.** Crop Protection, Oxford, v. 19, n.5, p.287-290, 2000.
- AZAZ, D., F. DEMIRCIB, F. SATÝLA, M. KÜRKÇÜOĞLU & K. H. C. BASER. 2002. **Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils.** Z. Naturforsch, 57 (1): 817-821
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. **Efeito de óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banan.** Fitopatologia Brasileira. V. 29, n.5, p.555-557, 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1999. **Instrução Normativa Nº 007, de 17 de maio de 1999.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 15 de junho de 2008.
- CARDOSO, M. das G.; SHAN, A. Y. K. V. & SOUZA, J. A. de. **Fitoquímica e química de produtos naturais.** Lavras – MG: UFLA/FAEPE, 2001, 67 p. (Textos Acadêmicos).
- DIAS, F. L. 1993. Estudo da genotoxicidade in vivo e in vitro dos cercaricidas naturais óleo de sucupira e cremantina em células de mamíferos. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo. 105 p.
- FAROOQ, A., M. I. CHOUDHARY, A. RAHMAN, S. TAHARA, K. H. C. Baser & F. Demirci. 2002. **Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*.** J. Biosciences, 57 (9/10): 863-866.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; LIMA, A. P. de & ARGOLO, V. M. **Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné).** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa, Rio Branco – Acre, n.37, 2002, p.1-42.
- FRANCO, D. A.; BETTIOL, W. **Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citrus com produtos alternativos.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.25, p.602-606, 2000.
- FREIRE, F.C.O. & CARDOSO, J.E. Doenças do coqueiro. In: Freire, F.C.O, Cardoso, J.E. & Viana, F.M.P. (Ed.) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília. **Embrapa Informações Tecnológica.** 2003. pp. 191 – 226.
- FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro-bacteriano da videira no Estado do Ceará.** Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_062.pdf>. Acesso em: 17 maio 2010.
- FRENCH RC (1992). **Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores.** Mycologia 84:277-288.
- HERNANDEZ, A. A. M. ROSAS, R. M., AGUILERA, P. M. M. & LAGUNES, T. A. **Use of plant and mineral powders as an alternative for the controlo f fungi in stored maize grain.** Agrociencia 32:75-79. 1998.
- KUNLE, O., J. OKOGUN, E. EGAMANA, E. EMOJEVWE & M. Shok. 2003. **Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract.** Phytomedicine, 10 (1): 59-61.
- KOEPPF, H. H. et al., Agricultura Biodinâmica. 4. Ed. São Paulo: Nobel, 1986.
- MARQUES, M. C. S., CARDOSO, M. DAS G.; SOUZA, P. E.; GAVILANES, M. L.; SOUZA, J. A.; PEREIRA, N. E.; NEGRÃO, I. O. **Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*.** Ciência Agrotec, Lavras, p. 1410-1419, 2002.

MING, L.C. 1996. Coleta de plantas medicinais. P.69-86. In L.C. Di Stasi(Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudos multidisciplinar**. Universidade Paulista, São Paulo. 345 p.

MISRA, T. R., S. SINGH, H. S. Pandey, C. PRASAD & B. P. Singh. 1992. **Antifungal essential oil and a long chain alcohol from *Achyranthes aspera***. *Phytochemistry*, 31(5):1811-1812.

MORAIS, M. S., Efeito de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem. **Dissertação de Mestrado**. Areia PB. Universidade Federal da Paraíba. 2004.

OWOLADE, O. F., AMUSA, A. N. & OSIKANLU, Y. O. Q. **Efficacy of certain indigenous plant extracts against seed-borne infection of *Fusarium moniliforme* on maize (*Zea mays* L.) in south western Nigeria**. *Cereal Research Communications* 28:323-27.2000.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al., **Controle alternativo de doenças de plantas – histórico**. In: VENZON, M. et al., (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG – CTZM/UFV, 2006. P.135-62.

SANTOS, P. M.; ALVES, E. S. S.; FERREIRA, W. S.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. **Uso de formulações de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamão**. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, supl., p.125.2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; J.R.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S.F. **Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo**. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22 (Suplem.), p. 346.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. 2007. **Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici***. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 143-145.

SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. **Cultivo da Videira**: Caracterização social e econômica da videira. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 09 maio 2010.

SOUZA, J. L. **Agricultura Orgânica**. Tecnologias para a produção de alimentos saudáveis. Vitória: EMCAPA, 1998.

SOUZA, M. A. A., BORGES, R. S. O. S. STARK, M. L. M. & SOUZA, S. R. Efeito de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de plantas medicinais sobre a germinação de sementes de alface e sobre o desenvolvimento micelial de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. *Revista Universidade Rural* 22:181-185. 2002.

STAUFFER, B. A; ORREGO, F. A.; AQUINO, J. A. **Selección de extractos vegetales com efecto fungicida y/c bactericida**. *Revista Ciencia y tecnologia: Dirección de Investigaciones – UMA*, v.1 n.2, 2000.

TAVARES, S.C.C.H. **Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae*** – situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira*. 2002. 27: 46-52. 2002.