

ATIVIDADE FUNGITÓXICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS DA CAATINGA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides* 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, BR 235, Km 22, Cx. Postal 170, PISNC, Zona Rural, CEP 56302-970, (87)38623800, e-mail: jessyka_llima@hotmail.com

(2) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, e-mail: janeperrez@cefetpet.br

(3) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, paulonogueirabarros@hotmail.com

(4) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, lucianac.azevedo@hotmail.com

(5) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, renato_bmendes@hotmail.com

(6) Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, renatinhapessoa@hotmail.com

RESUMO

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças que afetam as culturas agrícolas tem causado impactos ao ambiente e à saúde humana. Pesquisas sobre o potencial de utilização de substâncias como extratos vegetais no controle de fitopatógenos são promissoras, indicando uma alternativa viável, ecológica, e de fácil obtenção pelo agricultor. O presente trabalho objetivou avaliar espécies de plantas nativas da caatinga que possuam ação antagônica a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz agente causal da antracnose em *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 macrocarpa* Benth.), maniçoba (*Manihot aesculifolia* H.B.K), jurema preta (*Mimosa Hostilis* Mart.) e caatingueira rasteira (*Caesalpinia microphylla* Mart.). Os resultados obtidos indicaram que os tratamentos apresentaram efeitos significativos comparados à testemunha. Destacaram-se os extratos de alecrim e jurema preta com um percentual de inibição 88,67% e 47,56% respectivamente, em relação aos demais extratos verificou-se uma queda na eficiência da inibição dos extratos de aroeira (26,66%), caatingueira (22,22%), maniçoba (20,55%) e angico (20,33%) que não diferiram entre si, estatisticamente. 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: fungo, controle alternativo, antracnose.

1 INTRODUÇÃO

As condições edafo-climáticas do semiárido, aliadas às técnicas modernas de irrigação, permitiram que a região do Submédio São Francisco tenha se destacado, na última década, como grande produtora e exportadora de uvas finas de mesa de alta qualidade (LOPES & NASCIMENTO, 2004).

Não obstante a enorme importância que a produção de uvas tem para a economia regional, a videira (*Vitis vinifera* L.) é acometida por uma série de doenças, destacando-se a antracnose, agente causal *Colletotrichum gloeosporioides* responsável por reduções consideráveis na produção e na qualidade das frutas, tornando-se, em muitos casos, fatores limitantes ao processo de produção (GARRIDO *et al.*, 2009).

A rápida deterioração, acelerada pela infecção fúngica, é fator que causa perda econômica e compromete a qualidade do produto comercial (DANTAS, 2003). Em todos os lugares do mundo onde se pratica uma agricultura econômica, a criação de métodos de controle de doenças tem sido um desafio para o homem, e dentro desta perspectiva, o principal método utilizado são os compostos químicos sintéticos. Apesar de sua significativa contribuição para a produção agrícola o uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente, aos seres vivos e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a estas substâncias químicas (GHINI & KIMATI, 2000).

A pesquisa fitopatológica visando o controle da população de fungos e outros microrganismos, principalmente aqueles que provocam danos à agricultura, através do emprego de óleos, bálsamos e extratos vegetais tem tido um considerável implemento nos últimos anos (BASTOS, 1997; DAVID *et al.*, 2006).

Os extratos e produtos derivados de vegetais têm sido estudados quanto à eficácia no controle de doenças de plantas, para o uso em sistemas de produção que buscam a redução ou eliminação do uso de agrotóxicos (BERNADO *et al.*, 2002). Na agricultura orgânica, os preparados à base de vegetais são utilizados para o controle de doenças, quando necessário (DAROLT, 2002).

A determinação da atividade biológica desses componentes, com respeito ao efeito antimicrobiano, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas, fundamentais para o manejo de doenças de plantas, minimizando o aparecimento de microrganismos resistentes, bem como a contaminação do meio ambiente. 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 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., agente causal da antracnose.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O uso irracional de agrotóxicos acarreta sérios problemas ao meio ambiente, homem e animais. Desta forma, pesquisas vêm sendo feitas com métodos alternativos de controle de doenças, tais como biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais (MOREIRA *et al.*, 2002). A utilização de extratos de plantas com propriedades antifúngicas constitui-se numa alternativa ecológica promissora, podendo, ainda, ser associadas às demais práticas de manejo integrado de doenças, contribuindo para atender à crescente demanda nacional e internacional por produtos orgânicos (CARVALHO *et al.*, 2000).

De acordo com Diniz *et al.* (2006), a implementação de sistemas alternativos, reduz os riscos de poluição e de intoxicação de produtores e consumidores. O uso de extratos vegetais, por exemplo, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que validam sua eficácia (HERNANDEZ *et al.*, 1998; OWOLADE *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2002; MORAIS, 2004).

Uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de extratos vegetais, buscando explorar suas propriedades fungitóxicas. A literatura tem registrado a eficiência de extratos, obtidos de uma gama enorme de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (KURITA *et al.*, 1981; WILSON *et al.*, 1997).

ROZWALKA *et al.*, (2008) observou o efeito inibitório dos extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre o crescimento micelial de *G. cingulata* e *C. gloeosporioides* indicando potencial de controle da antracnose em frutos de goiabeira.

O extrato bruto de plantas medicinais (alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerona (*Origanum majorana*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), menstrato (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), orégano (*Origanum*

vulgarè), 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.).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e cultivo do patógeno

O fungo *C. gloeosporioides* foi obtido a partir de isolamentos de material vegetal da videira com sintomas específicos. 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 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 obtenção de 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 pelo método de destilação (Evaporador rotativo), Laboratório Bioquímica, IF SERTÃO-PE, 2009.

3.3 Atividade fungitóxica de extratos ao crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

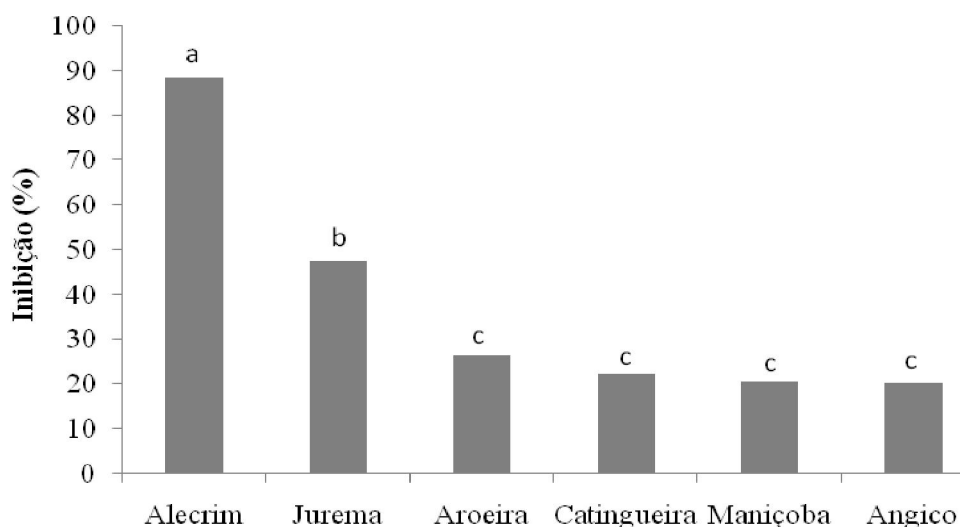
Esta etapa foi conduzida em uma capela de fluxo laminar em ambiente estéril, para evitar contaminações. De cada um dos extratos foi depositado 50µL no centro das placas de Petri com meio BDA, utilizando uma micropipeta. Em seguida cada alíquota com 50µL dos tratamentos foi distribuída nas placas de Petri 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 mm 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. A avaliação foi finalizada quando a testemunha absoluta atingiu 100% do seu crescimento micelial na placa de Petri. Os dados observados foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software estatístico SISVAR 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeito dos extratos etanólicos ao crescimento micelial do fungo *C. gloeosporioides*

Os resultados obtidos (Figura 2) indicaram que os tratamentos apresentaram efeitos significativos comparados à testemunha. Destacaram-se os extratos de alecrim do campo e jurema preta com um percentual de inibição 88,67% e 47,56% respectivamente, em relação aos demais extratos verificou-se uma queda na eficiência da inibição dos extratos de aroeira (26,66%), catingueira (22,22%), maniçoba (20,55%) e angico (20,33%) que não diferiram entre si, estatisticamente. A pouca eficiência destes extratos de plantas sobre o crescimento micelial do fungo testado pode ser atribuído a uma possível inadequação da dosagem testada, para estas espécies, ou porque as mesmas não possuem compostos com ação fungitóxica.



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

Figura 2. Efeito de diferentes extratos etanólicos na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* obtido de *Vitis vinífera* L.

Rozwalka (2003) cita que a inibição total ou parcial do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* observada *in vitro*, pelo extrato aquoso de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), na concentração de 10% apresentou efeito fungitóxico inibindo 100% do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Glomerella cingulata* sendo um eficiente controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira.

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. Um exemplo característico é terpinolene, extraído de compostos vegetais oriundos de diversas plantas aromáticas e medicinais. Esse componente fracionado inibe significativamente o desenvolvimento dos fungos *Botrytis cinerea* e *Aspergillus* sp., ambos fitopatogênicos (FAROOQ, et al., 2002).

De acordo com os dados expressos na (Figura 3), foi observado ao longo dos dias de avaliação que o extrato etanólico de alecrim do campo apresentou um melhor efeito no crescimento micelial do *C. gloeosporioides* apresentando micélio somente a partir do 4º dia de avaliação em relação aos demais tratamentos que apresentaram crescimento a partir do 1º dia de avaliação.

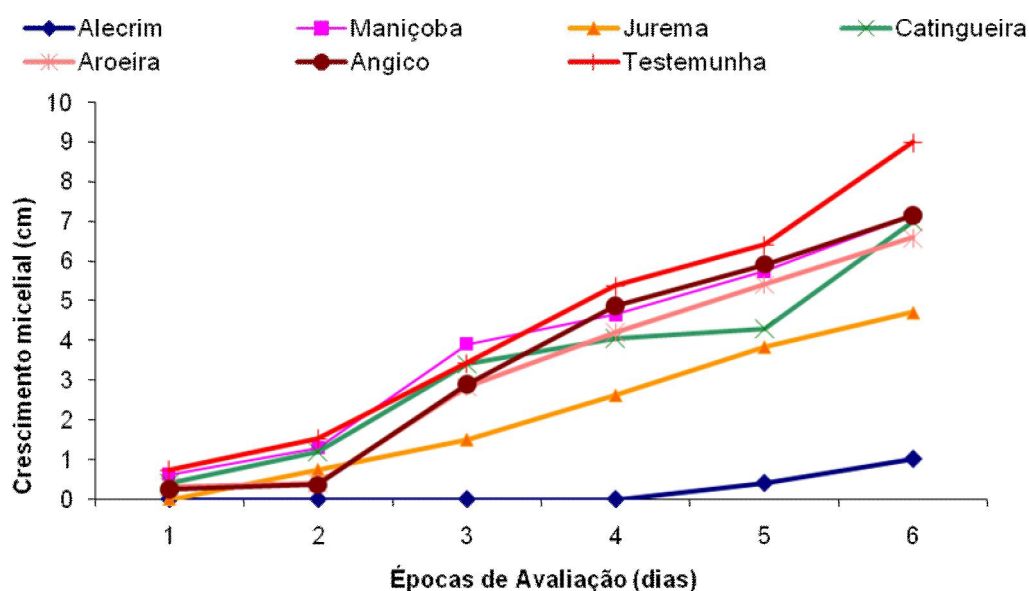


Figura 3. Curva do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido de videira, cultivado em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) contendo diferentes extratos etanólicos extraídos de plantas nativas da caatinga.

Com a obtenção destes resultados preliminares, pode-se inferir que o extrato de alecrim possui alguma substância capaz de inibir o crescimento vegetativo, ou seja, a formação de hifas que originam o desenvolvimento do micélio fúngico, etapa essencial para o processo que originará o ciclo reprodutivo do patógeno. Os extratos vegetais são misturas complexas e necessitam serem identificados e testados separadamente, visando elucidar a ação destes compostos sobre o comportamento dos fitopatógenos. Segundo Goodman e Gilman, (1978) o óleo de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) possui como principal componente o timol (60%), que tem conhecida ação bactericida e antimicótica. Estudos utilizando extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e gengibre (*Zingiber officinale*), indicaram potencial de controle da antracnose em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), (ROZWALKA *et al.*, 2008). 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.

5 CONCLUSÃO

O percentual de inibição (88,67%) no crescimento micelial do fungo *C. gloeosporioides* a partir do extrato etanólico de alecrim do campo (*Lippia microphylla* Cham.), evidencia a existência de compostos biologicamente ativos, com efeito fungitóxico. No entanto, é necessário mais estudos para confirmação dos resultados.

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

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. **Efeito do óleo de *Piper adunum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos.** Fitopatologia Brasileira, v.22, n.3, p.441-3, 1997.

BERNARDO, R.; SCHWAN- ESTRADA, K. R. F. POVH, F.P.; SALVATORI, R.K., STANGARLIN, J.R. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais.** Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 28, n.1, p. 110, 2002.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T. de; CHOAIRY, S.A.; BARREIRO NETO, M.; SANTOS, E. S. dos. **Controle da fusariose do abacaxizeiro com plantas antibióticas.** João Pessoa: EMEPA - PB, 2000. 37p.

DANTAS, S.A.F. **Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja: ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos.** 2003. Tese(Doutorado)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,2003.

DAROLT, M.R. **Guia do produtor orgânico:** como produzir em harmonia com a natureza. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2002. 42p.

DAVID, E. F. S. **Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais. V.8, n.4, p.183-8, 2006.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S. & MIZUBUTI, E. S. G. **Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.31, n.2, 2006, p.171-179.

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.

GARRIDO, Lucas da R.; SONEGO, Olavo Roberto. **Podridão ataca uva madura.** Disponível em: http://www.revistacampoenegocios.com.br/antiores/10-08/index.php_referencia=em_negrito07>. Acesso em: 30 jul. 2009.

GHINI, R. & KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2000.

GOLDMAN, L.S.; GILMAN, A. 1978. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 5ª ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.883-884.

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 control of 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.

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. **Antifungal activity of components of essential oils**. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.45, p.945-952, 1981.

LOPES D. B.; NASCIMENTO A. R. P. **Situação Atual do Cancro Bacteriano da Videira no Semi-Árido Nordeste**. Seminário Novas Perspectivas para o Cultivo da Uva sem Sementes... Embrapa Semi-Árido, Documentos 185, 2004.

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.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L., ALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; LIMA, M. L. R. Z.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós-colheita de *Monilia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v.27, p.395-398, 2002.

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.

ROZWALKA L.C., LIMA M.L.R., MIO L.L.M., NAKASHIMA T., (2008). **Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba**. *Ciência Rural* 38:301-307.

ROZWALKA, L.C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 2003. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

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.

SOUZA, J. S. I.; MARTINS, F. P. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

WILSON, C.L.; SOLAR, J.M.; GHAOOUTH, A.E.; WINIEWSKI, M.E. **Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against botrytis cinerea**. *Plant Disease*. V.81, p.204-210, 1997.