

## ATIVIDADE FUNGITÓXICA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Reinaldo Bernardo<sup>1</sup>; Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada<sup>1\*</sup>; José Renato Stangarlin<sup>2</sup>; Juliana Santos Batista Oliveira<sup>1</sup>; Maria Eugenia Souza Cruz<sup>1</sup>; Renata Moreschi Mesquini<sup>1</sup>

SAP 9177      Data envio: 17/12/2013      Data do aceite: 06/02/2014

Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471

Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 2, abr./jun., p. 89-93, 2015

**RESUMO** - Plantas medicinais apresentam em sua composição princípios ativos derivados do metabolismo secundário que apresentam ação fungistática e/ou fúngitóxica no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Este trabalho teve como objetivo estudar extratos aquosos das plantas medicinais *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera* e *Cnicus benedictus* no crescimento *in vitro* de fitopatógenos. O delineamento experimental inteiramente casualizado contou com três espécies medicinais, seis concentrações de cada extrato aquoso (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%), cinco fitopatógenos - *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfii*, cada um com quatro repetições. As variáveis analisadas foram inibição do crescimento micelial (ICM), crescimento micelial final (CMF) e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM). Os extratos aquosos em diferentes concentrações apresentaram interações significativas para as variáveis analisadas, demonstrando potencial na inibição do crescimento destes fitopatógenos.

**Palavras-chave:** *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera* e *Cnicus benedictus*, *Alternaria alternata*, plantas medicinais.

### *In vitro fungitoxic activity of plants extracts on mycelial growth of phytopathogenic fungi*

**ABSTRACT** - Medicinal plants have active compounds in their composition produced from secondary metabolism, which can have fungistatic and /or fungitoxic action on the development of phytopathogens. The objective of this work was to study the effect of aqueous extracts of *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera* and *Cnicus benedictus* on mycelial growth of plant pathogens. The experimental design had three medicinal plants, six concentrations of each aqueous extract (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 50%), five fungus - *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia rolfii*, and four repetitions for each treatment. The variables analyzed were: inhibition of mycelial growth, mycelial growth and area under the curve of mycelial growth. The aqueous extracts in different concentrations showed significant interactions with the analyzed variables, demonstrating that they have potential to control these pathogens.

**Key words:** *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera*, *Cnicus benedictus*, *Alternaria alternata*, medicinal plants.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – UEM, Departamento de Agronomia, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR. E-mail: krfsestrada@gmail.com. \*Autor para correspondência

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Centro de Ciências Agrárias, Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam uma importante fonte de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas com fungicidas de origem sintética, caracterizam uma proposta ecológica praticamente inofensiva ao meio ambiente (STANGARLIN et al., 1999). Estas substâncias são compostos do metabolismo secundário das plantas medicinais e podem ter ação antimicrobiana direta sobre o fitopatógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003) ou ação indutora de mecanismos de resistência na planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Os estudos com as plantas medicinais tem utilizado o extrato bruto aquoso e o óleo essencial para avaliar a inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos (WILSON et al., 1997; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006; VIUDA-MARTOS et al., 2007; PEREZ-SÁNCHEZ et al., 2007; BARRERA-NECHA et al., 2009). Por exemplo, Silva et al. (2008) avaliaram os extratos das plantas cana-de-macaco (*Costus pisonis*), mil-folhas (*Achillea millefolium*) e boldo-da-terra (*Plectranthus barbatus*) na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* e verificaram que *P. barbatus* reduziu o crescimento micelial de *C. musae*, *C. gloeosporioides* (isolado de mamão e de cacau) e *C. lindemuthianum* em 82%, 49%, 47% e 53%, respectivamente.

Além do extrato aquoso, extratos metanólicos e etanólicos também são utilizados no controle in vitro de fitopatógenos. Celoto et al. (2008) estudaram a atividade fungitóxica de extrato hidroetanólico da planta medicinal melão-de-são caetano (*Momordica charantia*) no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* de mamoeiro, observando ação fungitóxica do mesmo. Salustiano et al. (2006), avaliaram a atividade de extrato metanólico de candeia (*Eremanthus erythropappus*) sobre a germinação de urediniosporos das ferrugens *Puccinia psidii*, *Hemileia vastatrix*, *Phakopsora pachyrhizi* e *Cerotelium fici* o qual inibiu totalmente a germinação de urediniosporos

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do extrato das plantas medicinais manjeriço (*Ocimum basilicum*), carqueja (*Baccharis trimera*) e cardo santo (*Cnicus benedictus*), no desenvolvimento in vitro de *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos fungos fitopatogênicos

Os isolados fúngicos de *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii* foram obtidos da coleção de fungos do laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá, PR. Os mesmos foram repicados e cultivados em batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

### Obtenção do extrato bruto aquoso (EBA) de manjeriço (*O. basilicum*), carqueja (*B. trimera*) e cardo santo (*C. benedictus*).

Para a obtenção dos extratos aquosos, folhas frescas das plantas medicinais, colhidas entre 12:00 - 14:00 h foram trituradas em 1000 mL de água destilada, em liquidificador por 3 min. A solução resultante foi filtrada em gaze e em papel de filtro Whatman n°1, obtendo-se o extrato aquoso bruto, o qual foi incorporado ao BDA para se obter concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25% e 50% e distribuídos em placa de Petri estéreis. Após a solidificação do meio, um disco de micélio, cujo diâmetro era de 8 mm, dos isolados de *A. alternata*, *C. graminicola*, *Phytophthora* sp., *R. solani* e *S. rolfsii*, com 10 dias de crescimento em BDA, foram transferidos para o centro das placas, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidos no escuro a 28 °C ± 2° C. No tratamento controle foram utilizadas placas contendo apenas meio BDA. Para a avaliação do crescimento micelial fez-se a medição do diâmetro das colônias a cada 24 h em posição ortogonal durante sete dias, a partir do momento de repique.

### Análise das variáveis

Os valores do crescimento micelial obtidos pela medição diária das colônias foram utilizados no cálculo da inibição do crescimento micelial (ICM) utilizando a fórmula descrita por Bastos (1997):  $ICM (\%) = (T-t) \cdot 100/T$ , onde T é o diâmetro de crescimento do controle e t o diâmetro das placas com tratamento. No cálculo da área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) utilizou-se a equação proposta por Campbell e Madden (1990):  $AACCM: [\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_i] / n$  onde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas,  $d_i$  o intervalo entre as avaliações e n a duração do período de avaliação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), contando com cinco fitopatógenos, três espécies medicinais, seis concentrações de cada extrato aquoso e quatro repetições. Cada unidade experimental constitui-se de uma placa de Petri. Os dados foram analisados por meio de curvas de regressões tendo as concentrações dos extratos aquosos como variável independente. Modelos de regressão foram testados e selecionados com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e quadrado médio do erro (QMR). As análises foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2000).

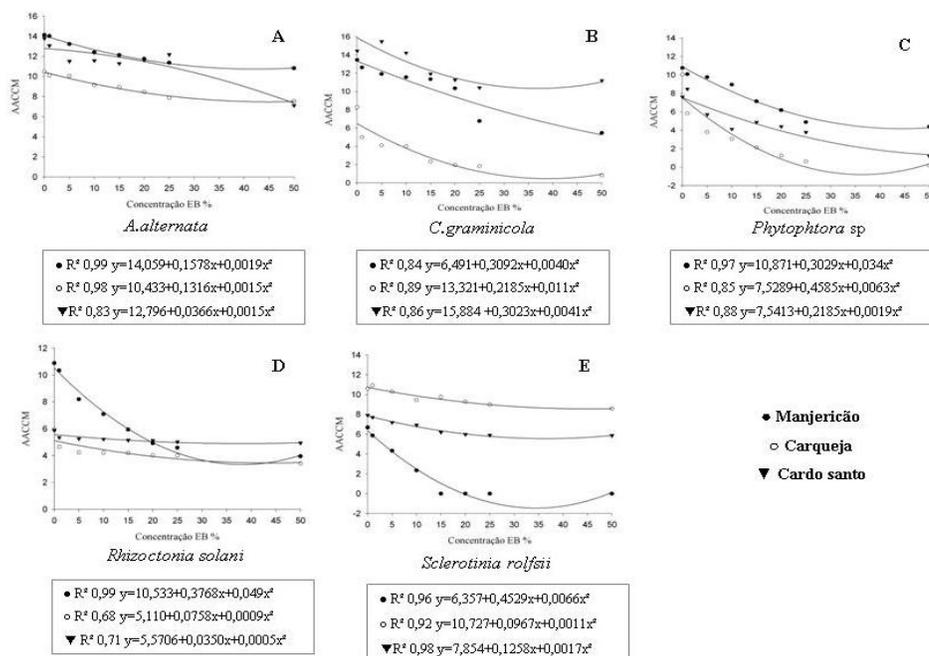
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interações significativas ( $P=0,05$ ) foram constatadas entre as concentrações e os extratos etanólicos no crescimento micelial dos fitopatógenos. O modelo quadrático foi o que apresentou o melhor ajuste para descrever o comportamento das variáveis ICM, CM e AACCM em função das concentrações utilizadas.

Para a variável inibição do crescimento micelial (ICM) (Figura 1) observou-se que a maioria dos extratos aquosos apresentou comportamento dose dependente, isto

é, com o aumento da concentração de cada extrato, maior foi a inibição do crescimento dos fitopatógenos. O extrato de carqueja promoveu as maiores inibições em *A. alternata*, *C. graminicola*, *Phytophthora* sp. e *R. solani*,

enquanto que para *S. rolfssii* o melhor extrato foi de manjeriçã.



**FIGURA 1 - Inibição do crescimento micelial (%) de fungos fitopatógenicos sob diferentes concentrações de extratos aquosos de plantas medicinais.**

Semelhante ao observado neste trabalho, Stangarlin et al. (1999) também verificaram que os extratos aquosos de alfavaca (*O. basilicum*), arruda (*Ruta graveolens*) e carqueja, apresentaram atividade antifúngica sobre *R. solani*, *S. rolfssii*, *A. alternata*, *Phytophthora* sp. e *C. graminicola*. Já Silva et al. (2009) estudaram o efeito dos extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* e observaram que extratos combinados de alho (*Allium sativum*) + manjeriçã (*O. basilicum*) e casca de angico (*Anadenanthera colubrina*) + manjeriçã não inibiram o crescimento micelial do fungo, enquanto o extrato de manjeriçã isoladamente, proporcionou o menor crescimento micelial, indicando a ação fungicida e inibitória sobre o fungo.

No crescimento micelial dos fitopatógenos (Figura 2) os coeficientes de determinação variaram de 72% a 99%. Para os fungos *A. alternata*, *C. graminicola* e *Phytophthora* sp., observou-se que nas menores concentrações (1%, 5% e 10%) houve maior crescimento dos fitopatógenos e já na concentração de 50%, constatou-se menor incremento no crescimento micelial. Para os fungos *R. solani* e *S. rolfssii* observou-se resposta menos evidente em relação a concentração dos extratos x crescimento micelial; o extrato aquoso de carqueja e cardo santo proporcionaram crescimento micelial dos fitopatógenos independente da concentração utilizada, diferente do extrato de manjeriçã, que apresentou pico de

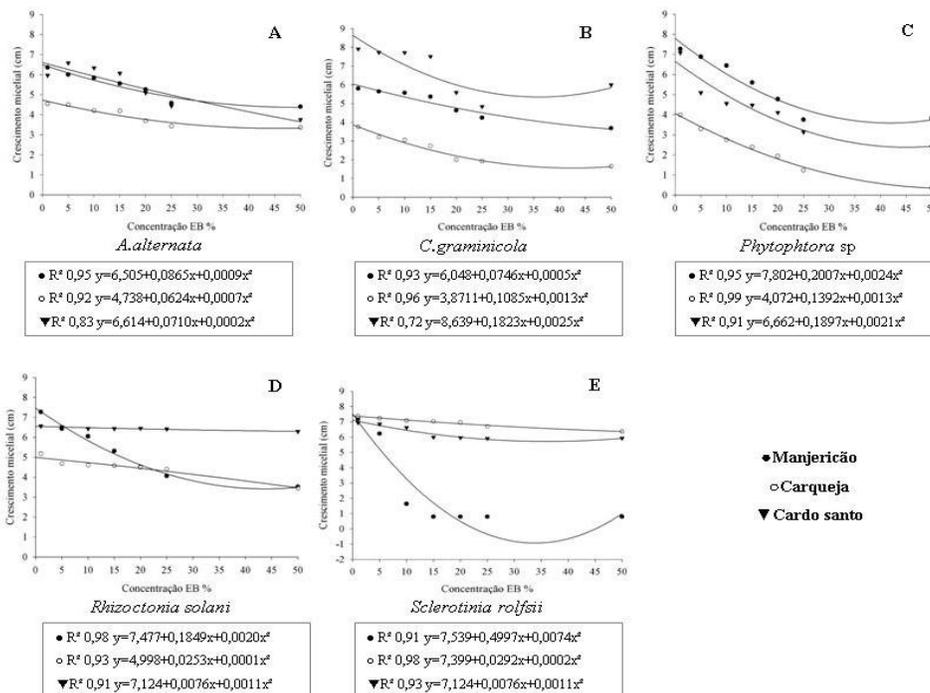
25% na redução do crescimento micelial. Resultados semelhantes foram observados por Benini et al. (2010), estudando o efeito do EBA de alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*), coletado nas quatro estações do ano, no crescimento micelial *in vitro* dos fungos *R. solani*, *S. rolfssii*, *Phytophthora* sp. e *A. alternata*. Os autores verificaram que o EBA das plantas colhidas no outono proporcionou os melhores resultados, sendo que nesta estação do ano o EBA na concentração de 5% foi suficiente para promover 100% de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *A. alternata* e *S. rolfssii*.

Em relação à área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCm) (Figura 3), que resume todas as avaliações de crescimento micelial dos fitopatógenos em apenas um valor, observou-se altos valores dos coeficientes de determinação, demonstrando a precisão e confiabilidade dos dados. De forma geral, é possível determinar que a concentração de 25% dos extratos aquosos foi a dose ótima de inibição do crescimento micelial, pois os valores observados a partir das concentrações menores (1%, 5%, 10%, 15%, 20%) até 25% demonstram as maiores reduções no crescimento micelial dos cinco fitopatógenos testados, e a partir desta concentração houve pouco ou nenhum incremento no crescimento micelial (Figura 3).

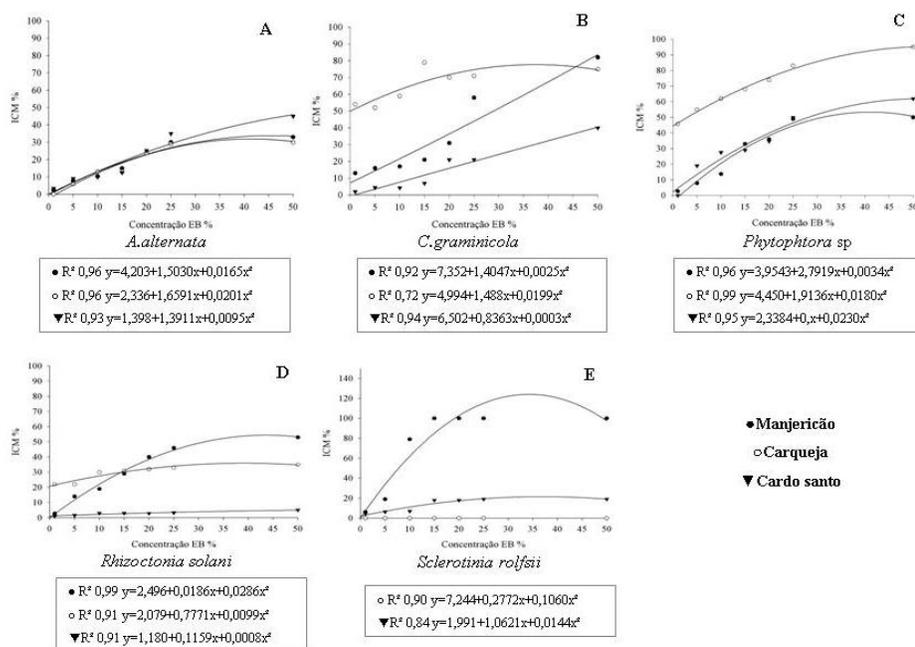
Ram (1997) relatou a inibição do crescimento micelial de *Alternaria brassicae* por meio de extrato de

bulbo de alho. Hoassain et al. (2005) constataram que extratos de Neen (*Azadirachta indica*) seguido de alho e erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper*) exibiram alta atividade antifúngica sobre *Bipolaris sorokiniana*,

*Alternaria tenuis*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp e *Aspergillus* spp.



**FIGURA 2 - Crescimento micelial (cm) de fungos fitopatogênicos sob diferentes concentrações de extratos aquosos de plantas medicinais.**



**FIGURA 3 - Área abaixo da curva do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos sob diferentes concentrações de extratos aquosos de plantas medicinais.**

Rozwalka (2003) observou que o extrato aquoso de cancorosa (*Jodina rhombifolia*) inibiu em apenas 9,07% o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* demonstrando baixa eficiência desse extrato quando comparado ao obtido de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que inibiu em 100% o crescimento do fungo, em meio BDA, na concentração de 10%. Ranasinghe et al. (2002), utilizaram as plantas medicinais cravo-da-índia e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) que apresentaram efeito fungistático e fungicida contra *Colletotrichum musae* e *Fusarium proliferatum*, ambos patógenos da bananeira. Já Iqbal et al. (2001) estudaram o efeito do extrato de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), verificando que o mesmo inibiu em 70% o crescimento micelial de *R. solani*.

Os extratos aquosos das espécies utilizadas neste trabalho assim como os descritos na literatura evidenciam o potencial do uso de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, contribuindo assim, para estudos futuros e para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo compostos bioativos obtidos de plantas medicinais.

## CONCLUSÕES

Nas condições estudadas os extratos das plantas medicinais *Ocimum basilicum*, *Baccharis trimera* e *Cnicus benedictus* apresentaram efeitos antifúngico sobre *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii*, inibindo significativamente o crescimento de todas as espécies estudadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRERA-NECHA, L.L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; FLORES-MOCTEZUMA; ROJAS-ESTUDILLO, A. Efficacy of essential oil on the conidial germination growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. Penz and Sacc and Control of Postharvest diseases in Papaya (*Carica papaya* L.) **Plant pathology**, v.7, p.1-5, 2008.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciososa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.441-443, 1997.
- BENINI, P.C., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., KLAIS, E.C., CRUZ, M.E.S., ITAKO, A.T., MESQUINI, R.M., STANGARLIN, J.R., TOLENTINO JÚNIOR, J.B. Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.677-683, 2010.
- CAMBPELL, C.L.; MADDEN, L. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 1990.
- CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.30, p.1-5, 2008.
- HOASSAIN, M.M.; KHALEQUZZAMAN, K.M.; AMINUZZAMAN, F.M.; MOLLAH, M.R.A.; RAHMAN, G.M.M. Effect of plant extracts on the incidence of seed-borne fungi of wheat. **Journal of Agriculture and Rural Development**, v.3, p.37-43, 2005.
- IQBAL, M.C.M.; MEIYALAGHAN, S.; WIJESEKARA, K.B.; ABEYRATNE, K.P. Antifungal activity from water extracts of some common weeds. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.4, n.7, p.843-845, 2001.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; INFANTE, F.; GÁLVEZ, C.; UBERA, J.L. Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and the chemical composition of *Thymus zygis* essential oils. **Food Science**, v.13, p.341-347, 2007.
- RAM, D. Fungitoxicity of some plants extract against *Alternaria brassicae*. **Annals of Agri Bio Research**, v.2, n.1, p.25-26, 1997.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and L.M Perry against crow rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Let. Applied Microbiology**, v.35, p.208-211, 2002.
- RODRIGUES, E.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; SCAPIM, C.A.; TUTIDA, A. C.G.F. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.28, p.213-220, 2006.
- ROZWALKA, L.C.; MAY DE MIO, L.L.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, p.301-307, 2008.
- SALUSTIANO, M.E.; FERRAZ FILHO, A.C.; POZZA, E.A.; CASTRO, H.A. Extratos de candeia (*Eremanthus erythopappus* (DC) MacLeish) na inibição *in vitro* de *Cylindrocladium scoparium* e quatro gêneros de uredinalis. **CERNE (UFL)**, v. 12, p.189-193, 2006.
- SAS INSTITUTE. **SAS software: user's guide: version 8.2**. Cary: SAS Institute, 2000. 219 p.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extrato vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta (UFPR)**, v.30, n.1-2, p.129-138, 2000.
- SILVA, J.A.; PEGADO, C.M.A.; RIBEIRO, V.V.; BRITO, N.M.; NASCIMENTO, L.C. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.611-616, 2009.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA-CRUZ, M.E.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Antifungal activities of thyme, clove and arécano essential oils. **Journal Food Sfety**, v.27, p.91-101, 2007.
- WILSON, C.L.; SOLAR, J.M.; EL-GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, p.204-210, 1997.