

# **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DE *Lafoensia pacari* SOBRE *Corynespora cassiicola* E *Colletotrichum gloeosporioides*.**

Wagner Vicente Pereira, Marli de Fátima Stradioto Papa, Érika Sayuri Naruzawa. – Agronomia – Agronomia – Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos – Faculdade de Engenharia – Campus de Ilha Solteira

A agricultura atual tem aumentado tanto seu potencial de produção, quanto a aplicação de produtos químicos para o controle de pragas e doenças de plantas. 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 (Kimati et al., 1997). Termos como "agricultura sustentável" ou "agricultura alternativa" presumem expressão política (Zadoks, 1992), estimulando a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas (Bettiol, 1991). Sendo assim a procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, tem ocorrido devido à crescente resistência dos microorganismos patogênicos aos produtos sintéticos.

O Cerrado é um dos mais importantes biomas do País, ocupando 22% do território nacional. Possui muitos tipos fisionômicos de vegetação, conferindo-lhe uma alta biodiversidade. A diversidade química de espécies de plantas de Cerrado pode ser considerada essencial para defesa contra patógenos e conseqüentemente para a sobrevivência dessas plantas, freqüentemente expostas a condições quente e seca, dessa forma, as plantas de Cerrado podem conter valiosos componentes bioativos (BOLZANI et al., 1999). Dentre as espécies típicas do Cerrado, a planta *Lafoensia pacari* St. HIL ou, popularmente, pacari, é uma das que tem ampla utilização pela população local, devendo-se isso ao seu valor medicinal e ornamental.

Naruzawa (2005) estudou a atividade antifúngica de extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de dez plantas do cerrado sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) e Penz. & Sacc e *Corynespora cassiicola* (Berk. e Curtis) Wei. isolados de acerola. Entre essas plantas a autora constatou que os extratos de pacari inibiram mais de 90% o crescimento micelial e 100% da germinação de esporos. Diante destes resultados foi proposto o presente trabalho com o objetivo de se determinar a atividade antifúngica de diferentes partes (folhas, flores e ramos) de pacari sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola*. Deste trabalho será selecionada a parte da planta que fornece a maior concentração de substâncias antifúngicas a estes dois fungos.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, da Faculdade de Engenharia - FE, Unesp, Campus de Ilha Solteira, SP. A coleta das flores, folhas e ramos de pacari foi feita em áreas de Cerrado no município de Selvíria, MS. Os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos e levados para o laboratório. No laboratório, o material foi submetido ao seguinte procedimento: lavagem em água de torneira; desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 10% durante 20 minutos; lavagem em água destilada; pré-secagem em bancada forrada com papel absorvente por 24h e secagem em estufa de fluxo de ar a 45 °C por 96h. Após este período, o material foi moído em moinho de faca e foram preparados os extratos aquosos e hidroetanólicos para cada parte coletada da planta de pacari.

Para obtenção do extrato aquoso, em um béquer foi colocado 20g do material moído e foi vertido sobre este 80g de água destilada fervente, permanecendo 2 horas em repouso, e após foi feita filtragem em funil contendo uma porção de algodão, como elemento filtrante. O filtrado foi recolhido em vidro âmbar e acondicionado em refrigerador à 4 °C.

Para obtenção de extrato hidroetanólico foi colocado em jarra de liquidificador 20g do material vegetal moído e foram vertidos 80g de etanol 70% sobre este. Em seguida foi submetido à turbo extração por 8 minutos e filtragem, como citado para o extrato aquoso. O álcool deste tipo de extrato foi evaporado: para isso, o extrato foi colocado em um béquer e mantido em banho-maria a 45 °C até restar um líquido meio viscoso. Depois o extrato foi ressuspensionado medindo-se com proveta o que restou, completando-se com água destilada o volume que foi evaporado, até obter o volume inicial. O extrato assim obtido foi acondicionado como o extrato aquoso.

Em placas de Petri contendo meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) foram repicadas as culturas de *C. cassiicola* ou *C. gloeosporioides* que foram mantidas em solução salina. As placas

foram mantidas a 25 °C, durante sete dias. Após este período, foram cortados discos com 5 mm de diâmetro, dos bordos da cultura, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo o extrato a ser avaliado.

Utilizaram-se as concentrações de 50%, 30%, 10% e 0% (testemunha) de extrato no meio de cultura de BDA. O extrato foi incorporado no BDA antes da autoclavagem. Cada placa recebeu um disco de BDA com o crescimento micelial de *C. cassiicola* ou *C. gloeosporioides*. Após, as placas foram vedadas e mantidas em estufa incubadora a 25 °C. A avaliação foi realizada por meio da medição do crescimento micelial de *C. cassiicola*, após 13 dias e *C. gloeosporioides*, após 10 dias da instalação do experimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de um fungo, três extratos aquosos, três extratos hidroetanólicos, três concentrações do extrato, testemunha e quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. Este ensaio foi realizado duas vezes utilizando *C. cassiicola* e *C. gloeosporioides*.

Para a produção de esporos foi realizado procedimento semelhante ao usado no item anterior, na obtenção das colônias fúngicas de *C. cassiicola* e de *C. gloeosporioides*. Em seguida, foram acrescentados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, liberando-se os esporos para a água, com auxílio de um pincel. A suspensão de esporos foi filtrada em gaze dupla e a concentração de esporos da suspensão foi determinada, utilizando-se hemacitômetro, e calibrada em  $4 \times 10^5$  esporos mL<sup>-1</sup> para *C. cassiicola* e  $4 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup> para *C. gloeosporioides*.

Em células de placas de ELISA foram pipetadas suspensões de esporos de *C. cassiicola* ou *C. gloeosporioides* e os extratos foram avaliados nas concentrações de 50, 30 e 10% e 0% (testemunha) de extrato a ser avaliado. As placas de ELISA foram acondicionadas em recipiente de plástico, os quais receberam no fundo dois pedaços de papel de filtro umedecido em água destilada esterilizada. Este conjunto foi mantido em estufa incubadora a 25 °C, durante 12 horas. Ao término deste período, foi colocada uma gota de lactofenol, em cada célula da placa de ELISA, para interromper a germinação de esporos. Em microscópio ótico foi feita a contagem de 100 esporos em cada célula, separando-os em esporos germinados e não germinados. Como esporo germinado foi considerado o esporo que apresentou tubo germinativo igual ou maior que a sua largura. Estes dados foram transformados para percentagem de inibição da germinação de esporos em cada tratamento.

O delineamento estatístico e a análise dos dados obtidos foram semelhantes aos utilizados no item anterior, sendo cada repetição uma célula da placa de ELISA. Os dados dos tratamentos foram comparados com a testemunha, calculando-se o Percentual de Inibição do Crescimento micelial (PIC) e o Percentual de Inibição da Germinação de esporos (PIG). Cada ensaio foi repetido duas vezes, utilizando-se o valor médio do PIC e do PIG para a análise estatística. As fórmulas do PIC e do PIG são dadas por:

$$\text{PIC} = [(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] \times 100$$

$$\text{PIG} = [(\text{n}^\circ \text{ de esporos germ. da testemunha} - \text{n}^\circ \text{ de esporos germ. do tratamento}) / \text{n}^\circ \text{ de esporos germ. da testemunha}] \times 100$$

A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC<sub>50</sub>) e a dose letal para inibição de 50% da germinação de esporos (DL<sub>50</sub>) foram estimadas por meio de regressão. Para os dados quantitativos (concentrações) ajustou-se a equação de regressão, e aos dados qualitativos (diferentes extratos) foram aplicados o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verifica-se (Tabela 1) que o extratos hidroetanólicos de flores foi o que proporcionou a maior inibição do crescimento micelial de *C. cassiicola*, com média de inibição de 67%, diferindo dos demais tratamentos. Os extratos hidroetanólico de folhas e aquoso de flores não diferiram entre si, com médias de inibições de 60 e 59%, respectivamente. Foram verificados 38% de PIC de *C. cassiicola* com o extrato aquoso de folhas, diferindo dos demais tratamentos. Constatou-se, ao contrário dos outros tratamentos, estímulo no crescimento micelial de *C. cassiicola* com os extratos hidroetanólico e aquoso de ramos de pacari, os quais diferiram entre si e dos demais tratamentos.

As concentrações dos extratos hidroetanólicos e aquosos de flores, folhas e ramos de pacari efetivas para inibição do crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% (CE<sub>50</sub>) foram estimadas em 9, 12, 11, 31, 75 e 86, respectivamente (Tabela 1).

Os extratos hidroetanólicos e aquosos de flores e folhas de pacari proporcionaram média de 75% de inibição da germinação de esporos de *C. cassiicola* e não diferiram entre si, mas diferiram dos extratos hidroetanólicos e aquosos de ramos, os quais diferiram entre si. Para o extrato hidroetanólico de ramos foi obtido 61% de inibição da germinação de esporos, comportamento intermediário entre os extratos e a menor inibição da germinação de esporos foi verificada para o extrato aquoso de ramos, 44%.

Verificou-se numericamente que os esporos de *C. cassiicola* isolado de acerola, foram mais sensíveis aos extratos que o crescimento micelial para todos os tratamentos testados (Tabelas 1).

Os valores das DL<sub>50</sub> determinadas pelas equações foram semelhantes entre os extratos hidroetanólicos e aquosos de flores e folhas de pacari, cujos valores estimados foram de 5, 6, 6 e 6% respectivamente. Para os extratos hidroetanólicos e aquosos de ramos foram estimados os maiores valores de DL<sub>50</sub> para a germinação de esporos de *C. cassiicola* com 10 e 16%, respectivamente (Tabela 1).

As maiores inibições do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* foram obtidas com os extratos hidroetanólicos e aquosos de flores e folhas de pacari os quais não diferiram entre si, mas diferiram dos extratos de ramos. Para os extratos de flores e folhas foi verificada 59% de inibição na média e para os extratos de ramos esta foi de 5%.

De acordo com a Tabela 1 as CE<sub>50</sub> para inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, para os extratos hidroetanólicos e aquosos de flores, folhas e ramos foram estimadas em 9, 11, 11, 14, 66 e 67%, respectivamente. Observa-se que dos extratos hidroetanólicos de flores e folhas de pacari obtiveram-se os maiores percentuais de inibição da germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, cujos valores estimados foram de 60 e 56%, respectivamente; numa posição intermediária encontram-se os extratos aquosos de flores cujo percentual de inibição foi de 53% e não diferiram do extrato hidroetanólico de folhas. Os menores percentuais de inibição da germinação de esporos foram determinados para os extratos aquosos de folhas e ramos e hidroetanólicos de ramos, respectivamente 46, 11 e 23% de inibição.

**Tabela 1:** Média (considerando as concentrações 10, 30 e 50%) da percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e germinação de esporos (PIG), concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) e dose letal (DL<sub>50</sub>) dos extratos aquosos e hidroetanólicos de flores, folhas e ramos de pacari para inibição de 50% do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Ilha Solteira, SP. 2006.

Tratamento	PIC	PIG	CE <sub>50</sub>	DL <sub>50</sub>
<i>Corynespora cassiicola</i>				
Extrato hidroetanólico de flores	67 a*	75 a*	9**	5**
Extrato hidroetanólico de folhas	60 b	75 a	11**	6**
Extrato aquoso de flores	59 b	75 a	12**	6**
Extrato aquoso de folhas	38 c	74 a	31**	6**
Extrato hidroetanólico de ramos	-2 d	61 b	75**	10**
Extrato aquoso de ramos	-13 e	44 c	86**	16**
CV (%)	6,86	4,39		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				
Extrato hidroetanólico de flores	65 a*	60 a*	9**	10**
Extrato hidroetanólico de folhas	60 a	56 ab	11**	12**
Extrato aquoso de flores	56 a	53 b	11**	12**
Extrato aquoso de folhas	55 a	46 c	14**	16**
Extrato hidroetanólico de ramos	8 b	23 d	66**	75**
Extrato aquoso de ramos	2 b	11 e	77**	81**
CV (%)	9,28	11,2		

\*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, para cada fungo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 1% de probabilidade; \*\*Valores estimados a partir da equação de regressão, em %.

Os extratos hidroetanólico e aquoso de flores e hidroetanólico de folhas apresentaram as menores DL<sub>50</sub> que foram, respectivamente de 10, 12 e 12 %. Numa posição intermediária encontrou-se o extrato aquoso de folhas de pacari cuja DL<sub>50</sub> estimada foi de 16%. Os extratos hidroetanólico e aquoso de ramos de pacari apresentaram as maiores DL<sub>50</sub> que foram de 75 e 81%, respectivamente (Tabela 1).

Baseado nos resultados sobre a inibição da germinação de esporos pode-se observar, que tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. cassiicola*, os extratos hidroetanólicos e aquosos de flores e folhas apresentaram DL<sub>50</sub> abaixo da menor dose testada neste trabalho. Isto indica a presença de maior quantidade de substâncias antifúngicas a esses dois fungos, nestas partes da planta. Para os extratos hidroetanólicos e aquosos de ramos foram estimados os maiores valores de DL<sub>50</sub> para inibição da germinação de esporos de *C. cassiicola* e *C. gloeosporioides*, indicando que nos ramos existem menos substâncias que nas flores e folhas.

Constatou-se também, no presente trabalho que os esporos de *C. cassiicola* e *C. gloeosporioides* isolado de acerola, foram mais sensíveis aos extratos que o crescimento micelial para os tratamentos testados. Este comportamento também foi relatado em trabalho realizado por Naruzawa et al. (2005). Atribui-se isto ao fato de os esporos ficarem imersos na suspensão do extrato, enquanto o micélio cresceu sobre o meio de cultura mais o extrato e parte do crescimento micelial não entrou em contato direto com o extrato vegetal.

Verificou-se ainda que os extratos hidroetanólicos proporcionaram maiores inibições, tanto para o crescimento micelial quanto para a germinação de esporos, demonstrando que o etanol foi o melhor extrator de substâncias antifúngicas em relação a água.

Diante dos resultados obtidos para *C. cassiicola* e *C. gloeosporioides* constata-se que extratos de flores proporcionaram os melhores resultados tanto para o crescimento micelial quanto para a germinação de esporos, porém esses extratos não diferiram significativamente dos extratos de folhas. Na região de Selvíria, MS, a planta de pacari floresce uma vez ao ano, no mês de maio, e com isso, a disponibilidade de flores está restrita a este período do ano. Como não houve diferença significativa entre os extratos de flores e de folhas e considerando-se a maior disponibilidade de folhas de pacari no decorrer do ano, constata-se que esse material seja o mais adequado para o preparo de extratos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, n.2, p.181-187, 1999.

KIMATI, H.; GIMENEZ-FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas – Recomendações por Cultura**, v.1, 2a ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 225p. 1997.

NARUZAWA, E. S. **Atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado sobre *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. (PENZ. & SACC.) e *Corynespora cassiicola* (BERK. E CURTIS.) da acerola (*Malpighia emarginata* D.C.)**. 2005. 46 f. Dissertação (Graduação) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Ilha Solteira.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, v.9, p.151-159, 1992.

**Bolsa:** PIBIC/ CNPq