

## Eficácia *in vitro* do extrato etanólico de Sangra d' Água sobre o fungo *Fusarium oxysporium*

Jéssica Maria Israel de Jesus<sup>1</sup>, Eliane Vieira Rosa<sup>2</sup>, Flávia Oliveira Abrão Pessoa<sup>\*3</sup>, Fabiano Guimarães Silva<sup>4</sup>

### Resumo

O aumento na utilização de agrotóxicos químicos, decorrente da ampliação da agropecuária, resulta em uma produção de curto prazo e massiva, porém é grande a prevalência destes compostos nos produtos vegetais, bem como no ambiente em que são produzidos. Há, portanto, necessidade de pesquisas sobre o potencial de utilização de substâncias naturais no controle de fitopatógenos, como uma alternativa economicamente viável, garantindo-se a sanidade ambiental, dos consumidores e dos produtores. Com o presente trabalho objetivou-se a avaliar *in vitro* o efeito do extrato etanólico da casca do caule de *Croton urucurana* Baillon (Sangra d' Água) como agente inibidor da proliferação do fungo *Fusarium oxysporium*, sendo este responsável por várias patologias em vegetais de grande importância ambiental e comercial. O extrato etanólico de Sangra d' Água foi testado nas concentrações de 0 (testemunha), 100, 200, 300, 400 e 500 mg.L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, sendo I testemunha e de II-VI concentrações do extrato (100, 200, 300, 400 e 500 mg.L<sup>-1</sup>) com dez repetições cada e os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software ASSISTAT 7.7 Beta. O extrato proporcionou uma inibição total do crescimento do fungo, *in vitro*, a partir da concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> nas condições avaliadas.

**Palavras-chave:** Agricultura. Controle alternativo. Fitopatógeno. Fitoquímicos.

## Efficacy *in vitro* of ethanol extract of Sangra d' Água on the fungus *Fusarium oxysporium*

### Abstract

The increase in the use of agrochemicals due to the expansion of agriculture, resulting in a short-term production and massive, but there is a great prevalence of these compounds in plant products, as well as the environment in which they are produced. There is therefore need for research on the potential use of natural substances in the control of plant pathogens, as an economically viable alternative, guaranteeing environmental health, of the consumers and producers. The present study aimed to evaluate *in vitro* the effect of ethanol extract from the bark of *Croton urucurana* Baillon (Sangra d' Água) stem as

<sup>1</sup>Mestranda em Agronomia - Universidade Federal de Goiás / Campus Samambaia.

<sup>2</sup>Docente Orientadora - Instituto Federal Goiano / Campus Ceres.

<sup>3</sup>Docente Coorientadora - Instituto Federal Goiano / Campus Ceres.

\*Autora para correspondência: flavia.abrao@ifgoiano.edu.br

<sup>4</sup>Docente Coorientador - Instituto Federal Goiano / Campus Rio Verde.

Recebido para publicação em 01 de agosto de 2016

Aceito para publicação em 18 de agosto de 2016

an inhibitor of proliferation of the fungus *Fusarium oxysporum*, which is responsible for many diseases in plants of great environmental and commercial importance. The ethanol extract of Sangra d' Água was tested at concentrations of 0 (control), 100, 200, 300, 400 and 500 mg.L<sup>-1</sup>. The experimental design was completely randomized with six treatments, being I control and II-VI extract concentrations (100, 200, 300, 400 and 500 mg.L<sup>-1</sup>) with ten repetitions each, and the results were submitted to Kruskal –Wallis test at 5% significance level. Statistical analyzes were performed with the aid of software ASSISTAT 7.7 Beta. The extract caused a total inhibition of fungal growth *in vitro* at concentrations of 300 mg.L<sup>-1</sup> in the evaluated conditions.

**Keywords:** Agriculture. Alternative control. Phytopathogen. Phytochemicals.

## Introdução

O aumento da população mundial eleva a necessidade do incremento da produção de alimentos. Porém, a prática da agricultura traz como consequência a ocorrência de doenças de plantas em níveis que exigem o seu controle. Nesse sentido, Souza Júnior *et al.* (2009) ressaltam que as fitopatologias têm contribuído significativamente na redução da produção e do fornecimento de alimentos à população.

De acordo com Motoyama *et al.* (2003), o uso de agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais frequente na agricultura. Esta prática apresenta-se como uma alternativa bastante atraente pela sua simplicidade e resultados satisfatórios em curto prazo, porém os aspectos positivos desse sistema são suprimidos com o passar do tempo em função dos problemas decorrentes, tais como: a ocorrência de micro-organismos resistentes, o acúmulo de substâncias nocivas, contaminação do ambiente e do próprio homem, e o desequilíbrio ambiental pela falta de seletividade dos produtos utilizados (TALAMINI; STADNIK, 2004). Diante disso os agricultores têm buscado métodos alternativos para o controle de pragas e doenças (BERNARDO *et al.*, 2002; ZANELLA *et al.*, 2015; PILON *et al.*, 2016).

A utilização de extratos vegetais no controle de fitopatógenos tem recebido destaque pela abundância e diversidade da vegetação brasileira e pelo fácil acesso do produtor rural (DEQUECH *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2010). Além disso, compostos de origem vegetal podem constituir importantes agentes de controle de pragas e micro-organismos patogênicos, pela fácil obtenção e utilização, pelo baixo custo e por minimizarem os problemas apresentados pelos produtos químicos sintéticos (MORAIS *et al.*, 2009; ARAUJO; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2014).

As substâncias químicas extraídas das plantas, normalmente são classificadas em metabólitos primários, que são substâncias necessárias ao desenvolvimento fisiológico destas e possuem relevante função no metabolismo celular básico (TAIZ; ZEIGER, 2004); e em metabólitos secundários, estes por sua vez, são substâncias sintetizadas em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, envolvidos em processos defensivos das plantas e utilizados comercialmente como produtos farmacêuticos, fungicidas, inseticidas e herbicidas (VIVAN, 2005; RAMOS *et al.*, 2015).

Várias espécies vegetais apresentam fitoquímicos com grande potencial para pesquisa. Dentre elas as espécies do gênero *Croton* pertencente à família Euphorbiaceae, com cerca de 800 espécies distribuídas entre as Américas e a Ásia (STEINMANN, 2002), são ricas em terpenoides, flavonoides e alcaloides ativos e várias espécies são conhecidas como plantas medicinais, com atividades anti-inflamatórias, anti-ulcerogênicas, analgésicas e anti-hipertensivas (WANDERLEY *et al.*, 2002; RANDAU *et al.*, 2004).

De acordo com Brum (2006), os fungos do gênero *Fusarium* destacam-se como agentes fitopatogênicos que podem causar danos significativos ao setor agrícola, principalmente por possuírem uma grande gama de hospedeiros, dentre eles: o tomate, o maracujá, o feijão, a soja, entre outras espécies de interesse agrônomo.

Partindo do princípio que os extratos vegetais têm capacidade de atuar como agentes antimicrobianos, objetivou-se estudar o efeito *in vitro* do extrato etanólico de Sangra d' Água (*Crotonu rucurana* Baillon) no controle do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015 nos laboratórios de Bioquímica/Biologia celular e de Microbiologia do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, localizado na zona rural do município de Ceres, Goiás.

### Obtenção dos extratos vegetais

As amostras de cascas do caule de Sangra d' Água foram coletadas em propriedades rurais localizadas na proximidade do município de Rubiataba, Goiás situadas a latitude S 15° 9' 25.98", longitude W 49° 47'24.89". As coletas foram realizadas no período matutino, entre os meses de setembro a outubro de 2014.

No Laboratório de Bioquímica, selecionaram-se as amostras a serem utilizadas, excluindo-se as partes danificadas e deterioradas. Posteriormente as amostras foram levadas para a secagem em estufa de ventilação forçada a 50°C por 48 horas em bandejas de aço inox. As amostras das cascas secas foram submetidas ao processo de percolação em etanol 92,8% por 30 dias em potes de vidro, que foram cobertos com papel alumínio para que a luz não alterasse as características dos compostos químicos durante a fase de percolação. Após o período de percolação, executou-se a filtragem do extrato com camadas de gaze estéril e, posteriormente procedeu-se a evaporação dos extratos em banho Maria a 50°C para a subtração do excesso de etanol e obtenção dos extratos (ROSA *et al.*, 2014).

### Análise da atividade inibitória do extrato sobre o fungo *Fusarium oxysporum*

Para realização da análise microbiológica uma placa purificada de *Fusarium oxysporum* (doação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária unidade Arroz e Feijão - Embrapa). O isolado passou pelo processo de repicagem em meio de cultivo Potato Dextrose Agar (P. D. A) e em seguida as placas foram levadas para a estufa de crescimento bacteriológico (B. O. D) a 27°C ± 2°C, por sete dias.

O extrato etanólico foi pesado em balança de precisão analítica em gramas e solubilizado em etanol 99,5% a fim de diluí-los e vertê-los em Placas de Petri juntamente com alíquotas de 20 mL de P. D. A, em cada placa, com homogeneização de todas as dosagens por movimentos giratórios lentos e repetitivos (Herold, 2006). Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo vertical. Após a solidificação, um disco de 5 mm de diâmetro do micélio dos fitopatógenos, com 7 dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas a 27°C ± 2°C, onde permaneceram por sete dias. Para a testemunha o substrato consistiu somente de meio BDA sem a adição do extrato.

Para o teste microbiológico foram aplicadas cinco concentrações do extrato etanólico de Sangra d' Água (100, 200, 300, 400 e 500 mg.L<sup>-1</sup>) e a testemunha, que continha apenas o meio de cultura sem adição de extrato. A avaliação do crescimento micelial (CM) se deu através da medição do CM da colônia estabelecendo-se a média de duas medidas tomadas em sentido diametralmente opostos até que a testemunha tenha tomado toda a extensão da placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.), foi calculada segundo Edgington *et al.* (1971), onde P.I.C = [crescimento da testemunha – crescimento do tratamento/crescimento da testemunha] x 100. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) composto pelas seis concentrações (0,100, 200, 300, 400 e 500 mg. L<sup>-1</sup>) com dez repetições cada. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A falta de normalidade levou a realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software ASSISTAT 7.7 Beta.

## Resultados e discussão

Na Tabela 1, são apresentados os dados experimentais referentes às medianas do crescimento micelial (C.M) de *Fusarium oxysporum*, e da Porcentagem de Inibição do Crescimento (P.I.C) em função das diferentes concentrações do extrato de Sangra d' Água.

Tabela 1 - Efeito das diferentes concentrações do extrato etanólico de Sangra d'Água sobre o crescimento micelial (C.M.) e a porcentagem de inibição do crescimento (P.I.C.) de *Fusarium oxysporum*

Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> )	C.M (mm)	P.I.C (%)
100	71,8 b	20,2 b
200	47,4 ab	47,3 ab
300	0,0 a	100 a
400	0,0 a	100 a
500	0,0 a	100 a
Testemunha (0)	90,0 b	0,0 b

Nota: Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de KRUSKAL-WALLIS a 5% de significância.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

É possível observar que, a partir da dosagem de 300 mg.L<sup>-1</sup> do extrato etanólico de Sangra d'Água não houve crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (TABELA 1), indicando assim a eficiência do extrato frente ao fungo, a partir da mesma dosagem é possível observar que houve um percentual de inibição de 100% do crescimento do fungo. Venturoso *et al.* (2011) obtiveram redução de 100% no crescimento micelial de *Fusarium solani* utilizando o extrato aquoso de cravo-da-índia na concentração de 20%.

Em estudos semelhantes realizados por Cunico *et al.* (2004), onde avaliou-se o efeito antifúngico de extratos alcoólicos e aquosos de folhas, caules e raízes de *Ottonia martiana* conhecida popularmente por “anestésia” sobre três fitopatógenos (*Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Rhizoctonia sp.*), foi observado que o extrato aquoso de folhas frescas (nas concentrações de 0,102 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,204 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentou inibição (em torno de 10%) sobre *Rhizoctonia sp.*, enquanto que o extrato etanólico inibiu o crescimento dos três fungos em mais de 50% nas concentrações de 0,051 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,102 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,204 mg.mL<sup>-1</sup>.

É possível observar ainda que a dosagem de 100 mg.L<sup>-1</sup> apresentou resultado semelhante a testemunha; indicando que a dosagem não foi suficiente para promover efeito satisfatório no controle do crescimento fúngico.

Amaral e Bara (2005), avaliando a atividade antifúngica de extratos etanólicos de açafreão, coração de negro e óleo essencial de cravo-da-índia, sobre os fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium*

*rolfsii*, observaram que o extrato de “açafreão” inibiu em mais de 50% o crescimento de *R. solani*, porém não apresentaram a mesma eficiência sobre os demais fungos.

Souza *et al.* (2014) avaliaram o extrato etanólico de sementes de *Pachira aquática* que promoveu a inibição do crescimento micelial e esporulação de *Fusarium sp.*, na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>. Por sua vez, Souza; Araújo; Nascimento (2007) constataram que extratos etanólicos vegetais de “alho” e “capim santo”, controlaram *in vitro* o crescimento de *Fusarium proliferatum*.

Diante do observado, várias espécies vegetais apresentam substâncias capazes de inibir o crescimento de *Fusarium sp.*, entretanto as análises fitoquímicas e microbiológicas são sempre necessárias para comprovação destes efeitos, pois em alguns casos os extratos vegetais possuem efeito reverso, promovendo o crescimento dos micro-organismos.

Os resultados encontrados nessa pesquisa contrastam com outros na linha de controle alternativo de fitopatógenos, como os encontrados por Amaral; Bara (2005), que ao utilizarem o extrato etanólico de *Albizia lebbbeck* na concentração de 1% em *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii*, provocaram o estímulo ao crescimento micelial dos fungos, o que permite presumir a existência de alguma substância ativadora deste crescimento no extrato. De acordo com o estudo realizado por Venturoso *et al.* (2011), este mesmo efeito estimulador sobre *Fusarium solani* também foi observado quando utilizado o extrato de “nim” na concentração de 20%.

Há casos em que o extrato vegetal

pode não apresentar efeito significativo sobre determinado micro-organismo, como em estudo realizado por Rêgo *et al.* (2011), onde extratos etanólicos de *Annona crassiflora* não apresentaram efeito no crescimento micelial de *Fusarium solani*, mesmo na maior concentração utilizada (1600 µg.mL<sup>-1</sup>).

### Conclusão

O extrato etanólico de Sangra d' Água, inibe o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*, *in vitro* a partir da concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>.

Respalda-se a importância da continuidade das pesquisas em campo para avaliação *in loco*, para o desenvolvimento de novos métodos de controle de fitopatologias em diversas culturas de interesse agrônômico.

### Agradecimentos

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Ceres pelo apoio na execução dessa pesquisa.

À Embrapa pelo fornecimento do isolado fúngico para os testes microbiológicos.

### Referências

- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.
- ARAUJO, J. L.; OLIVEIRA, E. S.; TEIXEIRA, F. N. Controle alternativo “*in vitro*” de *Sclerotium rolfsii* em girassol (*Helianthus annuus* L.) pelo uso de extratos vegetais e *Trichoderma* spp. **Essentia**, Sobral, v. 15, n. 2, p. 25-35, dez. 2013/maio 2014.
- BERNARDO, R. *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 110, 2002.
- BRUM, M. C. P. **Microrganismos endofíticos da videira Niágara rosada (*Vitis labrusca* L.) e o controle biológico de *Fusarium***. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de pós-graduação integrada da Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2006.
- CUNICO, M. M. *et al.* Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* miq. (piperaceae) sobre três fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 141-3, 2004.
- DEQUECH, S. T. B. *et al.* Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2008.
- EDINGTON, L. V.; KHEW K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- HEROLD, A. C. H. **Investigação do potencial antimicrobiano de extratos etanólicos vegetais**. 2006. 38 f. Monografia (Graduação em tecnologia em processos químicos) - SENAI: Faculdade de Tecnologia Roberto Mange, Anápolis, Goiás, 2006.
- MORAIS L. A. S. *et al.* Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 113-117, 2009.
- MOTOYAMA, M. M. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2, p. 491-496, 2003.
- PILON, A. M.; VISÓTTO, L. E.; SILVA, C. R.; BARROS, R. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Resposta bioquímica e comportamental de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: noctuidae) ao inibidor de Serino Protease Benzamida. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 82-89, 2016.
- RAMOS, R. S. *et al.* Estudo físico-químico e avaliação do potencial larvicida do extrato etanólico das cascas do caule de *Licania macrophylla* Benth. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 1, p. 74-78, 2015.
- RANAU, K. P. *et al.* Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax&Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, p. 89-96, 2004.
- RÊGO, C. M. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de *Annona crassiflora* (Mart.), *Eugenia dysenterica* (DC.) e *Lafoesia pacari* (St. Hil.) sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF: Brazilian Phytopathological Society, 2011. p. 823-823.
- ROSA, E. V. *et al.* Cellular proliferation in the gills of guppies exposed to pequi ethanolic extracts. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 58-70, 2014.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2010.
- SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.
- SOUZA, D. K. *et al.* Potencial fungicida do extrato etanólico obtido das sementes de *Pachira aquática* AUBL. sobre *Fusarium* sp.. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 36 n. 2, p. 114-119, 2014.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

STEINMANN, V. W. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae em Mexico. **Ata Botanica Mexicana Pátzcuaro**, v. 61, p. 61-93, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 45-62, 2004.

VENTUROSO, L. R. *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativo aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WANDERLEY, A. G. *et al.* Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H. B. K. e *Croton rhamnifolioides* PAX & HOFFM. (Euphorbiaceae). **Lecta**. Bragança Paulista, v. 20, n.1, 2002.

ZANELLA, C. S. *et al.* Atividade de óleos e extratos vegetais sobre germinação carpogênica e crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-8, 2015.