

# BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *XYLOPODIA AROMATICA* E *CARYOCAR BRASILIENSE* SOBRE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

Wagner Vicente Pereira<sup>1</sup>; Marli de Fátima Stradioto Papa<sup>2\*</sup>; Juliana Aparecida dos Santos<sup>3</sup>; Rafael Fadel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Universidade de São Paulo - ESALQ/USP, C.P. 9 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.

<sup>2</sup>Depto. de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos - FE/UNESP, C.P. 31 - CEP: 15385000 - Iha Solteira, SP.\*e-mail: marlifsp@bio.feis.unesp.br

<sup>3</sup>Engenheiro agrônomo, mestranda FE/UNESP.

<sup>4</sup>Engenheiro agrônomo, mestrando IAC.

**RESUMO:** A atividade antifúngica de extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de *Xylopia aromatica* (pimenta-de-macaco) e *Caryocar brasiliense* (pequi) foi determinada sobre *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de goiaba. Foram preparados extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas, obtendo-se as concentrações de 10%, 30% e 50% do extrato em relação ao volume total, os quais foram incorporados em meio de cultura ou suspensão de esporos. Foram avaliados o crescimento micelial e a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*. Constatou-se que os extratos de *C. brasiliense* proporcionaram maiores efeitos de inibição no crescimento micelial e na germinação de esporos de *C. gloeosporioides* que os extratos de *X. aromatica*. Os extratos hidroetanólicos extraíram mais substâncias antifúngicas que os extratos aquosos.

**Palavras-chave:** extrato vegetal, controle alternativo, substância antifúngica, atividade antimicrobiana, propriedade antifúngica.

## BIOACTIVITY OF EXTRACT OF *XYLOPIA AROMATICA* AND *CARYOCAR BRASILIENSE* ON *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

**SUMMARY:** The antifungal activity of the aqueous and hydroethanolic extracts from the *Xylopia aromatica* and *Caryocar brasiliense* leaves was determined on *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from guava. Aqueous and hydroethanolic extracts of *X. aromatica* and *C. brasiliense* leaves were prepared and were used in the 10%, 30% and 50% concentration in relation to the volume and incorporated to the medium of culture before the autoclaving or spores suspension. The micelial growth and the spores germination of the *C. gloeosporioides* we evaluated. The *C. brasiliense* extracts offered greater inhibition effects on the micelial growth and on the spores germination of *C. gloeosporioides* compared to *X. aromatica* extracts. The hydroethanolic extracts extracted more antifungal substances than the aqueous ones.

**Key words:** vegetal extract, alternative control, antifungal substance, antimicrobial activity, antifungal property.

## INTRODUÇÃO

A composição química de 99,6% das plantas da flora brasileira, estimada entre 40 a 55 mil espécies, ainda é desconhecida (MING, 1996). O Cerrado é um dos mais importantes biomas do País, ocupa 22% do território nacional, apresenta grande diversidade de espécies, mas somente 1,5% de sua extensão encontra-se protegida por lei, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país (RATTER et al., 1997). Estima-se que cerca de 40% deste bioma já tenha sido devastado. Com isso, o bioma Cerrado deve ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais.

Encontra-se em desenvolvimento no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da FE/ UNESP um projeto de pesquisa que objetiva encontrar em extratos de plantas de Cerrado substâncias antifúngicas a fitopatógenos. Dentre as espécies típicas do Cerrado encontram-se a pimenta-de-macaco (*Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. - Annonaceae) e o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb. - Caryocaraceae), as quais foram utilizadas no presente estudo.

Na medicina popular, *C. brasiliense* é utilizado para tratamento de problemas respiratórios, afrodisíaco, e suas folhas são adstringentes, além de estimular a produção da bÍlis (ALMEIDA & SILVA, 1994; BRANDÃO et al., 2002). Atividade antifúngica de extratos de *C. brasiliense* foram constatadas sobre *Corynespora cassiicola* Berk. e Curtis e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Penz. & Sacc.) isolado de acerola (NARUZAWA, 2005).

*Xylopia aromatica* é uma planta semidecídua, heliófita, pioneira e seletiva xerófila. As sementes apresentam características carminativa, eupética e afrodisíaca. As sementes e a tintura da casca do caule são também empregadas como excitante, caminativa e afrodisíaca (LORENZI, 1992). Não foram encontradas informações sobre sua atividade antimicrobiana.

Este trabalho objetivou determinar a

atividade antifúngica de extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de *Xylopodia aromatica* e *Caryocar brasiliense* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de goiaba, por meio de avaliações das inibições do crescimento micelial e da germinação de esporos.

## MATERIALE MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, da Faculdade de Engenharia - FE, UNESP, Campus de Ilha Solteira, SP.

A coleta das folhas de *C. brasiliense* e de *X. aromatica* foi feita em áreas de Cerrado no município de Selvíria, MS, na posição geográfica de 20°25'16" Sul e 51°20'43" Oeste. Os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos e levados para o laboratório. No laboratório, cada material foi submetido aos seguintes procedimentos: 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 24 h e secagem em estufa de fluxo de ar a 45 °C por 96 h. Após este período, o material foi moído em moinho de faca e foram preparados os extratos aquosos e hidroetanólicos de cada planta.

Para obtenção dos extratos aquosos, em um béquer foram colocados 20 g do material moído e foi vertido sobre este 80 g de água destilada fervente, permanecendo duas 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, identificado e acondicionado em refrigeradora a 11 °C.

Para obtenção dos extratos hidroetanólicos foram colocados em jarra de liquidificador 20 g do material vegetal moído e foram vertidos 80 g de etanol 70% sobre este. Em seguida foi submetido à turbo extração por oito minutos e filtragem, como citado para o extrato aquoso. O álcool deste tipo de extrato foi evaporado, para que não houvesse interferência do álcool sobre o fitopatógeno.

Para isso, o extrato foi colocado em um béquer e foi mantido em banho-maria, a 45 °C, até restar um líquido viscoso. Depois, o extrato foi ressuspenso 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.

A partir de goiaba com sintomas de Antracnose (*C. gloeosporioides*) foram realizados isolamentos diretos (TUIE, 1969) do fitopatógeno para meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). A cultura fúngica obtida foi preservada em tubo de ensaio contendo solução salina (CASTELANI, 1939) e mantida a 11 °C.

Determinação da inibição do crescimento micelial: Em placas de Petri contendo BDA foi repicada a cultura de *C. gloeosporioides* que foi mantida em solução salina. Estas placas foram mantidas em estufas incubadoras 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 meio de cultura (BDA mais 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 meio BDA antes da autoclavagem. Cada placa de Petri, contendo BDA mais o extrato, recebeu um disco de BDA com o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Após, as placas foram vedadas e mantidas em estufa incubadora a 25 °C no fotoperíodo 12 horas de claro / escuro. A avaliação foi realizada por meio da medição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, após 10 dias da instalação do experimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois extratos aquosos, dois extratos hidroetanólicos, três concentrações, testemunha e quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram transformados em percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) em relação ao tratamento

testemunha. Este ensaio foi realizado duas vezes e utilizaram-se as médias dos dados na análise estatística.

Determinação da inibição da germinação de esporos: Para a produção dos esporos foi realizado procedimento semelhante ao usado na obtenção da colônia fúngica. 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  $4 \times 10^4$  esporos mL<sup>-1</sup>.

Em células de placas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foram pipetadas 40 µL da suspensão de esporos de *C. gloeosporioides* e 40 µL do extrato, de modo a se obter as concentrações de 50%, 30%, 10% e 0% (testemunha) de extrato. 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 48 horas. Ao término deste período, uma gota de lactofenol foi colocada em cada célula, 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 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 (PIG) em relação ao tratamento testemunha.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois extratos aquosos, dois extratos hidroetanólicos, três concentrações, testemunha e oito repetições. Cada repetição foi constituída por uma célula da placa de ELISA. Este ensaio foi realizado duas vezes e utilizaram-se as médias dos dados na análise estatística.

Foram utilizadas as médias dos valores

do PIC e PIG dos dois ensaios realizados. A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC50) e a dose letal para inibição de 50% da germinação de esporos (DL50) foram estimadas por meio de análise de regressão, utilizando o programa SANEST (ZONTA & MACHADO, 1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações efetivas para a inibição de 50% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (EC50) para os extratos hidroetanólico e aquoso de *C. brasiliense*

foram de 24% e 34%, respectivamente, e para os extratos hidroetanólico e aquoso de *X. aromatica* foram de 13% e 43%, respectivamente (Tabela 1). As doses letais para inibição de 50% da germinação dos esporos para os extratos hidroetanólico e aquoso de *C. brasiliense* (DL50) foram de 9% e 11% respectivamente, e para os extratos hidroetanólico e aquoso de *X. aromatica* foram de 19% e 26% (Tabela 1). Com estes resultados, considera-se que estes extratos apresentam substâncias que retardam o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, mas em baixa concentração.

**Tabela 1.** Concentração efetiva dos extratos de folhas de *Caryocar brasiliense* e de *Xylopia aromatica* para inibição de 50% do crescimento micelial (CE50) e dose letal para inibição de 50% da germinação de esporos (DL50) de *Colletotrichum gloeosporioides*. Ilha Solteira, SP. 2006.

Tratamento	Equação de regressão para determinação da CE 50	R <sup>2</sup>	CE 50 (%)	Equação de regressão para determinação da DL <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	DL 50 (%)
EHCB <sup>1</sup>	$y = 0,568x + 36,35$	0,99	24 *	$y = 0,868x + 42,27$	0,96	9*
EACB <sup>2</sup>	$y = 0,712x + 25,54$	0,96	34	$y = 0,575x + 43,40$	0,95	11
EHXA <sup>3</sup>	$y = 0,256x + 46,72$	0,75	13	$y = 0,600x + 38,50$	0,96	19
EAXA <sup>4</sup>	$y = 0,968x + 8,77$	0,93	43	$y = 0,550x + 35,83$	0,99	26

\*Valores calculados a partir da equação de regressão e expresso em % do extrato em relação ao volume.

<sup>1</sup>Extrato hidroetanólico de *C. brasiliense*,

<sup>2</sup>Extrato aquoso de *C. brasiliense*,

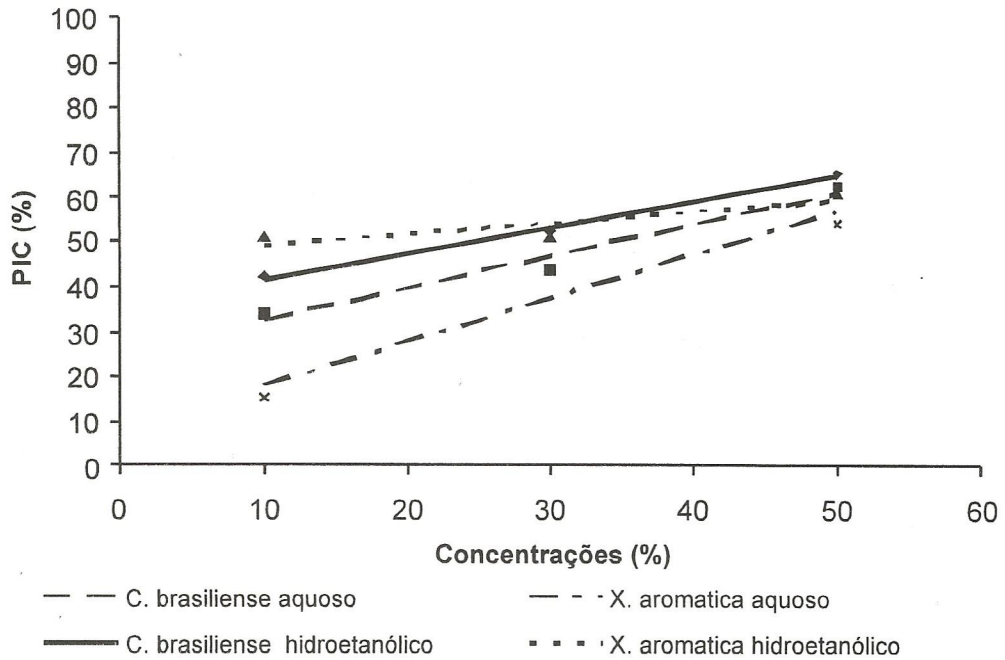
<sup>3</sup>Extrato hidroetanólico de *X. aromatica*,

<sup>4</sup>Extrato aquoso de *X. aromatica*.

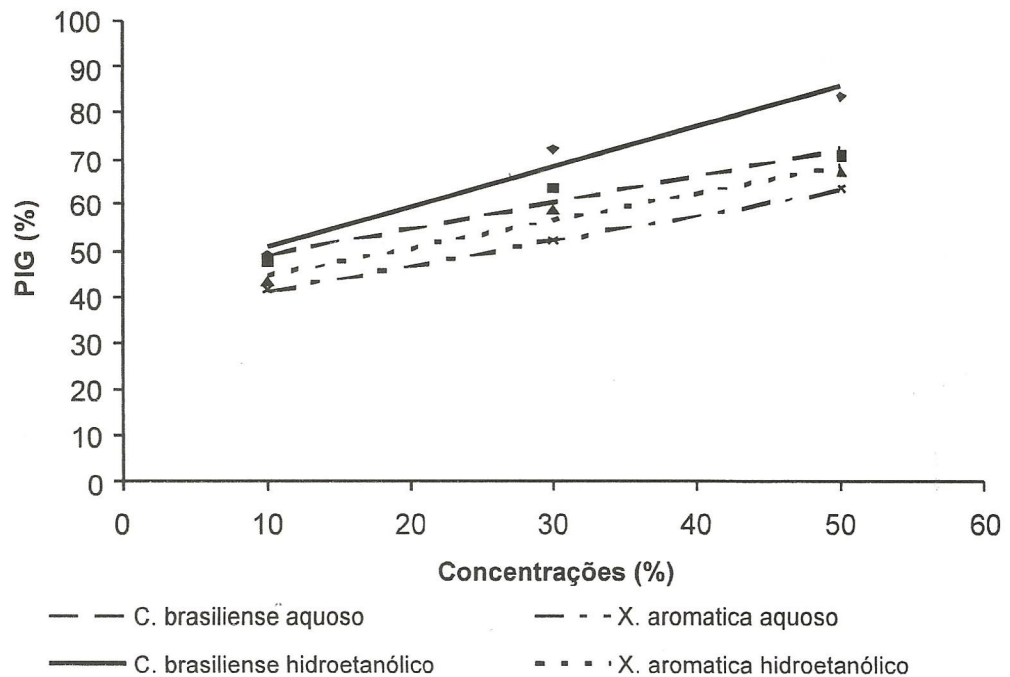
Quando se determinou o ajuste da equação de regressão para os extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de *C. brasiliense* e de *X. aromatica*, verificou-se a significância em todos os tratamentos,

demonstrando o efeito linear das concentrações dos extratos de *C. brasiliense* e *X. aromatica* sobre o PIC e o PIG de *C. gloeosporioides* (Figuras 1 e 2).

**Figura 1.** Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (PIC) e concentrações (%) dos extratos hidroetanólicos e aquosos de folhas de *Caryocar brasiliense* e *Xylopia aromatica*. Ilha Solteira, SP. 2006.



**Figura 2.** Percentagem de inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (PIG) e concentrações (%) dos extratos hidroetanólicos e aquosos de folhas de *C. brasiliense* e *X. aromatica*. Ilha Solteira, SP. 2006.



À medida que houve o aumento das concentrações dos extratos verificaram-se reduções no crescimento e na germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, o que presumidamente se deve ao fato de que as substâncias antifúngicas presentes nos extratos, responsáveis pela inibição do crescimento micelial e da germinação dos

esporos, tiveram a sua concentração aumentada. De acordo com Ribeiro & Bebendo (1999) e Thangavelu et al. (2004), o grau de inibição *in vitro* está diretamente correlacionado com a concentração de extratos de plantas em meio de BDA, à medida que se aumenta a concentração dos extratos, aumentam-se as inibições do crescimento fúngico e da germinação de esporos.

Entre os extratos das duas plantas, os extratos de *C. brasiliense* apresentaram maior atividade antifúngica que os extratos de *X. aromatica*. Segundo Sousa et al. (2002), extratos etanólicos de folhas de *C. brasiliense* apresentaram ação sobre isolados de dermatófitos. O extrato bruto etanólico das folhas de *C. brasiliense* mostrou-se com atividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, agente causal de micoses oportunistas na pele humana. Além disso, a fração de acetato de etila, obtida a partir do extrato bruto etanólico de folhas e dos dois componentes majoritários, presentes nos óleos essenciais dos frutos de *C. brasiliensis*, demonstraram que a fração possui elevada atividade antifúngica (PASSOS et al., 2002).

Foi observado que os esporos de *C. gloeosporioides* isolado de goiaba, foram mais sensíveis aos extratos que o crescimento micelial para os tratamentos testados. Este comportamento também foi relatado em trabalhos realizados por Celoto (2003) e Naruzawa et al. (2005). Atribui-se isto ao fato de que os esporos ficam 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 sobre o crescimento micelial quanto sobre a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, demonstrando que o etanol foi o melhor extrator de substâncias antifúngicas em relação à água. Assim, extratos de *X. aromatica* e de *C. brasiliense* apresentam substância(s) com atividade antifúngica e merecem mais estudos.

## CONCLUSÕES

\*Os extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de *Caryocar brasiliense* e *Xylopia aromatica* apresentam substância ou substâncias antifúngicas, com atuação sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de *C. gloeosporioides* da goiaba;

\*Quanto maior a concentração dos extratos, maior a inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *C. gloeosporioides* isolado de goiaba;

\*A germinação de esporos de *C. gloeosporioides* é mais afetada que o crescimento micelial, quando submetido aos extratos de *C. brasiliense* e *X. aromatica*;

\*O extrato de *C. brasiliense* apresentou a maior concentração de substância(s) antifúngica a *C. gloeosporioides* de goiaba;

\*Os extratos hidroetanólicos, independentemente da planta, apresentam mais substâncias antifúngicas que os extratos aquosos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p. (Documentos, 54).

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.

CASTELANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.42, p.225, 1939.

CELOTO, M.I.B. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Penz. & Sacc.). Ilha Solteira: UNESP/Campus de Ilha Solteira 2003. p.44p. (Trabalho de graduação em

Agronomia)

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

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

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.). Ilha Solteira: UNESP/Campus de Ilha Solteira 2005. p.46p. (Trabalho de graduação em Agronomia).

PASSOS, X.S.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. Annals of Botany, v.80, p.223-230, 1997.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P.; Inhibitory effect of plant extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* - the causal agent of postharvest rot in papaya fruits. Scientia Agricola, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. Brazilian Journal of Microbiology, v.33, p.247-249, 2002.

THANGAVELU, R.; SUNDRARAJU, P.; SATHIAMOORTHYS, S. Management of

anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, v.79, n.4, p.664-668, 2004.

TUITE, J. Plant pathological methods. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969. 239p.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. Sanest - Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1995. 48p. (SEI n.066060, Categoria A).

