

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO AQUOSO DE *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (ASTERACEAE)

Thiago Ferreira Pacheco¹, Michele Soares Tacchi Campos¹, Alex Sandro Oliveira Santana¹, Valdenir José Belinelo², Silvia Amaral Pimenta de Pádua³

belinelo@pq.cnpq.br

Universidade Federal do Espírito Santo

¹ Bolsistas de Iniciação Científica do CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

^{2*} Doutor, Professor do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES. E-mail:

belinelo@pq.cnpq.br

³ Mestre, CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, ES.

Data de recebimento: 02/05/2011 - Data de aprovação: 31/05/2011

RESUMO

Foi avaliada a atividade do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, causador da podridão pós-colheita da banana, *Penicillium* sp, indutor da podridão pós-colheita em frutos de laranja, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, associado à podridão-radicular do feijoeiro e *Fusarium solani* f. sp. Piperis Alb., responsável pela fusariose da pimenta-do-reino. Obtido por turboextração de folhas secas e posterior liofilização, o extrato aquoso foi submetido à técnica de diluição em microplacas de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O material dos poços onde não foi observado crescimento fúngico foi replicado para placas com agar Sabouraud dextrose, para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Através dos testes foi verificado que o extrato aquoso de *Emilia sonchifolia* possui propriedade antifúngica em relação à *Colletotrichum musae* e *Fusarium solani* sp., com CIM de 15,6 µg/mL e 125,0 µg/mL, respectivamente. Nas concentrações de até 1000 µg/mL, este extrato não apresentou atividade contra *Penicillium* sp. Os dados obtidos indicaram a presença de constituintes ativos no extrato aquoso de *E. sonchifolia*, revelando um potencial efeito antifúngico para três espécies testadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Emilia sonchifolia*, Fungicida, *Colletotrichum musae*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp.

IN VITRO EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae)

ABSTRACT

Was evaluated the antifungal activity of lyophilized aqueous extract from leaves of *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) in growth inhibition of *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, inductor of postharvest rot of banana, *Penicillium* sp, that causes postharvest rot in citrus fruits, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, which causes root rot

of bean and *Fusarium solani* f. sp. Piperis Alb., associated to fusariosis of black pepper. The lyophilized extract obtained by turboextraction of dried leaves was submitted to dilution technique in 96-well microplate to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Then, from the well where no fungal growth was observed, the material was replicated to plates with Sabouraud dextrose agar medium to find the minimum fungicidal concentration (CFM). Through the tests was verified that the aqueous extract of *E. sonchifolia* have antifungal properties in relation to *Colletotrichum musae* and *Fusarium* sp., with MIC of 15.6 µg/mL and 125 µg/mL, respectively. In concentrations up to 1000 µg/mL, the aqueous extract was inactive against *Penicillium* sp. The obtained results indicated the presence of active constituents in the aqueous extract of *E. sonchifolia* revealing potential antifungal effect for the three species tested.

KEYWORDS: *Emilia sonchifolia*, Fungicide, *Colletotrichum musae*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Valdenir José Belinelo
Rua Pedro Geraldino, 613, Bairro Park Washington, São Mateus, ES,
CEP 29938-050 - Telefone: (27) 81425289
E-mail: belinelo@pq.cnpq.br ou belinelo1@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Na agricultura, os fungos *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx são os responsáveis pela podridão pós-colheita da banana, o *Penicillium* sp é o causador da podridão pós-colheita em frutos de laranja (ZAMBOLIM et al., 2002), o *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli é o agente da podridão-radicular do feijoeiro (MIRANDA et al., 2007; EPAMIG 2010) e o *Fusarium solani* f. sp. piperis está associado à fusariose da pimenta-do-reino.

A participação brasileira no mercado internacional de banana ainda é relativamente pequena, embora seja o segundo produtor mundial. Por diversos fatores, entre eles o volume de perdas em pós-colheita no país, estimado em 1,98 milhões de toneladas/ano, que corresponde a 30% da produção nacional (BENATO, 1999). As principais perdas em pós-colheita são decorrentes de inúmeros fatores físicos, fisiológicos e microbiológicos (PESSOA & OLIVEIRA, 2006).

No que diz respeito à patologia pós-colheita, os fungos são responsáveis pela maioria das doenças que afetam a banana. Entre essas doenças, destacam a antracnose, a podridão-da-coroa, a podridão-de-charuto e podridão-por-*Lasiodiplodia* (PESSOA & OLIVEIRA, 2006). As perdas são significativas, principalmente na comercialização de bananas maduras, acarretando sérios prejuízos para os mercadistas e consumidores. Dentre as doenças citadas, as lesões de antracnose em banana, causadas por *Colletotrichum musae*, representam o mais grave problema que ocorre pós-colheita dessa fruta. Embora os efeitos sejam notados somente durante esse período, o problema inicia no campo, na ocasião em que os conídios produzidos em folhas velhas, bem como em restos culturais e florais, são liberados por meio da água de chuva ou pela irrigação e disseminados por ventos e insetos (ZAMBOLIM et al., 2002).

As tecnologias disponíveis que permitem aumentar a vida pós-colheita, estender o período livre desta doença e manter a qualidade dos frutos são a quimioterapia e refrigeração (LABAVITCH, 1998). Os fungicidas tiabendazol, tiofanato metílico e prochloraz constituem a principal forma de controle da maioria das doenças em pós-colheita que acometem muitos frutos. Entretanto, a forma de aplicação e o surgimento de patógenos resistentes têm limitado o uso dos atuais quimioterápicos. Desse modo, vários métodos para o controle de doenças, como físicos, biológicos e alternativos onde são utilizados óleos essenciais e extratos de plantas, vem sendo estudados para minimizar ou substituir o uso de fungicidas (BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004; CIA et al., 2007).

A pimenta-do-reino foi introduzida no Norte do Espírito Santo e Sul da Bahia como fonte alternativa para melhorar a renda dos pequenos e médios produtores agrícolas que associada às culturas da mandioca, feijão, café conilon e da banana garantem a fixação no campo e a sobrevivência de muitos agricultores.

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira, pertencente à família Piperaceae. Ela é originária do Sudeste Asiático, mais precisamente da Índia, sendo a mais comum e importante das especiarias (COSTA & MEDEIROS, 2000). É uma das espécies que apresenta um curto período de imaturidade, iniciando a produção comercial a partir do segundo ano. No entanto, a pimenta-do-reino é muito suscetível ao fungo *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb., que é responsável por grandes danos as plantas, reduzindo o período útil de exploração desta cultura para apenas quatro anos. De forma similar ao que ocorre com as frutíferas, o uso intensivo dos fungicidas metalaxyl, mancozeb, fosetil-Al ou de derivados cúpricos leva a restrição para exportação do produto, e com isso, o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle da fusariose tem sido proposto (BENCHIMOL et al., 2008).

A *Emilia sonchifolia* (L.) DC., espécie da família Asteraceae, popularmente conhecida por “falsa-serralha”, “pincel”, “pincel de estudante” e “serralha-brava”, é uma erva anual, ereta, pouco ramificada, medindo de 30 a 60 cm de altura, com folhas membranáceas dispostas de maneira rosulada e flores vermelhas dispostas em capítulos. É uma espécie que se multiplica apenas por sementes. Embora seja originária na Ásia tropical tornou-se bem adaptada às condições climáticas de todo o território brasileiro, passando a ser considerada como uma planta daninha. Através de estudos fitoquímicos foram encontrados em *Emilia sonchifolia* alcalóides pirrolizidínicos com propriedades tumorogênicas (FU et al., 2002; LORENZI & MATOS, 2008).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato aquoso liofilizado obtido de folhas de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) em relação aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, *Penicillium* sp, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli e *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal. *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) foi coletada no Horto de Plantas Medicinais do Centro Comunitário Franco Rossetti, Pedro Canário, ES. As folhas foram lavadas, secadas em estufa com ventilação forçada à temperatura de 40 ± 5 °C, e posteriormente moídas e armazenadas em recipiente de vidro hermeticamente fechado.

Obtenção do extrato e triagem farmacognóstica. Para obtenção do extrato aquoso, o pó de *Emilia sonchifolia* (25 g) foi triturado com água destilada (250 mL), em liquidificador industrial turboextrator, durante 30 minutos, com intervalos de 5 minutos. A solução resultante foi filtrada em tecido de malha fina (*voil*), depois em papel de filtro e, novamente em papel de filtro inserido em funil de Buchner acoplado a kitassato, neste caso sob pressão reduzida. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, refrigerado a -30 °C e posteriormente liofilizado durante 72 horas, fornecendo o extrato aquoso de *Emilia sonchifolia* (EAES) [2,1214 g (8,5%)]. A triagem farmacognóstica do extrato EAES para detecção das classes químicas: saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cardíacos, esteróides, triterpenóides e carotenóides, foi realizada conforme a literatura (BARBOSA, 2004).

Ensaio antifúngico. Os testes biológicos foram realizados por microdiluição em caldo Sabouraud dextrose conforme metodologia padrão para fungos por microdiluição (NCCLS, 2002). O inóculo foi preparado com cepas recentes de *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, *Penicillium* sp, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli e o *Fusarium solani* f. sp. Piperis Alb. mantidas em agar Sabouraud dextrose a 28 ± 2 °C por 48h. O inóculo foi preparado em solução salina, cuja suspensão foi padronizada pelo tubo 0,5 na escala Mc Farland, para se obter suspensão com $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ esporos/mL. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, partindo da concentração inicial de 1000,0 µg/mL até a final de 3,9 µg/mL de EAES, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para garantir a ausência de contaminantes ou a ineficiência do meio para o crescimento fúngico, os três últimos poços foram destinados ao controle do meio, do EAES e do fungo em questão. O experimento foi realizado em quintuplicata com incubação a 28 ± 2 °C por 60h para determinação da CIM. A concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada em placas após leitura do CIM nos poços onde não foi observado crescimento fúngico. O controle positivo foi realizado com cetoconazol com concentração de 50,0 µg/mL.

A análise estatística foi realizada utilizando teste de análise de variância, considerando significativos os valores para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica do extrato das folhas de *Emilia sonchifolia* (Asteraceae) indicou a presença de mucilagem, cumarinas, cromonas, xantonas, alcalóides, flavonóides e saponinas.

Desde 1882, quando Pierre-Marie-Alexis Millardet introduziu a calda bordalesa como fungicida no controle de pragas agrícolas, os pesquisadores procuram por novas substâncias, tanto por via sintética como por meio de obtenção

de extratos de plantas e microrganismos, para vencerem a resistência adquirida pelos fungos aos produtos em uso na agricultura. As plantas por meio do metabolismo secundário produzem substâncias que estão relacionadas ao seu mecanismo de defesa, em resposta ao ataque por predadores como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (BARBOSA, 2004; FENNER et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Através dos resultados obtidos dos testes com extrato aquoso de *Emilia sonchifolia* verificou-se atividade inibitória do crescimento do fungo *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx e *Fusarium solani* sp., com CIM igual a 15,6 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente (Tabela 1). Nas concentrações de até 1000 µg/mL, o EAES não apresentou atividade contra o *Penicillium* sp.

TABELA 1. Resultados dos testes de avaliação pelo método de placas de microdiluição da atividade do extrato aquoso de *Emilia sonchifolia*. (Asteraceae) contra fungos fitopatogênicos

Substância (µg/mL)	<i>Colletotrichum musae</i>		<i>Penicillium</i> sp		<i>Fusarium solani</i> f. sp. Phaseoli		<i>Fusarium solani</i> f. sp. piperis	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Controle ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle ²	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato ⁴	15,6	31,2	+	+	125,0	125,0	125,0	125,0
Cetoconazol ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Controle do extrato/droga; ²Controle microorganismo; ³Controle caldo Sabouraud; ⁴Extrato aquoso nas concentrações 1000 a 3,9 µg/mL; ⁵Controle antifúngico 50 µg/mL; (-) Ausência de crescimento microbiano, (+) Crescimento microbiano.

PINHO et al. (2010) no estudo com várias cultivares de bananeira mostra que todas são susceptíveis à antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum musae*, o que exige aplicações de fungicidas durante todo o processo de produção. Este fato também foi observado com a podridão da laranja e do feijoeiro e com a fusariose da pimenta-do-reino, cujos fungos acabam adquirindo resistência (ZAMBOLIM, 2002; MIRANDA et al., 2007).

Na perspectiva de obter novos agentes antifúngicos, SCHARMA E TRIPAHI (2006), observaram que o óleo de *Citrus sinensis* na concentração de 3,5 µg/mL foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial do *Aspergillus niger* após 7 dias de exposição. OLIVEIRA et al. (2010) estudaram a atividade antifúngica de extratos obtidos de 49 cepas de *Streptomyces spp.* isolados de solos paraibanos. REGASINI et al. (2010) na pesquisa com extratos da planta *Pterogyne nitens* Tul. observaram que as frações extraídas com butanol apresentaram atividade antifúngica com CIM a partir de 15,6 µg/mL para fungos *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*.

Extratos vegetais têm sido bastante utilizados na agricultura de forma ecologicamente correta, fazendo parte da chamada agricultura orgânica. Dentre estes, citam-se os extratos de cavalinha (*Equisetum pyramidale* Goldm.), nim (*Azadirachta indica* A. Juss), urtiga (*Urtiga dioica* L.) e de alho (*Allium sativum* L.)

utilizados no controle de pragas agrícolas (ABREU JÚNIOR, 1998; HAMERSCHMIDT, 1999; DEFFUNE, 2001; SANTOS et al., 2010). Este trabalho corrobora a necessidade de se continuar buscando substâncias antifúngicas na flora brasileira.

CONCLUSÕES

O extrato aquoso das folhas de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) apresentou atividade antifúngica significativa ($p < 0,05\%$) em relação às espécies *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli e o *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPES, CAPES e UFES (PROEX e PRPPG) pela concessão de bolsas e suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU JUNIOR, H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura**: coletânea de receitas. Campinas: EMOPI, 1998. 115 p.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa, UFV, 2004. 215p.

BARBOSA, W. L. R. (Org.). Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais **Revista Científica da UFPA**, Belém, <http://www.ufpa.br/rcientifica>, v. 4, 2004.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 90-93, 1999.

BENCHIMOL, R. L.; SILVA, C. M.; VERZIGNASSI, J. R. **Utilização de substâncias naturais para o controle de doenças de plantas na região amazônica**. Embrapa Amazônia Oriental: Boletim Técnico 346. 2008, 27 p.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. Indução de resistência no manejo pós-colheita. In: RODRIGUES, F. A. e ROMEIRO, R. (eds.) **Indução de resistência de plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 245-280.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39. 1999.

COSTA, R. S. C.; MEDEIROS, I. M. **Pimenta-do-reino**. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2000. 6 p. (EMBRAPA Rondônia, Folder).

DEFFUNE, G. Fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal: a explicação dos defensivos naturais. **Agroecologia Hoje**, v. 6, p. 6-7, 2001.

EPAMIG. **Guia técnico** - produção de feijão. Epamig, 2010, 52p.

FENNER R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FU, P. P.; YANG, Y. C.; XIA, Q.; CHOU, M. C.; CUI, Y. Y.; LIN G. Pyrrolizidine alkaloids-tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 4, p. 198-221, 2002.

HAMERSCHMIDT, I. **Manejo de pragas e doenças em sistemas orgânicos**. Curitiba: EMATER, 1999. 17p.

LABAVITCH, J. M. Fruit ripening and defense against pathogens-loss of resistance or gain of susceptibility. In: JOHNSON, G.; HIGHLEY, E.; JOYCE, D. C. (Eds.). **Disease resistance in fruit**. Australia: ACIAR, v. 80, 1998. p. 53-59.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008, 576p.

MIRANDA, B. A.; LOBO JÚNIOR, M.; CUNHA, M. G. Reação de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 4, p. 221-226, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. v. 22, n. 15, p. 14-42, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M38-A**. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos. v. 22, n. 16, p. 1-50, 2002.

OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; SOUZA, I. A.; CORNEJO, L. C. Z. Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 60-64, 2010.

PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças da banana. In: OLIVEIRA *et al*, **Patologia pós-colheita: Frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 540-553.

PINHO, D. B.; MIZOBUTSI, E. H.; SILVA, S. O.; REIS, S. T.; MIZOBUTSI, G. P.; XAVIER, A. A.; RIBEIRO, R. C. F.; MAIA, V. M. Avaliação de genótipos de bananeira à *Colletotrichum musae* em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 786-790, 2010.

REGASINI, L. O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L. BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

SANTOS, M. B.; SANTOS, C. Y.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. R. S.; SANT'ANNA, H. L. S.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. Efeito inibitório *in vitro* de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 13-17, 2010.

SCHARMA, N.; TRIPAHI, A. Effects of *Citrus* (L) Osbeck epicarp essencial oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2006.

SILVA, L. L. S.; LIMA, E. O.; NASCIMENTO, S. C.; MOTA, D. L.; SILVA, N. H.; ALMEIDA, E. R.; SILVA, M. G. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.. **Controle de doenças de plantas: Fruteiras**. Viçosa, UFV, 2002. v. 2. 1313p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.. **Controle de doenças de plantas: Fruteiras**. Viçosa, UFV, 2002. v. 1. 674p.