

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

DETECÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS EM PLANTAS E CARACTERIZAÇÃO DE SEU POTENCIAL CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

¹Clarissa de Mello Braga Silveira Bianco (IC-UNIRIO); ¹Alyne Bispo Rodrigues (Voluntário- IC); ¹Denise Espellet Klein (colaboradora); ¹César Luis Siqueira Junior (orientador).

1- Instituto de Biociências (IBIO), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro;

Apoio financeiro: UNIRIO, FAPERJ, NuPSA

Palavras-chave: antifúngico; extratos vegetais; agricultura

INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios atuais dos produtores agrícolas é a redução das perdas na produção resultantes da atividade de patógenos. Os fungos, por exemplo, provocam mais doenças que qualquer outro grupo de praga de plantas (ELLIS et al, 2008). Espécies de *Fusarium* sp. incluem importantes fitopatógenos, causadores de murchas, podridões, morte de plântulas, aborto de flores, podridões de armazenamento e outras doenças. Existem vários registros de ocorrência em muitas culturas encontradas no Brasil, representadas por: *Abelmoschus esculentus* (quiabo), *Allium cepa* (cebola), *A. sativum* (alho), *Oryza sativa* (arroz), assim como as espécies *Carica papayae* (mamão) e *Capsicum annum* (pimentão) que são amplamente produzidas no Brasil, também sensíveis ao ataque de fungos no solo (MENDES et al., 1998). O gênero *Fusarium* completa um amplo campo de fungos distribuídos por todo o mundo que apodrece raízes e caules em várias espécies de plantas (LUGENBUHL, 2010). O fungo *Fusarium oxysporum* é um saprófito abundante e ativo no solo e da matéria orgânica, com algumas formas específicas, que são patogênicos de plantas (SMITH et al., 1988). *Fusarium solani* é uma das poucas espécies de *Fusarium* que são encontrados em vários tipos de solo, de florestas tropicais. São observados em campos úmidos e áreas temperadas. Este fungo é considerado um fitopatogênico que atinge um número diversificado de plantas hospedeiras, como as leguminosas e outras plantas tropicais (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Outro importante patógeno é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador de antracnose em uma gama de frutíferas de importância nacional, dentre estas o mamão e o pimentão. Nesse caso, durante o período denominado pós-colheita, os produtos não manipulados corretamente ou não tratados com inibidores microbianos eficientes, perdem a qualidade se tornando não propícios para o consumo e comercialização (SILVEIRA et al, 2005). Nos últimos anos, os fungicidas sintéticos foram usados, como maior forma de prevenção de doenças em vegetais. Apesar dos benefícios agrícolas os fungicidas são nocivos ao Homem, que os consomem juntamente com os vegetais tratados. Muitos desses compostos têm sido descritos por sua ação teratogênica (UNNIKRISHNAN E NATH, 2002). Em consequência, há uma crescente pressão da sociedade no sentido da redução da aplicação desses compostos na agricultura. Uma das mais promissoras técnicas contra as doenças é a aplicação de biopesticidas na forma de compostos sintetizados naturalmente em algumas plantas. Alguns desses compostos são descritos por atuar diretamente sobre o patógeno, ou ainda sobre a planta hospedeira, por estimular os mecanismos naturais de resistência da mesma (AGRIOS, 2005). Diversos grupos de pesquisa têm voltado a atenção para a busca de plantas que possuem atividade antimicrobiana (RIBEIRO E BEDENDO, 1999; LOPES et al., 2005; SIQUEIRA-JUNIOR et al. 2011; 2012). Nesse trabalho utilizamos duas plantas largamente distribuída no Estado do Rio de Janeiro: o Saboeiro (*Sapindus saponaria*) a Pata de Vaca (*Bauhinia variegata*) e o cinamomo (*Melia azedarach*), para a caracterização de compostos naturais ativos com potencial antifúngico contra os fungos *F. solani* e *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*.

OBJETIVO

Detectar compostos antifúngicos extraídos a partir de tecidos vegetais e analisar seu(s) potencial(ais) inibitório(s) contra o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

METODOLOGIA**Material vegetal**

Folhas de Saboeiro, Pata de Vaca e Cinamomo foram lavadas separadamente e colocadas durante 2 dias dentro de uma estufa a 45°C. Depois de totalmente secas (desidratadas), foram trituradas e ao pó resultante foi adicionado ao etanol na proporção 1:5, para cada 1g de pó, foram adicionados 5mL de etanol. Após serem mantidos sob agitação ao abrigo da luz durante sete dias, os extratos foram filtrados duas vezes consecutivas, sendo em seguida submetidos a evaporação do solvente em sistema de rotavapor a uma velocidade de 100 RPM, a 80 °C. O extrato concentrado foi então ressuspensionado em solução aquosa de DMSO 10% e então, utilizado nos experimentos.

Ensaio de Inibição do crescimento fúngico in vitro

Placas petri contendo meio BDA foram preparadas com diferentes concentrações de extrato de folha de Saboeiro, Pata de Vaca e Cinamomo (1, 5 e 10% v/v), para um volume final de 20mL. Inóculos de 5mm dos fungos testados (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*) cultivados isoladamente durante 7 dias em meio BDA, foram introduzidos no centro de cada uma das placas. O controle foi feito utilizando uma placa petri apenas com meio BDA (20mL), e o inóculo do respectivo fungo. As placas foram mantidas a uma temperatura média de 27-30°C e 12h de iluminação

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

diária. O crescimento dos fungos foi verificado medindo-se o tamanho da colônia em três posições diametralmente opostas diariamente até que nas amostras controle o tamanho da colônia atingisse 2/3 do tamanho da placa (cerca de 70mm).

Avaliação de alterações morfológicas provocadas nos fungos em resposta ao tratamento

Alterações morfológicas nos micélios e conídios fúngicos foram analisadas imediatamente após o término do ensaio de inibição do crescimento fúngico in vitro. Para esse fim, amostras foram retiradas das placas de petri expostas ao corante azul de algodão e plaqueadas para observação em microscópio ótico, conforme descrito por Siqueira- Junior et al, 2002.

RESULTADOS

Os resultados obtidos até o momento indicam a presença de compostos antifúngicos em todos os extratos de plantas testados. O extrato de saboeiro causa uma significativa inibição no crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* levando a redução drástica da colônia na ordem de 80 % e 50% para os fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, respectivamente. O fungo *C. gloeosporioides* também tem seu crescimento reduzido drasticamente pelo tratamento com o extrato de folhas de saboeiro, chegando a um declínio de cerca de 93% no seu crescimento. O extrato de saboeiro aparentemente causa danos irreversíveis a estrutura morfológica dos micélios fúngicos, levando a uma aparente deformação a nível de parece celular dos três fungos testados, quando comparados as amostras controle (crescidas na ausência do extrato de saboeiro). O extrato de pata de vaca causa danos efetivos, mas ainda significativos no desenvolvimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* reduzindo seu crescimento em cerca de 30 e 60%, respectivamente. Apesar da redução no crescimento micelial, não foram observadas mudanças drásticas na forma dos fungos tratados com o extrato de pata de vaca. O mesmo foi observado para o *C. gloeosporioides* após tratamento com o extrato de pata de vaca. O extrato de cinamomo produz efeitos bem pronunciados no fungo *F. oxysporum*, reduzindo seu crescimento em 95%, contudo o mesmo extrato causa um efeito inibitório bem menos pronunciado em *F. solani* e *C. gloeosporioides*, causando uma inibição da ordem de 50% e 10%, respectivamente. De maneira interessante o extrato de cinamomo aparentemente causa uma redução drástica na esporulação dos fungos testados, o que foi observado em análises por microscopia.

CONCLUSÃO

Os extratos vegetais de Saboeiro, pata de vaca e cinamomo contêm compostos bioativos com atividade antifúngica contra os fitopatógenos *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *F. oxysporum*, podendo ser empregados na agricultura como fungicidas naturais.

REFERÊNCIAS

- ANANTHAKRISHNAN, T.N. (1999) Induced responses, signal diversity and AGRIOS, G. N. (2005). Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). Plant pathology. San Diego: Academic Press, 173.
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. 388 pp.
- LOPES, E. A. FERRAZ, S., FREITAS, L. G. FERREIRA, P. A., AMORA, D. X. (2005). Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjerição sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. *Nematologia Brasileira*, 29:67.
- LUGINBUHL, S. de A class Project for PP728 Soil borne Pathogens, Fall 2010. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm>. Acessado em 01/06/2013.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 569 p.
- RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. (1999). Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agricola*. 56:1267-1271.
- SILVEIRA, N. S. S., MICHEREFF, S. J., SILVA, I. L. S. S., OLIVEIRA, S. M. A. (2005). Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais; patogênese e controle. *Caatinga*. 18: 283-299.
- SIQUEIRA-JUNIOR, C. L., FERNANDES, K. V. S., MACHADO, O. L. T., da CUNHA, M., GOMES, V. M., MOURA, D., JACINTO, T. (2002) 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:247-254.
- SIQUEIRA-JUNIOR, C. L., FREIRE, M. G. M., MOREIRA, A. S. N., MACEDO, M. L. R. (2012) Control of papaya anthracnose by essential oil of *Ricinus communis*. *Brazilian Archives Biology and Technology*. 55:75-80.
- SIQUEIRA-JUNIOR, C. L., MORAES, T. C., MARTINS, J. A. B., FREIRE, M. G. M. (2011). Controle de antracnose em mamão por extratos vegetais. *Perspectivas online*. 1:99-105.
- SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M., ROGERS, D. (1988) Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
- UNNIKRISHNAN, V., NATH, B. S. (2002). Hazardous chemicals in foods. *Indian J. Dairy Biosci*. 11: 155.