



Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*.

Antimicrobial activity of plant extracts on the development of Acidovorax avenae subsp citrulli.

César Luis Siqueira Junior¹, Maria das Graças Machado Freire², Antônio Sergio Nascimento Moreira³

Resumo - A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido pesquisada em diversas espécies no Brasil. A utilização de extratos vegetais como uma ferramenta para o controle de doenças de plantas se tornou uma prática útil na agricultura. No presente estudo, 7 extratos etanólicos de plantas foram testados quanto suas atividades antibacterianas. A ação antibacteriana foi avaliada através da inoculação de placas contendo meio Sacarose Peptona Agar (SPA), com a bactéria *Acidovorax avenae*, com nove discos de papel contendo, um deles, o antimicrobiano comercial (ampicilina) e os outros embebidos com 100 μ L dos extratos etanólicos. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, e a leitura de diâmetro halos de inibição foi feita. Os resultados demonstraram que os extratos testados foram ativos contra a bactéria com exceção dos extratos de mamona, e de abricó para os quais não foi detectada a inibição de crescimento bacteriano. Os extratos de tanchagem, pitomba e baquipari provocaram a inibição no crescimento bacteriano formando halos médios de 26, 26 e 23,3 mm, respectivamente. De maneira surpreendente, a mistura dos extratos de abricó e baquipari (1:1) causou um aumento na inibição do crescimento bacteriano, sugerindo o potencial de uso de extratos combinados contra patógenos de plantas.

Palavras Chave: melão, fitopatógeno, extratos vegetais, atividade antibacteriana

Abstract – The antimicrobial activity of medicinal plants has been investigated in diverse species in Brazil. The use of these plant extract as a tool to control plant diseases has become a useful practice in agriculture. In the present study, seven ethanolic extracts of plants were screened for antibacterial activity. The antibacterial activity was evaluated by inoculating the bacterium *Acidovorax avenae* in petri dishes containing medium Sucrose Peptone Agar (SPA), in the presence of paper containing nine drives, one of them, the commercial antimicrobials (ampicillin) and the other soaked with 100 mL of each of the ethanolic extracts. The plates were incubated at 37°C for 48 hours, and their reading of inhibition haes diameter was done. The results demonstrated that tested extracts were active against bacteria with the exception of castor bean and apricot extracts for which was not detected bacterial growth inhibition. The extracts of plantain, pitomba and bacupari causes high inhibition on bacterial growth performing an average hale of 26, 26 and 23.3mm, respectively. Surprisingly, the mixture of apricot and bacupari extracts (1:1) caused a significant increase in bacterial growth inhibition, suggesting the potential use of combined extracts against plant pathogens.

Keywords: Melon; Phytopathogen; Plant extracts; Antibacterial Activity.

*autor para correspondência

Recebido para publicação em 30/06/2014; aprovado em 01/09/2014

¹Coordenador do Núcleo de Pesquisas em Biocontrole de Doenças e Proteção em Sistemas Agrícolas – NuPSA Departamento de Botânica - Instituto de Biociência - Fisiologia do mecanismo de defesa de plantas. E-mail: cesarjunior.unirio@gmail.com.

²Institutos Superiores de Ensino do Censa – ISECENSA E-mail: maria.freire@terra.com.br

³Instituto Federal Fluminense. E-mail: ansernan@censanet.com.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o 3º maior produtor de frutas, produzindo mais de 41 toneladas de frutas, atrás apenas da China e Índia (Anuário, 2008). Nos últimos cinco anos, as exportações brasileiras de frutas aumentaram 25%, mas apesar do destaque como grande produtor de frutas e hortaliças, o Brasil desperdiça de 35% a 45% destes durante todo o processo de comercialização e consumo, quando geralmente a perda de hortaliças em Países desenvolvidos é de apenas 5 a 10 % (Kader, 2002). Dentre as frutíferas, o melão destaca-se atualmente como uma das principais olerícolas cultivadas na região nordeste do Brasil, que é responsável por aproximadamente 93% da produção nacional. Essa produção é distribuída pelos estados de RN, BA, CE, PE e PB (Nascimento et al., 2004). Essa frutífera tem destaque ainda por ser uma das cucurbitáceas mais cultivadas no mundo (Costa et al., 2006). Entretanto a cultura de melão é severamente prejudicada pela doença denominada mancha bacteriana, ou ainda, mancha aquosa, provocada pela bactéria *Acidovorax avenae* (Alves et al., 2010). As perdas com a doença podem chegar a 40% contudo, no período de chuvas essas perdas podem alcançar 100 %. A bactéria pode causar lesões nas plântulas, folhas, ramos e principalmente nos frutos, onde os sintomas mais típicos são pequenas manchas oleosas que evoluem tornando-se manchas marrons, com ou sem halos (Nascimento et al., 2004). A lesão se aprofunda causando a podridão seca no interior dos frutos podendo ainda atingir todos os órgãos internos das sementes como: o tegumento interno e externo, o embrião e o endosperma (Neto et al., 2006). Até o momento, não foram descritas maneiras eficientes de controle da doença a não ser pelo emprego de medidas de exclusão das quais são geralmente empregadas a irrigação por gotejamento, rotação de culturas e eliminação de restos culturais, como forma de manejo desta fitobactéria (Junior et al., 2007). Uma abordagem alternativa e ecologicamente correta é o uso de indutores de resistência que são capazes de estimular produção de compostos naturais de defesa nas plantas, como por exemplo as fitoalexinas (Pereira, 2005). Junior et al. (2007) demonstraram a eficiência de do indutor de defesa acibenzolar-s-metil (Bion 500 wg) sobre a incidência da bactéria no meloeiro quando comparado a aplicação de oxicloreto de cobre.

A aplicação de extratos e óleos vegetais como forma alternativa de preservação de alimentos, combate a doenças em animais e plantas, vem recebendo muita atenção nos últimos anos. Vários trabalhos tem demonstrado o potencial antimicrobiano de plantas contra o desenvolvimento de fungos e bactérias (Hammer et al., 1999; Silva Junior et al., 2009), Uma vez que as drogas atualmente utilizadas vêm causando o aumento da resistência dos patógenos e ainda o aparecimento de novos patógenos emergentes (Mahady, 2005) o uso desses extratos poderia como ferramenta biotecnológica no combate a microorganismos. Recentemente, trabalhos

vêm demonstrando o potencial antibacteriano de algumas plantas sobre o desenvolvimento da bactéria *A. avenae*. Feng et al. (2012) demonstraram o efeito inibitório do extrato aquoso de *Rhus chinensis* sobre o crescimento de *A. citrulli*. Em adição, extratos diclorometano de sementes de melancia foram testados contra vários genótipos de *A. avenae* subsp *citrulli*, demonstrando o potencial desse extrato no controle do crescimento dessa bactéria. Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação do potencial antimicrobiano das plantas pitomba (*Talisia esculenta*), baquipari (*Rhedia gardneriana*), Tanchagem (*Plantago major*), mamona (*Ricinus cummunis*), abricó (*Labramia bojeri*), saboeiro (*Sapindus saponária*) e tingui (*Magonia pubescens*) sobre o desenvolvimento in vitro da bactéria *A. avenae* subsp *citrulli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do patógeno

Cepas da bactéria fitopatogênica *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* – IBSBF 1705 isoladas de *Cucumis melo*, foram cedidas gentilmente pela Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS).

Obtenção dos extratos vegetais

Para esse trabalho foram utilizadas as plantas pitomba (*T. esculenta*), baquipari (*R. gardneriana*), saboeiro (*S. saponária*), mamona (*R. cummunis*), tingui (*M. pubescens*) abricó (*L. bojeri*) e tanchagem (*P. major*) (Tabela 1). As plantas foram coletadas na região sudeste do Brasil, no município de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro, com exceção das sementes de pitomba que foram cedidas pela Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS). Após a coleta as plantas foram levadas para o laboratório, onde foram lavadas em água corrente e colocadas em solução de hipoclorito a 10% por 20 minutos, priorizando a eliminação de microorganismos presentes na superfície. Em seguida material foi lavado (individualmente) em água destilada para a retirada do excesso de hipoclorito e mantido em repouso por 24 horas, para redução da umidade. Após o período, o material foi acondicionado em sacos de papel e mantido em estufa à 45°C durante 48h. Os extratos vegetais foram produzidos a partir de uma modificação da metodologia descrita por Ribeiro e Bedendo (1999). Resumidamente, 30 g de material vegetal seco foi triturado em etanol por 3 min em liquidificador, na proporção 1/5, a cada grama de material vegetal foram adicionados 5 mL de etanol. O homogenato resultante da trituração foi filtrado em papel de filtro e o extrato bruto líquido foi concentrado em rotaevaporador, obtendo-se extrato etanólico.

Table 1: plantas coletadas

	Espécie	Família	Parte coletada
1	<i>Rhedia gardneriana</i> Planch	Clusiaceae	Semente
2	<i>Sapindus saponaria</i>	Sapindaceae	Semente
3	<i>Labramia bojeri</i>	Sapotaceae	Fruto
4	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	Folha
5	<i>Ricinus cummunis</i>	Euphorbiaceae	Semente
6	<i>Talisia esculenta</i>	Sapindaceae	Casca do fruto
7	<i>Magonia pubescens</i>	Sapindaceae	Semente

Avaliação dos extratos

A atividade antibacteriana dos extratos vegetais foi detectada usando uma modificação da técnica de difusão em disco descrita por Wilkinson e Cavanagh (2005). Bactérias *Acidovorax avenae* foram cultivadas para teste em meio de cultura em meio de cultura líquido SP composto de 20g/L de sacarose, 10 g/L peptona, por 24h a 37°C, previamente esterilizado por 20 min à 127°C. Placas de petri de 10 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio SPA (20 g/L sacarose, 10 g/L peptona, 12 g/L agar) solidificado foram preparadas com a adição de 1 mL suspensão bacteriana espalhada de maneira uniforme pela superfície do meio solidificado. As placas foram então mantidas sob incubação a 37°C por 20 min. Em seguida, 100 mL de cada extrato de planta não diluído foram adicionados em discos de papel de filtro esterilizado de 10 mm de diâmetro. Os discos contendo os extratos foram colocados nas placas de agar com as bactérias e incubadas a 37 ° C durante 48 h. A zona de diâmetros de inibição para cada um dos extratos foram medidas em milímetros (incluindo o diâmetro do disco). Como controle, foram utilizados discos contendo apenas meio líquido SP. Os experimentos foram conduzidos por três vezes.

Análises estatísticas

Os ensaios foram arranjados experimentalmente no delineamento inteiramente casualizado (DIC) obedecendo o esquema fatorial (1 x 9) com 3 repetições. Os tratamentos foram desdobrados em uma espécie de bactéria por nove extratos de plantas distintos (pitomba, baquipari, saboeiro, mamona, tingui, abricó, tanchagem, ampicilina e mistura entre abricó e baquipari). Para a análise estatística dos dados foram realizadas analyses de variância simples (ANOVA) e as medias foram comparadas pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade, sendo utilizado o programa estatístico Statistica 7.1 for windows (StatSoft, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados sugere o potencial efeito antibiótico dos extratos testados (tabela 2). Comparando os extratos entre si e com o controle positivo (ampicilina) pode-se observar que os extratos de pitomba e tanchagem foram os mais eficientes, apresentando efeitos superiores aos causados pela ampicilina. Contudo, o efeito causado por esses extratos não diferiu estatisticamente do efeito provocado pelo extrato de bacupari. Esses dados reforçam a ideia do potencial de plantas de pitomba e tanchagem contra microorganismos já descrito anteriormente por Pinheiro et al. (2009) e Siqueira-Junior et al. (2011). Dos extratos testados, o extrato de mamona não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento da bactéria *A. avenae*. Em contraste a esses resultados, extratos e óleos essenciais de mamona têm sido largamente descritos na literatura por seu potencial antimicrobiano. Siqueira-Junior et al. (2012), por exemplo, descreveram o potencial antifúngico do óleo essencial de mamona contra o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. O potencial antifúngico do extrato de folhas de mamona sobre o mesmo fungo foi descrito por Ribeiro e Bedendo (1999). A não sensibilidade da bactéria ao extrato de mamona poderia ser explicada pela ausência de compostos específicos tóxicos a espécie usada nos experimentos, ou ainda a resistência da bactéria aos compostos tóxicos presentes na planta. Apesar de provocar um efeito antimicrobiano menos pronunciado que o da ampicilina, o extrato de saboeiro, produz a formação de um halo de inibição significativo, demonstrando o possível potencial de uso desse extrato no controle da bactéria. Em contraste com esse resultado, os extratos de tingui e abricó apresentaram um efeito inibitório não significativo sobre o crescimento da bactéria *A. aveane*. Surpreendentemente, quando utilizou-se o extrato de abricó em combinação com o extrato de baquipari (1:1), o efeito sobre o crescimento bacteriano foi potencializado significativamente, atingindo uma inibição comparável a a provocada pela ampicilina.

Tabela 2: Atividade antibacteriana de extratos vegetais contra a bactéria *Acidovorax avenae*

	Plant Extract	Zonas de Inibição (mm)
1	<i>R. gardneriana</i> .	23,3a
2	<i>S. saponaria</i>	15b
3	<i>L. bojeri</i>	11c
4	<i>P. major</i>	26a
5	<i>R. cummunis</i>	--
6	<i>T. esculenta</i>	26a
7	<i>M. pubescens</i>	11,66c
7	"1" + "3" (1:1)	18d
8	Ampicilina (cont)	17,33e

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Turkey ao nível de 5 % de probabilidade. Controle positivo – ampicilina (5mg/mL).

Esse resultado poderia ser explicado pelo sinergismo ocasionado pela combinação dos extratos. Nosso grupo vem demonstrando o efeito sinérgico de extratos de baquipari e abricó sobre o desenvolvimento do fungo *C. gloeosporioides*, demonstrando o papel de ambas as plantas no controle de doenças em mamoeiro (Siqueira-Junior, 2014).

CONCLUSÃO

Conforme verificado nesse estudo, os extratos etanólicos de sementes de bacupari, folhas de tanchagem, cascas de frutos de pitomba e sementes de saboeiro apresentam pronunciada atividade antibacteriana frente ao isolado bacteriano de *A. avenae*, causadora de mancha aquosa em frutos de melão. Em adição a combinação de extratos de bacupari e abricó apresentam uma atividade antibacteriana significativa sobre a mesma bactéria. Juntos esses dados corroboram a ideia de uso de extratos vegetais como forma alternativa de tratamento de doenças evitando o uso indiscriminado de pesticidas e praguicidas na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A. O.; Xavier, A. S.; Viana, I. O.; Mariano, R. L. R.; Silveira, E. B. Colonization dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, n.6, p. 368-372, 2010.
- Costa, F. M.; Junior, R. S.; Almeida, F. A.; Lopes, M. V. Eficiência de kasugamicina e hidróxido de cobre no controle da bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da "Mancha-Aquosa" no meloeiro. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. Vol. 6, n. 1, p. 132-138, 2006.
- Feng, C. T.; Su, H. J.; Chen, C. T.; Ho, W. C.; Tsou, Y. R.; Chem, L. L. Inhibitory Effects of Chinese Medicinal Herbs on Plant-Pathogenic Bacteria and Identification of the Active Components from Gallnuts of Chinese Sumac. *Plant Disease*, vol. 96, n. 8, p. 1193-1197, 2012.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, p.985–990, 1999.
- Junior, R. S.; Filho, F. S. T. P.; Nunes, G. H. S.; Torres, G. R. C. Eficiência de acibenzolar-S-methyl e oxicloreto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da "mancha aquosa" no meloeiro. *Ciências da Terra*, vol. 7, n. 1, p. 66-70, 2007.
- Kader, A. A. Postharvest biology and technology: an overview. In: Kader, A. A. *Postharvest technology of horticultural crops*. Oakland: University of California, 2002. p.39-48.
- Mahady, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, 2405-2427, 2005.
- Nascimento, A. N. P.; Mariano, R. L. R.; Silva, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Horticultura Brasileira*, vol.22, n.3, p. 345-349, 2004.
- Neto, E. B. S.; Silveira, E. B.; Mariano, R. L. R.; Nogueira, N. L.; Rossi, M. L.; Santos, L. A. Penetração e Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Folhas, Frutos e Sementes de Melão Amarelo. *Fitopatologia Brasileira*, vol. 31, n. 1, p. 84-88, 2006.
- Pereira, E. W. L. Eficiência de Acibenzolar-S methyl no controle da *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e efeito na qualidade de frutos de melão. 2005, 50f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade federal do Semi-Árido- UFERSA.

- Pinheiro, A. Q.; Melo, D. F.; Macedo L. M.; Freire M. G. M.; Rocha, M. F. G.; Sidrim, J. J. C.; Brilhante, R. S. N.; Teixeira, E. H.; Campello, C. C.; Pinheiro, D. C. S. N.; Lima, M. G. S. Antifungal and marker effects of *Talisia esculenta* lectin on *Microsporium canis* *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 107, p. 2063-2069, 2009.
- Ribeiro, L. F.; Bedendo, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agricola*. v. 56, p.1267-1271, 1999.
- Silva Junior, I. F.; Filho, V. C.; Zacchino, S. A.; Lima, J. C. S.; Martins, D. T. O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, n. 1B, p. 242-248, 2009.
- Siqueira-Junior, C. L. Antifungal properties of combined plants extracts against papaya anthracnose. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, vol.2, n.2, p.167-172, 2014.
- Siqueira-Junior, C. L.; Freire, M. G. M.; Moreira, A. S. N.; Macedo, M. L. R. Control of papaya anthracnose by essential oil of *Ricinus cummunis*. *Brazilian Archives Biology and Technology*, vol.55, p.75-80, 2012.
- Siqueira-Junior, C. L.; Moraes, T. C.; Martins, J. A. B.; Freire, M. G. M. Controle de antracnose em mamão por extratos vegetais. *Perspectivas online*, vol. 1, n. 1, p.99-105, 2011.
- StatSoft, Inc.STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. 2005.
- Wilkinson, J. M.; Cavanagh, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils from australian native plants. *Phytotherapy*, vol. 19, p. 643-646, 2005