

Potencial fungicida do extrato etanólico obtido das sementes de *Pachira aquatica* AUBL. sobre *Fusarium* sp

The potential of the ethanolic extract of fungicide seed
Pachira aquatica on *Fusarium* sp

Daniella Karine Souza¹, Renato Abreu Lima², Cesár Augusto Domingues³, Lunalva Aurélio Pedroso⁴, Valdir Alves Facundo⁵, Farah Castro Gama⁶, Maurício Reginaldo Alves⁷

^{1,2,5} Universidade Federal de Rondônia - UNIR, RO, Brasil

^{3,7} Embrapa Rondônia, RO, Brasil

⁴ Universidade de Brasília - UNB, Brasil

⁶ Embrapa Semiárido, Brasil

Resumo

O interesse em metabólitos secundários tem crescido muito nos últimos anos devido à sua ampla utilização como matéria prima na preparação de substâncias com atividade biológica. Portanto, baseado nesse grande interesse, realizou-se o presente trabalho, com o objetivo de avaliar o potencial fungicida do extrato etanólico de sementes de *Pachira aquatica* (25 mg.mL⁻¹) sobre *Fusarium* sp. Para obtenção do extrato bruto, o material vegetal foi deixado em maceração com etanol 95%, durante sete dias, após isto, o solvente foi evaporado e o extrato etanólico foi obtido. Os ensaios biológicos foram realizados com colônias de *F. sp.* Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ($P \leq 0.01$). O crescimento micelial foi avaliado durante quatro e seis dias após a inoculação das colônias. Como resultado, observou-se que os diâmetros médios foram de 24 e 27,8 mm, para o gênero *Fusarium*, e 64 e 67,4 mm, para o tratamento controle. A esporulação foi avaliada no 6º dia após a inoculação do fungo e obteve um desenvolvimento de 43 conídios.mL⁻¹, quando tratados com extrato das sementes e 110 conídios.mL⁻¹, para o controle. O extrato etanólico das sementes inibiu significativamente o crescimento micelial, esporulação e foi considerado tóxico a *Fusarium* sp.

Palavras-chave: atividade fungicida. controle biológico. interação ecológica.

Abstract

The interest in secondary metabolites has grown tremendously in recent years due to its wide use as raw material in the preparation of biologically active substances. So based on that great interest was held this work in order to evaluate the potential of the ethanolic extract of fungicide seed *Pachira aquatica* (25 mg.mL⁻¹) on *Fusarium* sp. To obtain the crude extracts, the plant material was left in maceration with 95% ethanol, during seven days, after this, the solvent was evaporated and ethanolic extract was obtained. Biological assays were performed with colonies of *Fusarium* sp. The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and compared by Tukey test ($P \leq 0.01$) growth was evaluated for four and six days after inoculation of the colonies. As a result, it was observed that average diameters were 24 and 27.8 mm, for the genus *Fusarium* sp. and 64 and 67.4 mm for the control treatment. Sporulation was assessed on day 6 after inoculation of the fungus and obtained a development of 43 conídios.mL⁻¹ *Fusarium* sp., when treated with the extract of the seeds and 110 conídios.mL⁻¹, to control. The ethanol extract of the seeds significantly inhibited mycelial growth, sporulation and was considered toxic to *Fusarium* sp.

Keywords: antifungal activity. biological control. ecological interaction.

1 Introdução

O uso indiscriminado e prolongado de pesticidas tem causado grandes impactos para a sociedade e o meio ambiente. Frente a este problema, a agricultura tem buscado novas alternativas para o controle de doenças e pragas menos agressivas ao ambiente e à saúde humana (Alves, 1998).

Neste sentido, o interesse em metabólitos secundários tem crescido muito nos últimos anos, devido à sua ampla utilização como matéria-prima na preparação de substâncias com atividade biológica (Di Stasi, 1996).

No entanto, necessita-se conhecer mais profundamente as técnicas e métodos de extração de metabólitos de plantas, assim como a caracterização do seu potencial fungicida, para que os mesmos possam expressar todo o seu potencial biológico, bem como acompanhar os verdadeiros impactos em organismos-alvo e não-alvo. *Fusarium* sp. é um fungo filamentosos cosmopolita, amplamente distribuído em plantas e no solo. Causa algumas das mais importantes doenças de plantas, afetando economicamente as culturas de feijão, milho, uva e inúmeras outras (Brum, 2006). Além disso, a presença de algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem disseminar doenças patogênicas a cereais e grãos, como o café, e possibilitar a produção de micotoxinas (Ochratoxina A) altamente tóxicas à saúde humana, pelos seus efeitos nefrotóxicos, citotóxico e carcinogênico (Creppy, 1999; Taniwaki et al., 2003; Martins, 2005).

A família Bombacaceae compreende 31 gêneros e 250 espécies amplamente distribuídas por todas as regiões tropicais do mundo, incluindo o Brasil (Barroso et al., 2004). *Pachira aquatica* Aubl., é uma espécie nativa do Sul do México até o Norte da América do Sul (Oliveira et al., 2000). Na região Amazônica, essas plantas ocorrem predominantemente em terrenos sujeitos a inundações periódicas, especialmente, nas margens de rios e córregos (Peixoto & Escudeiro, 2002). Popularmente, é conhecida por monguba, mamorana, munguba, castanheira do Maranhão, cacau selvagem, cacau falso ou castanhola (Souza & Lorenzi, 2008).

Pouco se sabe a respeito da composição química e de possíveis atividades biológicas de *Pachira aquatica* Aubl. Porém Shibatani et al., (1999) identificaram substâncias extraídas do tronco de *P. aquatica*, com propriedades fungicidas para *Cladosporium herbarum* (Pers.); *Pythium ultimum* (Var.); *Rhizoctonia solani* (Kuhn) e *Aspergillus flavus* (Gray).

Aliado a essas informações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fungicida do extrato etanólico de sementes de *P. aquatica* (25 mg.mL⁻¹) sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Fusarium* sp.

2 Material e métodos

Para a obtenção do extrato, *P. aquatica* foi coletada na área experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO. A identificação da espécie foi realizada pelo envio de uma exsicata ao Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro, da Faculdade São Lucas - HFSL, Rondônia, a qual foi registrada sob o N° de 003878.

Após a coleta, as sementes foram pesadas e embaladas em sacos de papel e levadas para o Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, onde foram separadas, pesadas frescas, obtendo-se 1,5 kg de material e, em seguida, colocadas para secar em estufa com circulação de ar, modelo 315 SE (Fanem), por 48 horas, a 40°C. Para obtenção do extrato bruto, a amostra foi colocada em Erlenmeyer contendo 1 litro de acetona PA, da marca VETEC, por sete dias, em duas repetições. Posteriormente, o material foi evaporado em evaporador rotatório, obtendo-se 18,5 g de extrato bruto das sementes.

O isolado de *Fusarium* sp., de coloração branca e característica aveludada, foi obtido da micoteca do Laboratório de Entomologia da EMBRAPA-RO, foi separado, repicado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e acondicionado em câmara climatizada tipo BOD, a $\pm 25,6$ °C e 12 h de fotoperíodo, por sete dias, para o crescimento das colônias.

Para análise da atividade fungicida, realizou-se, inicialmente, o teste de solubilidade do extrato bruto de sementes de *P. aquatica* em Tween 20% + ADE. Para cada 1 mg de extrato bruto utilizou-se 1 mL de solução (0,1 mL de Tween 20% + 0,9 mL de ADE).

Foram adicionados a placas Petri, 10 mL de meio de cultura BDA. Após 2 horas, adicionou-se mais 324 mL de solução de extrato de sementes de *P. aquatica* (25 mg.mL⁻¹). Para o tratamento controle, adicionou-se, apenas, solução sem o extrato, espalhando-se com auxílio da alça de Drigalski. Em seguida, o fungo foi inoculado em três pontos equidistantes das placas e incubados, durante quatro dias, em BOD a $\pm 25,6$ °C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento foi inteiramente casualizado com 15 repetições.

Após quatro dias de incubação, foram selecionadas aleatoriamente cinco colônias de *Fusarium* sp., por tratamento, as quais tiveram o diâmetro médio medido com auxílio de um paquímetro. Após seis dias de incubação, repetiu-se esse procedimento.

Para a avaliação da concentração de conídios, o experimento foi realizado seis dias após a inoculação. Foram retirados, das colônias de cada tratamento, cinco discos contendo 4 mm de diâmetro. Cada disco foi colocado em tubo de ensaio contendo 10 mL de ADE + Tween 20% e agitado durante 30 segundos. Uma alíquota da suspensão de esporos de cada tubo foi pipetada, em câmara de Neubauer, para a contagem do número de conídios/mm³, com auxílio de um microscópio óptico. Comparou-se o número de conídios.mL⁻¹ de *Fusarium*

sp., da solução do extrato das sementes, com as amostras do grupo controle, que apresentaram uma suspensão de 106 de conídeos.mL⁻¹.

A toxicidade foi calculada pela fórmula proposta por Alves (1998), para classificar produtos químicos conforme sua toxicidade aos fungos entomopatogênicos in vitro. Essa classificação baseia-se no cálculo do fator T, relacionando os valores de crescimento vegetativo (CV) e esporulação (ESP) com o controle (%): $T = [20 (CV) + 80 (ESP)] / 100$.

Os valores de T são classificados de forma que para a faixa de 0 a 30 o produto é considerado muito tóxico, de 31 a 45 é considerado tóxico, de 46 a 60 é considerado moderadamente tóxico e, para valores acima de 60, é compatível com o fungo estudado.

Utilizou-se na pesquisa delineamento experimental inteiramente casualizado para todos os experimentos. As médias e desvios padrões foram calculados sobre o tamanho (mm) das colônias e concentração de esporos produzidos pelo fungo (conídios/mm³). A interação entre o extrato de *P. aquatica* e o fungo foi calculada segundo o índice T (Alves, 1998). Os resultados foram submetidos à regressão logarítmica e à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0.01$), utilizando-se ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002).

3 Resultados e discussão

O extrato etanólico das sementes de *P. aquatica*, na concentração de 25 mg.mL⁻¹, apresentou atividade fungistática sobre *Fusarium* sp. Em quatro dias de avaliação, observou-se 24 mm de crescimento micelial

das colônias de *F. oxysporum*, tratadas com o extrato das sementes de *P. aquatica* e 64 mm de crescimento micelial das colônias do tratamento controle (Figura 1).

Após seis dias, o crescimento das colônias foi de 27,8 mm para o tratamento com extrato, e 67,4 mm para o controle. Percebe-se, portanto, que o extrato das sementes causou inibição, significativa, no crescimento micelial, quando comparado ao do grupo controle ($P \leq 0.01$) (Figura 1).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos, nos últimos anos, utilizando extratos vegetais contra diferentes espécies de fungos, inclusive o gênero *Fusarium* (Gare & Siddiqui, 1992; Singh et al., 1993; Bower et al., 2000; Marques et al., 2002; Lima et al., 2010).

Salgado et al., (2003) avaliaram a atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. citriodora* Hook. e *E. urophylla* Blake., sobre os fungos *Fusarium oxysporum* (Phaseoli), *Botrytis cinerea* (P. Mich. Ex Pers) e *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.), e obtiveram inibições significativas no crescimento micelial in vitro das espécies após o período de 7 dias da aplicação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al., (2011), na qual testaram 10µL de óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq., sobre *F. oxysporum*, onde observou-se, após 24 horas de experimento, a inibição do crescimento do fungo, com colônias apresentando diâmetro médio de 22,5 mm no tratamento com óleo essencial. Enquanto que, no controle utilizando acetona, o diâmetro médio foi de 69,9 mm.

Embora não haja, ainda, registros literários relacionando a espécie *P. aquatica* com atividade biológica sobre gênero *Fusarium*, Shibatani et al., (1999) revelaram que o extrato, obtido do tronco de mudas de *P. aquatica*,

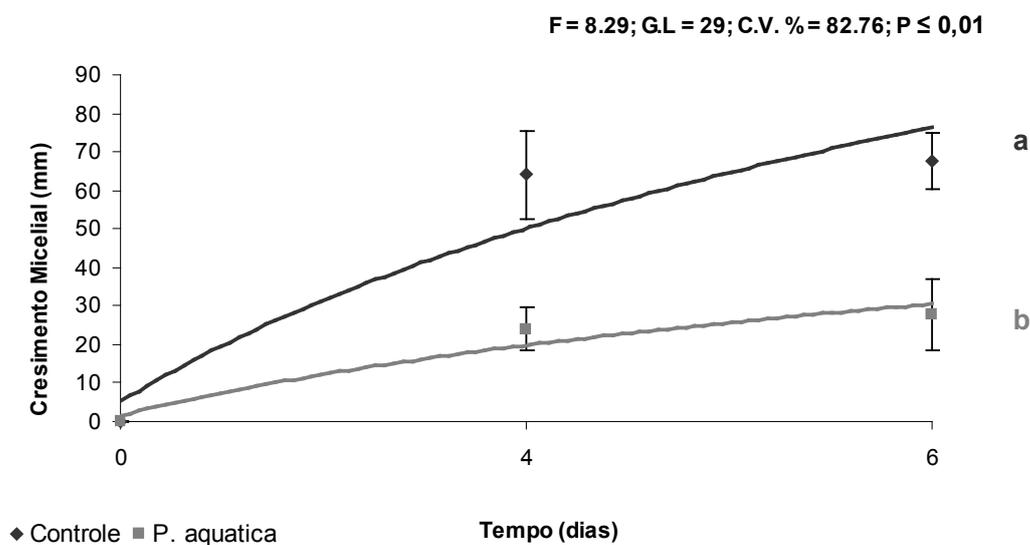


Figura 1. Crescimento micelial (mm) de *Fusarium* sp. tratado com e sem extrato etanólico de sementes de *P. aquatica* (25 mg.mL⁻¹). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

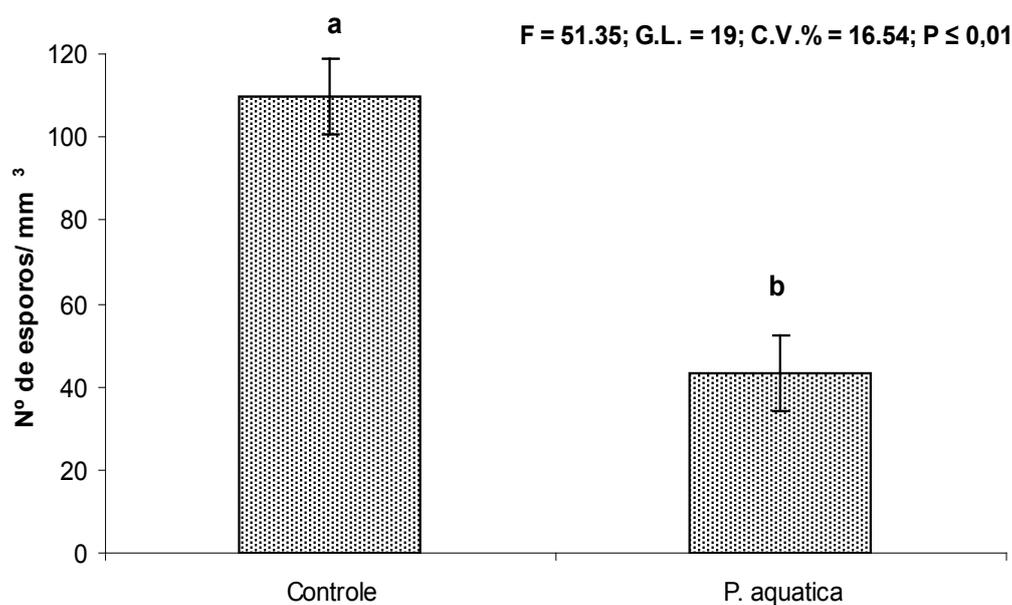


Figura 2. Número de esporos/mm³ de *Fusarium* sp., tratado com ou sem o extrato etanólico de sementes de *P. aquatica* (25 mg.mL⁻¹). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

apresentava princípios ativos altamente fungicidas. Os mesmos autores constataram que, utilizando uma concentração de 50 mg.mL⁻¹, os isolados isohemigossypolone e 2-O-methylisohemigossypolone foram responsáveis pela inibição dos fungos *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link ex Gray; *Pythium ultimum* Var.; *Rhizoctonia solani* Kühn e *Aspergillus flavus* Link ex Gray.

Estudos desenvolvidos sobre a composição das sementes demonstraram que a *P. aquatica* tem um elevado teor de óleo (44,1%), sendo o ácido palmítico o seu principal componente. Observou-se também a existência de proteínas com alto teor de triptofano, porém, sua composição, bem como as suas atividades, devem ser estudadas mais detalhadamente (Pereira et al., 2002).

Testes fitoquímicos têm revelado a presença de um flavonoide (5-hidroxi- 3, 6, 7, 8, 4, pentametoxiflavona), isolado de extratos do tronco de *P. macrocarpa*, que possui atividade repelente contra insetos (Morimoto et al., 2000; Paula et al., 2002). Isto revela que vegetais do mesmo gênero tendem a possuir compostos semelhantes, apesar de possuírem intensidades diferentes, o que pode ser atribuído as diferenças estruturais e/ou concentrações das substâncias nos tecidos, porém com perspectivas de apresentarem atividades biológicas semelhantes (Saito et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato das sementes de *P. aquatica* atuou na inibição da conidiogênese de *Fusarium* sp. No sexto dia de avaliação, foram produzidos 43 conídios.mL⁻¹ de *Fusarium* sp., quando tratados com extrato das sementes e 110 conídios.mL⁻¹, quando não foram expostos a *P. aquatica* ($P \leq 0.01$) (Figura 2).

O extrato etanólico de sementes de *P. aquatica* foi

considerado tóxico, pois inibiu o crescimento micelial e esporulação de *Fusarium* sp., conforme a faixa T (30 a 45) (Figura 2), estabelecido pela metodologia de Alves (1998). Portanto, conforme os resultados observados neste trabalho, o extrato das sementes inibiu o desenvolvimento de *Fusarium* sp., e, com isso, pode ser empregado em futuros experimentos de campo no combate a doenças fitopatogênicas do cafeeiro abrindo, portanto, alternativas para novos métodos de controle desta praga.

4 Conclusões

Os resultados sugerem que o extrato etanólico das sementes de *P. aquatica* apresentou ação inibitória e toxicidade sobre o crescimento de *Fusarium* sp., o que sugere seu potencial no controle biológico deste microrganismo, indicando, portanto, boas perspectivas para uso experimental de extratos vegetais.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e EMBRAPA-RO, pelo financiamento das ações de pesquisa e ao Laboratório de química em produtos naturais, da Universidade Federal de Rondônia-UNIR, pelo auxílio na produção dos extratos de *P. aquatica*.

Referências

ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. São Paulo: FEALQ, 1998. 407p.

- BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. Sistemática de Angiospermas do Brasil. 2.ed. Viçosa: UFV, 2004. 228p.
- BOWER, J.H.; LOCK, J.C. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium wilt* in the greenhouse. *Plant disease*, v.84, n.3, p.300-305, 2000.
- BROCK, T.D. *Biology of Microorganisms*. 3.ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1979. 874p.
- BUSTILLO, A.E. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Chinchiná, Colombia, 2002, 40p.
- CREPPY, E. E. Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, v.18, n.3/4, p.277-293, New York, 1999.
- DEPIERI, R.A.; MARTINEZ, S.S.; MENESES, J.R.A.O. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotropical Entomology*, v.34, n.4, p.601-606, 2005.
- DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 229p.
- GAMA, F.C. Fungos filamentosos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae) e frutos de *Coffea canephora* (Pierre), em Rondônia. 2005. 69p. Dissertação (mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2005.
- GARE, S.C.; SIDDIQUI, N. Antifungal activity of some essential oil isolates. *Pharmazil*, v.47, n.6, p.467-468, 1992.
- LIMA, R.A.; [SANTOS, M.R.A.](#); [FERNANDES, C.F.](#); SILVA, A.G.; [FACUNDO, V.A.](#) Atividade fungicida do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus* DC Stapf.) sobre *Fusarium oxysporum*. In: *Jornada Científica*, 5, Porto Velho. Anais...Universidade Federal de Rondônia, 2010, p.13-22.
- MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.O. Efeito fungitóxica dos extratos de *Caryocar brasiliensis* Camb. sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciência e Agrotecnologia*, Edição especial, p.1410-1419, 2002.
- MORIMOTO, M.; KUMEDA, S.; KOMAI, K. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D.Dom. *Journal Agriculture Food Chemical*, v.48, n.2, p.1888-1891, 2000.
- MURARI, A.B. Levantamento populacional de Scolytidae (Coleoptera) em povoamento de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* Wild). 2005, 79p. Dissertação de mestrado (em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, L.M.; BEZERRA, L.C.N.M.; SILVEIRA, S.B.; MONTEIRO, A.C.O.; MOREIRA, R.A. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl., *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. *Food Chemistry*, v.70, n.3, p.185-191, 2000.
- PAULA, V.F.; BARBOSA, L.C.A.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O.W.; CRUZ, M.P. Chemical constituents from *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns: complete H 1 and CNMR 13 assignments and x ray structure 5- hydroxy -3, 6, 7, 8, 4' - pentamethoxyflavone. *Journal of Brazil Chemical Society*, v.13, n.2, p.54-58, 2002.
- PEIXOTO, A.L.; ESCUDEIRO, A. *Pachira aquatica* (Bombacaceae): História dos animais e árvores do Maranhão, de Frei Cristóvão de Lisboa. *Rodriguesia*, v.53, n.82, p.123-130, 2002.
- PEREIRA, C.K.S.; VIDAL, C.S.; QUIRINO, M.R.; PAULO, M.Q. Avaliação da atividade toxicológica e microbiológica do extrato hidroalcolólico da resina de *Pachira aquatica* (Bombacaceae). *Anais... Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba*, 10, Ed. Universitaria UFPB, 2002, p.19.
- SAITO, M.L.; POTT, A.; FERRAZ, J.M.G.; NASCIMENTO, R.S. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E. S Mith) e *Anticarsia gemmatilis* Hubner. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.14, n.2, p.1-10, 2004.
- SALGADO, A.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUDE, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, n.2, p.249-254, 2003.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.;
FERNANDES, C.F.; FACUNDO, V.A. Antifungal
activity of *Piper marginatum* L. (Piperaceae)
essential oil on in vitro *Fusarium oxysporum*
Schlecht. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.4, n.1, p.9-14,
2011.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do
programa computacional ASSISTAT para o sistema
operacional Windows. *Revista Brasileira de
Produtos Agroindustriais*, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

SHIBATANI, M.; HANSHIDOKO, Y.; TAHARA, S.
A major fungitoxin from *Pachira aquatica* and its
accumulation in outer bark. *Journal of Chemical
Ecology*, v.25, n.2, p.347-353, 1999.

SINGH, H.N.P.; PRASAD, M.M.; SINHA, K.K.
Efficacy of lesft estrats of some medicinal plants
against disease deve lopment in banana. *Letters in
applied microbiology*, v.17, n.6, p.269-271, 1993.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática:
guia ilustrado para identificação das famílias de
Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado
em APG II. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum,
2008. 704p.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R. Broca-do-café: histórico,
reconhecimento, biologia, prejuízos,
monitoramento. Belo Horizonte: EPAMIG, 1997, 2
ed. 40p. (Boletim técnico).

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A.;
IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in
Brazilian coffee and its formation in relation to
processing methods. *International Journal of food
Microbiology*, v.82, p.173-179, 2003.