

Utilização de tinturas vegetais e óleo essencial no controle do mofo-branco em alface.

Use of plant extracts and essential oil in control of the white mold in lettuce.

PANSERA, Marcia Regina¹; PAULETTI, Manuela¹; Gonzalez, Arthur¹; SARTORI, Valdirene Camatti²; RIBEIRO, Rute Teresinha da Silva²

¹Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul - RS, Brasil, mrpancer@ucs.br; mpauletti1@ucs.br; arthurgc@yahoo.com.br; ²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul - RG, Brasil, vcsartor@ucs.br; rtsribei@ucs.br

RESUMO: Na busca de métodos alternativos para o controle do mofo-branco em alface, causada pelo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, óleos essenciais e extratos vegetais surgem como opção. Neste trabalho, avaliou-se *in vitro* e *in vivo* o efeito dos extratos vegetais de *Bauhinia forticata*, *Piper mikanianum*, *Elephantopus scaber*, *Bambusa oldhamii*, *Piper aduncum* e *Solanum paniculatum* e do óleo essencial de *Piper mikanianum*, com possível potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum*. Os extratos etanólicos de *P. mikanianum* e *B. forticata* inibiram *in vitro* o fungo na concentração de 20% e, o óleo essencial de *P. mikanianum* inibiu o patógeno a partir de 0,05%. Os testes *in vivo* foram realizados nas melhores concentrações dos testes *in vitro*, sendo observada diminuição da incidência da doença com o óleo de *P. mikanianum* em 0,5%, indicando o potencial deste, no controle do mofo branco em alface. Não houve diminuição da incidência da doença entre os extratos vegetais.

PALAVRAS-CHAVE: *Sclerotinia sclerotiorum*; controle alternativo

ABSTRACT: In the search for alternative methods to control white mold in lettuce caused by the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, essential oils and plant extracts emerge as an option. In this study, we evaluated *in vitro* and *in vivo* effect of plant extracts of *Bauhinia forticata*, *Piper mikanianum*, *Elephantopus scaber* L., *Bambusa oldhamii*, *Piper aduncum* and *Solanum paniculatum* L. and essential oil of *Piper mikanianum* for their potential antifungal agent against *S. sclerotiorum*. The ethanol extracts of *P. mikanianum* and *B. forticata* inhibited *in vitro* the fungus at 20% concentration and, the essential oil *P. mikanianum* inhibit pathogen from 0.05%. *In vivo* tests were performed in the best concentrations of *in vitro* tests. There was mycelial growth inhibition with the oil of *P. mikanianum* at 0.50%, indicating the potential of this, in the control of white mold in lettuce. Not so with the extract, with no inhibition of disease at the concentrations tested.

KEY WORDS: *Sclerotinia sclerotiorum*, alternative control

correspondência para: mrpancer@ucs.br
Aceito para publicação em: 16/12/2014

Introdução

Ao longo dos anos, os agrotóxicos têm sido indiscriminadamente utilizados para controlar doenças, pragas e plantas espontâneas na agricultura. Esta utilização tem promovido vários problemas ambientais, tais como: contaminação de alimentos, do solo, da água, dos animais, intoxicação de agricultores, além da seleção de patógenos, pragas e plantas espontâneas resistentes a certos princípios ativos dos agrotóxicos, o desequilíbrio do sistema biológico e a redução da biodiversidade (SCHWAN-ESTRADA, 2003). Porém, apesar destes fatos observados pelo uso de agrotóxicos, a sua utilização é extremamente atraente por sua simplicidade, previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema por parte dos produtores. Felizmente, a partir das últimas décadas a sociedade tem demonstrado um posicionamento contrário ao uso indiscriminado de moléculas de alto impacto ambiental na agricultura, com consequências sobre a cadeia alimentar. Neste contexto, a avaliação do efeito de extratos de origem vegetal tem sido vista como uma atividade promissora para o desenvolvimento de produtos fitossanitários de baixo impacto. Vários estudos têm comprovado o efeito dos óleos essenciais e extratos de plantas, os quais atuam como fungicidas naturais, inibindo a atividade fúngica, o crescimento micelial e a germinação de conídios (ATTI-SANTOS, 2010). Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito do óleo essencial de *Piper mikanianum* (KUNTH) STEUDEL (pariparoba) e os extratos vegetais (aquoso, etanólico e infusão) de *Bauhinia forticata* (pata de vaca), *Piper mikanianum* (KUNTH) STEUDEL (pariparoba), *Elephantopus scaber* L. (língua de vaca), *Bambusa oldhamii* (bambu), *Piper aduncum* (piper) e *Solanum paniculatum* L. (jurubeba) com possível potencial antifúngico, contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY, causador do mofo branco em alface (*Lactuca sativa*).

Material e Métodos

O microrganismo *Sclerotinia sclerotiorum* foi isolado de plantas com sintomas da doença. O mesmo está sendo conservado na Micoteca do Laboratório de Controle de Doenças de Plantas da Universidade de Caxias do Sul. Para o desenvolvimento deste trabalho o fungo foi multiplicado em placas de Petri com meio BDA e a sua patogenicidade confirmada.

A coleta das Plantas: *Bauhinia forticata* (pata-de-vaca), *Piper mikanianum* (pariparoba), *Elephantopus scaber* (língua-de-vaca), *Bambusa oldhamii* (bambu), *Piper aduncum* (piper)

e *Solanum paniculatum*. (jurubeba) foi realizada no Município de Caxias do Sul/RS (29°09'78,0"S e 51°08'65,9"W).

As sementes de alface utilizadas foram da variedade Crespa Grand Rapids -TBR/ISLA PAK/Brasil, não tratadas com agrotóxicos. A extração do óleo essencial de *Piper mikanianum* foi realizado por hidrodestilação em aparelho Clevenger durante 1 hora. A análise cromatográfica do óleo essencial foi feita por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG/SM). As análises em CG foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard 6890, equipado com um processador de dados HP-Chemstation. As análises em coluna polar foram realizadas em coluna HP-Innowax (30 m x 320 µm i.d.) 0,50 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, USA), com a seguinte programação de temperatura 40 °C (8 min) para 180 °C a 3 °C/min, 180-230 °C a 20 °C/min, 230 °C (20 min); temperatura de injetor 250 °C; razão de split 1:50, temperatura do detector FID 250°C; gás de arraste H₂ (34Kpa), volume injetado 1 µL diluído em hexano (1:10). As análises em CG/SM foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. As análises foram realizadas em coluna polar HP-Innowax (30 m x 250 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, USA). O programa de temperatura utilizado foi o mesmo usado na análise em CG, interface 280°C; razão de *split* 1:100; gás de arraste He (56 Kpa); energia de ionização cut 3,5 min, volume injetado 0,4 µL diluído em hexano (1:10).

Extrato por infusão: para cada planta, as folhas frescas foram fervidas com água destilada durante 20 minutos e logo depois foram filtradas em papel filtro. Os filtrados resultantes foram utilizados nos testes, e as folhas descartadas.

Extrato aquoso: 150 g de folhas de cada planta seca e triturada foram misturadas em 1 L de água destilada e mantidas em um frasco durante 24 h. Logo depois, as misturas foram filtradas em papel filtro. Os filtrados resultantes foram utilizados nos testes, e as folhas descartadas.

Extrato etanólico: 60 g de cada uma das plantas frescas permaneceram em frascos âmbar com 200 mL de etanol PA por 15 dias. Após este período, a mistura foi filtrada e o filtrado levado ao evaporador rotatório para a obtenção do extrato bruto.

Avaliação in vitro da atividade biológica do óleo essencial e dos extratos vegetais sobre o crescimento

micelial de *S. sclerotiorum*: O óleo essencial foi autoclavado e diluído em meio de cultura BDA para alcançar as concentrações 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 e 0,50%. Para os extratos autoclavados, as concentrações foram de 5; 10; 15 e 20%. Sobre a superfície do meio enriquecido com o óleo ou os extratos, em placa de Petri, foi colocado centralmente um disco (0,5 cm de diâmetro) de ágar colonizado pelo fungo. As testemunhas não apresentavam óleo ou extratos. As placas foram incubadas em BOD, a 25° C, por 7 dias. As avaliações foram feitas aos 3, 7 e 14 dias de incubação através das medidas dos diâmetros da colônia de crescimento do fungo.

Teste de patogenicidade de *S. sclerotiorum*: para a formação de um inóculo foi feita uma suspensão lavando-se com água destilada e autoclavada e com o auxílio de uma alça de Drigalski, placas de manutenção do isolado de *S. sclerotium*. A concentração da suspensão foi ajustada para 1.10⁶ escleródios por ml, por meio de diluição quando necessário. As sementes de alface foram semeadas no substrato comercial Plantmax® autoclavado, em bandejas plásticas medindo 29 cm x 43 cm, mantidas em estufa por 14 dias para enraizamento. Decorrido este período, as plântulas foram retiradas das bandejas e suas raízes lavadas em água corrente para retirada do substrato. As mudas de alface, com 14 dias de idade, foram transplantadas para o substrato colonizado pelo patógeno.

Para o tratamento testemunha, foram utilizadas apenas água destilada e autoclavada. Cada tratamento foi avaliado em 10 plantas, com duas repetições. A avaliação da incidência da doença foi realizada em 15 e 30 dias. Para confirmação da morte por mofo branco, as plantas que apresentaram sinais da doença foram tratadas com uma solução aquosa de álcool 70% por 60 segundos, sendo em seguida imersas em solução de hipoclorito (10%) durante 1 minuto, deixadas para secar em capela e colocadas em placas de Petri contendo meio BDA. Após o desenvolvimento de colônias, as estruturas de crescimento e reprodução do fungo foram observadas ao microscópio ótico, de acordo com ALFENAS & MAFIA (2007).

Avaliação *in vivo* da atividade biológica do óleo essencial de pariparoba e dos extratos etanólicos de pariparoba e pata de vaca: estes experimentos foram realizados em casa de vegetação no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, somente para os melhores resultados das concentrações *in vitro*. Para a produção de inóculo primário do fungo 5 mL de uma suspensão de propágulos do fungo (1.10⁶/mL) foi misturado a 100 g de

grãos úmidos e esterilizados de arroz, em sacos plásticos. Após sete dias de colonização em temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas, o arroz foi incorporado na proporção de 20 g/kg ao substrato de enraizamento das plantas conforme MELO & VALARINI (1995). A concentração final de conídios foi determinada em Câmara de Neubauer a partir de uma suspensão feita com 1g de substrato em 10 mL de solução salina, e a viabilidade foi avaliada em meio BDA, como UFC. No período de 15 dias o fungo colonizou o substrato e formou grande quantidade de escleródios. Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de 50 plantas cada. As mudas de alface, com 14 dias de idade foram transplantadas para o substrato colonizado com o patógeno e, em seguida foram realizados os experimentos 1 e 2. Experimento 1 - Óleo essencial de pariparoba: logo após o transplante, o óleo foi aplicado nas concentrações de 0,10; 0,20 e 0,50%, constituindo 4 tratamentos. As aplicações dos tratamentos foram feitas por aspersão uma vez por semana até completar 30 dias. Foram feitos dois controles: solo livre de patógeno e solo com patógeno.

Experimento 2 - Extratos etanólicos de pariparoba e pata de vaca. Logo após o transplante, os extratos foram aplicados através de pulverização na concentração de 20% (20 g do extrato em 100 ml de água destilada), uma vez por semana até completar 30 dias. Foram feitos dois controles: solo livre de patógeno e solo com patógeno.

Análise estatística dos dados:

Os resultados foram analisados pela via regressão, utilizando-se o programa computacional SPSS 17.0.

Resultados e Discussão

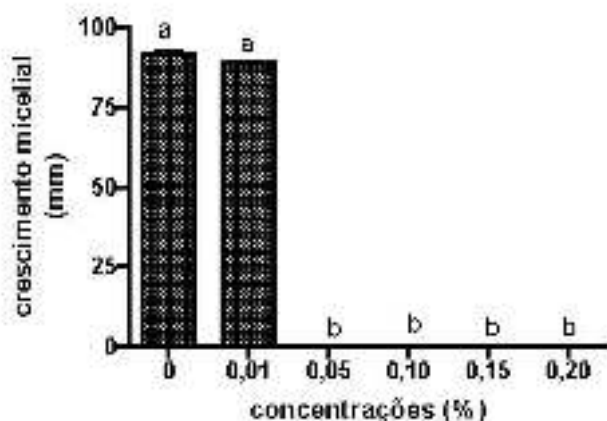
Teste de Patogenicidade: a patogenicidade do isolado foi confirmada pela morte de todas as plântulas inoculadas e desenvolvidas em casa de vegetação e, pelo re-isolamento do agente causal da doença a partir das plantas mortas em meio BDA.

Rendimento e composição química do óleo essencial de Pariparoba: o rendimento do óleo essencial de Pariparoba foi de 0,32% em peso da matéria prima e os compostos químicos identificados em maior proporção foram germacreno-D (30,26%), α -selineno (8,29%), δ -cadineno (7,83%), E-cariofileno (7,25%), γ -muroleno (4,0%), δ -elemeno (3,23%) e espatulenol (2,57%), compreendendo 63% do total identificado.

Testes *in vitro* com o óleo essencial de pariparoba: os dados apresentados na Figura 1 demonstram que o

essencial de pariparoba inibiu o desenvolvimento do fitopatógeno a partir da concentração de 0,05%, em relação ao controle durante os 14 dias de experimento. NGUEFACK et al. (2004) relataram o efeito fungicida do óleo essencial de capim limão sobre o crescimento micelial de diversos fungos, com redução de 64% do desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm, *Aspergillus flavus* em 48% e *Aspergillus fumigatus* em 77% na concentração de 500 ppm, além de inibição total em 300 ppm para *F. moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus*. RANASINGHE et al. (2002) também relataram que o óleo de cravo mostra ação antifúngica contra os fungos *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium proliferatum*, isolados de bananeira.

Figura 1: Efeito in vitro do óleo essencial de Pariparoba sobre o desenvolvimento do fitopatógeno *S. sclerotiorum* no 14º dia de crescimento micelial (mm).



concentrações não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Testes in vitro com os extratos vegetais: os testes com os extratos etanólico das plantas pariparoba e língua de vaca (20%) inibiram totalmente o desenvolvimento do fitopatógeno, sendo que os extratos infusão e aquoso não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle nem mesmo entre eles, nas condições dos tratamentos. RIBEIRO (1999) relata que talvez seja possível a inibição do fitopatógeno em concentrações maiores de extratos, por haver uma redução crescente do desenvolvimento fúngico e proporcional ao aumento das concentrações para os extratos utilizados.

Testes in vivo: os dados alcançados com o extrato etanólico de Pariparoba (20%) sobre a incidência da

doença em alface, apresentados na Tabela 1, sugerem que este tratamento não foi eficiente na redução da doença. Na Tabela 2, os dados apresentados demonstram a incidência da doença em alface nos tratamentos com o óleo essencial de Pariparoba a 0,10%, 0,20% e 0,50%. Na concentração 0,50% de óleo essencial, apenas 20% das plantas apresentaram a doença quando comparado aos outros tratamentos. Desta forma, este dado indica um efeito protetor na ordem de 80% para o óleo essencial de pariparoba. Óleos essenciais de canela, capim-limão, cravo, eucalipto, malaleuca e menta já foram relatados como eficientes no controle de *Alternaria solani*, agente etiológico da pinta-preta do tomateiro, tanto em condições *in vitro* como em condições de campo (ABREU, 2005). O efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* também já foi relatado como eficiente no controle do mofo cinzento do morangueiro (LORENZETTI, 2011) e, o óleo essencial de menta foi considerado eficiente na concentração de 1.000 mg/L, no combate aos patógenos de pós-colheita em citrus, inibindo em 36,8% e 59,4% o crescimento micelial de *Penicillium italicum* e *Alternaria citri* respectivamente (AZIZI et al., 2008). MELLO et al. (2005) e GARCIA (2012) também verificaram que o óleo de neem, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 2%, reduziu o crescimento micelial e formação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

Tabela 1. Incidência do fitopatógeno *S. sclerotiorum* em alface após aplicação dos tratamentos: A) logo após o transplante, o extrato foi aplicado na concentração de 20%; B) (Controle 1) Solo livre de patógeno; C) (Controle 2) Solo com patógeno.

Treatment	Extrato etanólico de Pariparoba (20%)	Solo livre de patógeno	Solo com patógeno
Incidência do fitopatógeno (%)	100 a	0 b	100 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Conclusões

Este estudo permitiu evidenciar a atividade do óleo essencial de *Piper mikianium* (pariparoba) sobre o isolado de *S. sclerotiorum*, em relação ao controle da podridão de esclerotinia em alface.

Tabela 2. Incidência da doença de mofo branco em alface após aplicação dos tratamentos realizados logo após o transplante da plantulas, com diferentes concentrações do óleo essencial de Paribaroba: 0,10%; 0,20%; 0,50%; testes com o solo livre de patógeno e testes com o solo + patógeno.

Tratamentos	Concentração de 0,10% de óleo essencial	Concentração de 0,20% de óleo essencial	Concentração de 0,50% de óleo essencial	Solo sem patógenos	Solo com patógeno
Incidência da doença <i>S. sclerotiorum</i> (%)	100a	100a	20b	0c	100a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os extratos vegetais, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não afetaram o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. Estudos adicionais, abordando o sinergismo entre óleos essenciais, frações majoritárias e diferentes concentrações de óleos e extratos devem ser avaliadas no controle de *S. sclerotiorum* em alface.

Referências bibliográficas

- ABREU, C.L.M. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais. **Plant Pathology**, p. 530, 2005.
- ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Minas Gerais: UFV, 22.ed., p. 382, 2007.
- ATTI-SANTOS, A.C. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p.154-159, 2010.
- AZIZI, M. et.al. Inhibitory effect of some medicinal plants essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. **Acta Horticulturae**, p. 279-286, 2008.
- GARCIA, R. A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57, Jan./Feb. 2012.
- LORENZETTI, E.R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 13, p. 619-627, 2011.
- MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agrícola**, v. 52, n.2, p.326-330, 1995.
- MELLO, A. F. S. et al. Alternative products in the *in vitro* inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 179-183, 2005.
- NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 329-334, 2004.
- RANASINGHE, L. et al. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n.3, p. 208-211, 2002.
- RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.4, p.1267-1271, 1999.
- SCHWAN-ESTRADA, K,R,F,. et al. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36, 2003, Uberlândia: **ANAIS SBF**, 2003. p. 54-56.