

Ação do extrato de alecrim contra *Phytophthora* sp. e *Fusarium solani*

Eloisa Lorenzetti¹; Alfredo José Alves Neto²; Itamar Ferreira da Silva³; José Renato Stangarlin⁴

Resumo: Inúmeras doenças afetam a cultura da mandioca, como as podridões radiculares, tendo como alguns causadores o fungo *Phytophthora* sp. e *Fusarium solani*, que acarretam severos danos na produção da raiz causando grande impacto social visto que essa cultura possui elevada relevância econômica por ser a principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países em desenvolvimento. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do extrato de alecrim nas concentrações de 0%, 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10% contra *Phytophthora* sp e *F. solani*. Foi realizado ensaio in vitro a fim de analisar o crescimento micelial do fungo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições. Para a área final de colônia de *Phytophthora* sp. houve redução de até 84,71% pelo extrato. Para a área abaixo da curva de crescimento micelial a redução foi de até 98,65%. Para a área final de colônia de *F. solani* houve redução de até 65% pelo extrato de alecrim. Para a área abaixo da curva de crescimento micelial a redução foi de até 62,89%. No entanto, houve incremento para número de esporos por cm² de colônia. Esses resultados indicam o potencial antimicrobiano parcial do extrato de alecrim contra *F. solani*. Esses resultados apontam o potencial antimicrobiano do extrato de alecrim.

Palavras-chave: Controle Alternativo; podridão radicular; *Rosmarinus officinalis*.

Action of rosemary extract against *Phytophthora* sp. and *Fusarium solani*

Abstract: A number of diseases affect cassava, such as root rot, with *Phytophthora* sp. and *Fusarium solani*, which cause severe damage to root production, causing great social impact since this culture has high economic relevance as it is the main source of carbohydrates for millions of people, mainly in developing countries. Thus, this work had as objective to verify the effect of rosemary extract in the concentrations of 0%, 1%; 2.5%; 5%; 7.5% and 10% against *Phytophthora* sp and *F. solani*. An *in vitro* assay was performed to analyze mycelial growth of the fungus. The experimental design was in randomized blocks, with four replications. For the final colony area of *Phytophthora* sp. There was a reduction of up to 84.71% by the extract. For the area below the mycelial growth curve the reduction was up to 98.65%. For the final colony area of *F. solani* there was reduction of up to 65% by the rosemary extract. For the area below the mycelial growth curve the reduction was up to 62.89%. However, there was an increase in number of spores per cm² of colony. These results indicate the partial antimicrobial potential of rosemary extract against *F. solani*. These results point to the antimicrobial potential of rosemary extract.

¹ Engenheira Agrônoma (UNIOESTE). Mestre em Agronomia (UNIOESTE). Doutoranda em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon – Paraná – Brasil. eloisa-lorenzetti@hotmail.com;

² Engenheiro Agrônomo (FAG). Mestre em Agronomia (UNIOESTE). Doutorando em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon – Paraná – Brasil. alfredo.alves.neto@hotmail.com;

³ Engenheiro Agrônomo (PUC-PR). Mestrando em Agronomia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Minas Gerais – Brasil. itamarfers@hotmail.com;

⁴ Doutor em Agronomia (ESALQ). Docente Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon – Paraná – Brasil. jose.stangarlin@unioeste.br.

Key words: Alternative Control, Root rot, *Rosmarinus officinalis*.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de grande importância socioeconômica, cultivada em todas as regiões brasileiras (IBGE, 2014). O Brasil possui 2.312.378 milhões de hectares de mandioca e é um dos maiores produtores mundiais dessa raiz, que devido a sua fácil adaptação pode ser cultivada em todos os estados brasileiros. (FRAIRE FILHO e BAHIA, 2010).

Entre as doenças desta cultura, as mais comuns são as podridões radiculares, que podem causar a morte rápida das plantas infectadas interferindo no desenvolvimento da cultura e afetando diretamente a qualidade do produto final comercializado (LOZANO, 1989). As podridões radiculares podem ser causadas por fungos patogênicos como os do gênero *Fusarium*, que vivem no solo (MICHEREFF *et al.*, 2005), ou também por *Phytophthora* sp. (LIMA *et al.*, 1993), fungo que provoca queda progressiva na produtividade, além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (SERRA *et al.*, 2009).

Devido ao grau de periculosidade das podridões causadas por ambos patógenos, faz-se necessário o seu controle, nesse contexto, a agricultura alternativa está sendo estudada com o intuito de buscar uma forma de baixo custo para o agricultor e que proporcione melhor qualidade de vida, tanto para agricultores quanto consumidores (HAMERSCHMIDT *et al.*, 2012).

Os extratos vegetais têm sido relatados como potentes fungicidas naturais, onde os resultados alcançados são promissores para a utilização prática no controle de diversos fitopatógenos (GARCIA *et al.*, 2012). Diversos trabalhos vêm mostrando que algumas plantas podem possuir em sua composição substâncias biologicamente ativas que possuem influência sobre o metabolismo de organismos, as quais as tornam tóxicas (CELOTO *et al.*, 2008) e uma dessas plantas que vem sendo estudada é o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), tendo como princípios ativos substâncias como os óleos essenciais na forma de alfa e beta-pineno, limoneno, canfeno, mirceno, entre outros (GACHKAR *et al.*, 2007) e com atividade antimicrobiana comprovada em inúmeros trabalhos.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo verificar possível efeito fungitóxico do extrato de folhas frescas de alecrim sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo fitopatogênico *Phytophthora* sp. e verificar a atividade antimicrobiana do extrato de alecrim contra *Fusarium solani*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, PR, sendo o isolado de *Phytophthora* sp. proveniente da Micoteca desse laboratório e o fungo *Fusarium solani* foi isolado a partir de raiz de mandioca acometida pela doença e encontrada em uma lavoura do interior deste município.

Para a obtenção do extrato de alecrim foram trituradas em liquidificador durante 2 min, 50 g de folhas, cuidadosamente destacadas da haste, com 450 mL de água destilada, segundo metodologia descrita por Stangarlin *et al.* (1999). O triturado foi filtrado em peneiras de controle granulométrico de 48, 200 e 400 Mesh respectivamente, sempre tomando o cuidado de espremer o bagacilho para aproveitamento de todo o líquido. O bagaço que ficou retido nas peneiras após serem espremidos foi descartado. Após, o líquido ainda passou por uma filtragem a vácuo usando papel de filtro com 90 mm de diâmetro e 11 µm de diâmetro de poro. O extrato final foi coletado e através de diluições foram obtidas as concentrações de 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10%.

Para determinar a atividade antimicrobiana foi utilizado o meio BDA (batata, dextrose e ágar) acrescido dos extratos de alecrim a 0%, 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10%. O meio foi autoclavado a 120 °C e 1 atm durante 20 min e vertido em placas de Petri. Após total solidificação do meio foi repicado um disco de 0,5 cm de meio de cultura contendo o fungo *Phytophthora* sp. no centro de cada placa. As placas foram vedadas e mantidas em câmara com controle de temperatura e fotoperíodo a 25 °C. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o fungo *F. solani*.

Para fungo *Fusarium solani*, após 24 h foram iniciadas as medições, conforme metodologia descrita por Lorenzetti *et al.* (2013), através das medidas diametralmente opostas, a fim de avaliar o diâmetro da colônia e, posteriormente, calcular a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM). A área final de colônia (AFC) foi determinada sete dias após a repicagem do fungo, utilizando a mesma metodologia citada para as avaliações da AACCM.

Para *Phytophthora* sp. após 48 h, assim que o fungo mostrou os primeiros sinais de crescimento do micélio, foram iniciadas as medições utilizando a mesma metodologia descrita para *Fusarium solani*. As medições foram realizadas diariamente, durante sete dias a fim de avaliar o diâmetro da colônia e, a partir desses resultados, foi calculada a AACCM.

Como o fungo *Fusarium solani* produz esporos, foi avaliado o número de esporos por placa obtido a partir da contagem dos esporos em microscópio utilizando a câmara de Neubauer. O número de esporos por cm² de colônia foi obtido utilizando a relação entre o número de esporos por paca e a área final da colônia sendo esses valores expressos esporos por cm² de colônia.

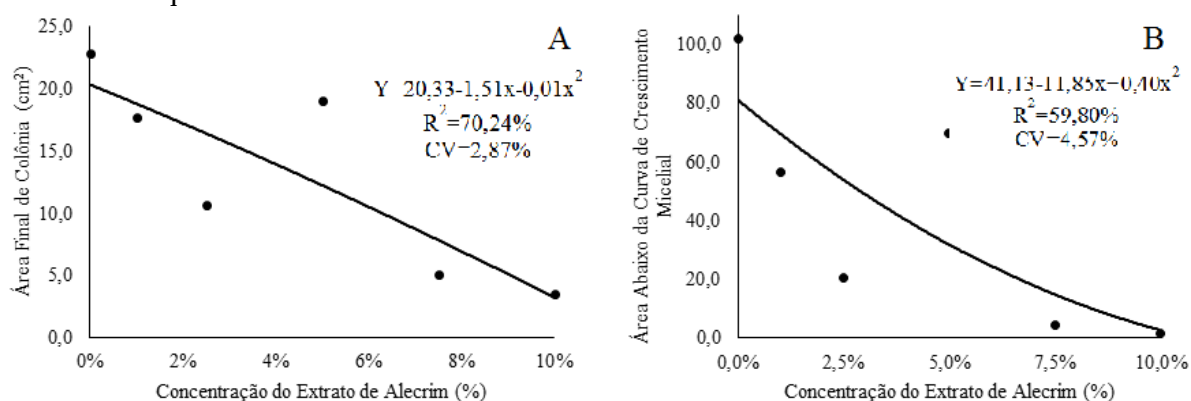
Para ambos os fungos utilizados, o delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições. A análise de variância foi obtida utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2000) e as médias submetidas à análise de regressão ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

O efeito das concentrações do extrato de alecrim sobre a área final de colônia (AFC) de *Phytophthora* sp., conforme figura 1A, foram representadas por equação quadrática com redução de até 84,71% no crescimento. Essa máxima redução foi atingida próximo a maior concentração de extrato de alecrim utilizada neste experimento (10%).

Para área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) conforme figura 1B, as concentrações do extrato de alecrim tiveram comportamento representado por equação quadrática parecido com o encontrado para AFC. A redução da área abaixo da curva de crescimento micelial foi de até 98,65%, um número muito expressivo que demonstra que o extrato de alecrim interferiu no desenvolvimento de *Phytophthora* sp. *in vitro*. A concentração que demonstrou essa máxima redução da AACCM, assim como para AFC, foi próxima a concentração de extrato de alecrim 10%, ou seja, a maior concentração do extrato de alecrim testada nesse trabalho.

Figura 1 - Área final de colônia (AFC) (A) e Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) (B) de *Phytophthora* sp. em meio BDA com concentrações de extrato aquoso de folhas de alecrim.

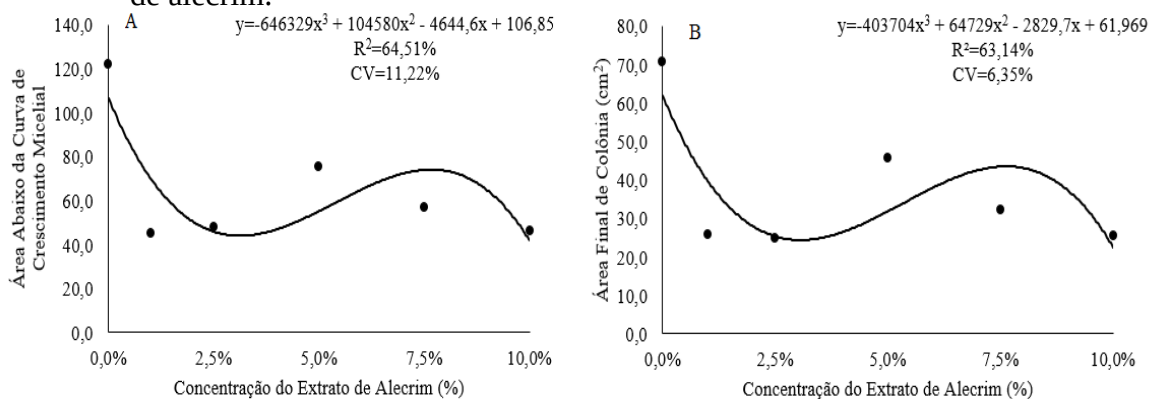


Os resultados obtidos mostram que utilizando alecrim em concentração próxima a 10% ocorre a diminuição significativa tanto da AFC quanto da AACCM. Testes com essa concentração de extrato de alecrim devem ser realizados a campo a fim de confirmar essa ação antimicrobiana do extrato, disponibilizando assim, uma alternativa adicional para os mandiocultores, principalmente os praticantes da agricultura orgânicas. Esses resultados sustentam a hipótese de que o alecrim possui ação antimicrobiana e isso pode ser devido a presença de compostos presentes na composição de suas folhas (GACHKAR *et al.*, 2007).

Através da Figura 2A, observa-se que as concentrações do extrato de alecrim para a área final de colônia (AFC) de *Fusarium solani* foram representadas por equação cúbica com redução de até 65% se comparado a concentração 0%, ou seja, apenas BDA. Essa máxima redução foi atingida em concentração de extrato de alecrim próxima a 7,5%.

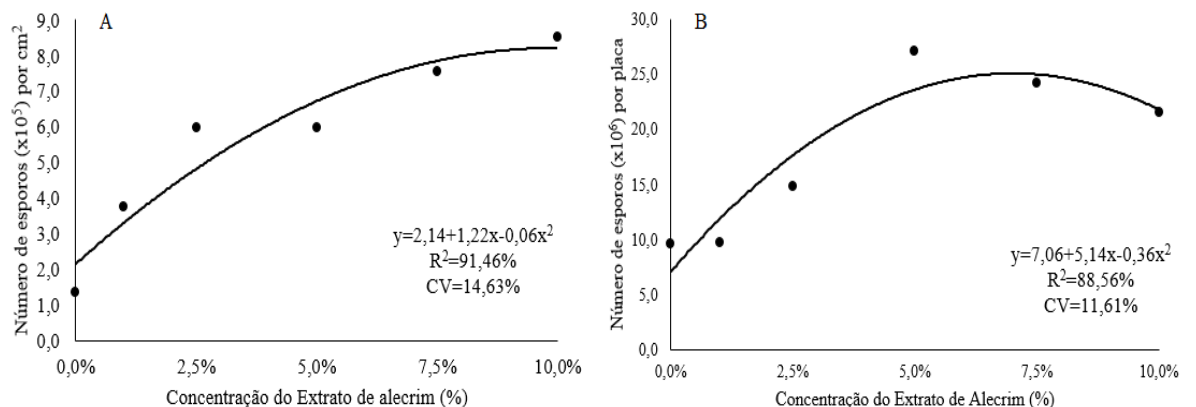
Para área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), conforme se observa na Figura 2B, as concentrações do extrato de alecrim tiveram comportamento representado por equação cúbica parecida com o encontrado para AFC. A redução da área abaixo da curva de crescimento micelial foi de até 62,89% se comparado a concentração 0%. A concentração que demonstrou essa máxima redução da AACCM foi próxima de 7,5% de extrato de alecrim.

Figura 2 - Área final de colônia (AFC) (A) e área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) (B) de *Fusarium solani* em meio BDA com concentrações de extrato de alecrim.



Para o número de esporos por cm^2 (Figura 3A) e número de esporos por placa de Petri (Figura 3B) as concentrações do extrato de alecrim novamente foram apresentadas através de equação quadrática, no entanto, se verificou incremento na produção de esporos pelo extrato.

Figura 3 - Número de esporos ($\times 10^5$) por cm^2 (A) e número de esporos ($\times 10^6$) por placa de Petri (B) de *Fusarium solani* em meio BDA com diferentes concentrações de extrato de alecrim.



Esse incremento observado na produção de esporos pelo fungo pode ter ocorrido devido ao fato de o alecrim possuir algum composto ou ter alguma ação sobre o fungo deixando este estressado, como foi observado através da inibição do crescimento micelial. Diante dessa condição de estresse, o fungo pode incrementar a esporulação para garantir a perpetuação da espécie.

Resultados semelhantes foram obtidos por Soyly *et al.* (2006) e Díaz Dellavalle *et al.* (2011) utilizando extratos de *R. officinalis* sobre o crescimento de *Alternaria* spp., o que sustenta a hipótese de que o alecrim possui ação antimicrobiana e isso pode ser devido a presença de substâncias como: óleos essenciais na forma de alfa e beta-pineno, limoneno, canfeno, mirceno, terpenóides como o carnosol e o ácido oleânico, flavonóides como a apigenina, a diosmetina, a diosmina e a genkwanina, isoflavonóides como fitoalexinas, além de outros compostos como 1,8 cineol, α -pineno, borneol e cânfora (GACHKAR *et al.*, 2007).

Conclusões

O extrato de alecrim nas concentrações testadas mostrou efeito fungitóxico contra *Phytophthora* sp. O extrato de alecrim foi capaz de inibir o crescimento micelial nas concentrações testadas o que demonstra seu potencial antimicrobiano, porém incrementou a produção de esporos pelo fungo.

Referências

- CELOTO, M.I.B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- DÍAZ DELLAVALLE, P.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; FERREIRA, F.; RIZZA, M.D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, p. 231-239, 2011.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In Anais da 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos, São Paulo, Brasil, 2000.

FRAIFE FILHO G.A., BAHIA J.J.S., **Mandioca.** CEPLAC/CEPEC, BA. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm>>. Acessado em: 26 de out. de 2010.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, Tehran, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

HAMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; POPIA, A.F.; ASSIS, O. **Manual de olericultura orgânica.** Curitiba: Emater, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-LPSA.** Rio de Janeiro, 2014.

LIMA, M.F., REIFSCHNEIDER, F.J.B., TAKATSU, A.; FONSECA, M.E.N. Caracterização de isolados de *Phytophthora* de mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 416-424, 1993.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J.R.; COLTRO, S.; TOLEDO, M.M.; KUHN, O.J.; RISSATO, B.B. Control of *Macrophomina phaseolina* with homeopathic drugs. II International Conference on Homeopathy in Agriculture. Maringá/PR. **Anais...** Maringá: Set., 2013.

LOZANO, J.C. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, p.7-11, 1989.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais.** Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.377-398, 2005.

SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S. da; NASCIMENTO, F.S.; LIMA, L.K.F. *Scybalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.4, p.327-328, 2009.

SOYLU, E.M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v. 161, p. 119-128, 2006.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 11. p. 16-21, 1999.