



Extratos fitoquímicos de plantas medicinais visando o controle *Sclerotinia sclerotiorum* e de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

*Phytochemical extracts of medicinal plants to control *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae**

FERRAZ, Leila C. Loubach¹; SILVA, Gilma A. da²; MATRANGOLO, Walter J. R.³; FREITAS, Mateus Balmant⁴; CARLOS, Lanamar A.⁵; FREITAS, Diego A. França⁶
¹Dept. Ciências Agrárias DCIAG, UFSJ-Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas-MG, e-mail: loubach@ufsj.edu.br; ²DCIAG-UFSJ, Sete Lagoas, e-mail: gilmaasilva@hotmail.com; ³EMBRAPA Milho e Sorgo Sete Lagoas, e-mail: walter.matrangolo@embrapa.br; ⁴DCIAG-UFSJ, Sete Lagoas, e-mail: teus.bfreitas@gmail.com; ⁵Dept. Alimentos, UFSJ, Sete Lagoas, e-mail: lanamar@ufsj.edu.br; ⁶UFV-Universidade Federal de Viçosa, Florestal, e-mail: diegofranca@ufv.br

RESUMO EXPANDIDO

Eixo temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) é um patógeno que causa perdas em várias culturas, e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOL) tem causado murcha em alface. Foram testadas *in vitro* a ação antifúngica de fitoquímicos dos extratos de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (BB) (etanólico e aquoso), Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) (CI), óleo essencial de Hortelã (*Mentha arvensis*) (HO) e de *Melaleuca alternifolia* (MA); a estes fitopatógenos, comparados ao fungicida e ao meio BDA. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento. Foram feitas leituras para o diâmetro das hifas para SS e FOL, e do número de escleródios para SS. Notou-se que os extratos de HO, CI, MA, BB (etanólico) apresentaram resultados significativos no controle de SS. Para o FOL foram promissores os extratos de HO e CI (superiores) e BB (etanólico e aquoso) e MA (intermediários). As plantas estudadas foram promissoras para o uso no cultivo agroecológico visando o manejo destes fitopatógenos.

Palavras-chave: mofo-branco, murcha de fusarium, atividade antifúngica.

Introdução

O uso de extratos de plantas medicinais pode ser recomendado no manejo de doenças de plantas em sistemas orgânicos de cultivo. Extratos e óleos essenciais oriundos de tais plantas têm demonstrado seu potencial efeito como fungicidas naturais, a depender da concentração utilizada. Este procedimento, poderá trazer inúmeros benefícios para quem produz alimentos livres de resíduos de pesticidas químicos quando cultivados nos sistemas orgânico e agroecológico.

No presente estudo foram escolhidos dois óleos essenciais comerciais (*Mentha arvensis* e *Melaleuca alternifolia*) por serem de fácil acesso. A planta de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foi escolhida por ser medicinal e abundante naturalmente no local de estudo, e o extrato de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) já tinha sido estudado anteriormente pelos autores, com potencial ação antifúngica demonstrado.



Sclerotinia sclerotiorum é um fungo de ampla ocorrência em todo o mundo, polífago, e que ataca diversas culturas de interesse econômico. O patógeno tem capacidade de formar estruturas de resistência (escleródios) que garantem a sua sobrevivência no solo por vários anos, tornando-o de difícil controle (REICH; SYAMA, 2023).

A fusariose pode causar doenças de grande importância econômica que afetam diversas culturas agrícolas. Na cultura da alface no Brasil, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, é aquela que tem causado perdas com a murcha, afetando sua produtividade e qualidade das plantas (CABRAL *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi testar os efeitos dos fitoquímicos de plantas medicinais selecionadas visando a inibição do crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* (SS) e de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOL).

Metodologia

O experimento foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de São João Del Rei – *Campus* Sete Lagoas. Foi testada a ação antifúngica contra SS e FOL, dos fitoquímicos das seguintes plantas e formulações: extrato etanólico e aquoso de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (BB), óleo essencial de Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) (CI) e óleo essencial Hortelã (*Mentha arvensis*) (HO); óleo essencial *Melaleuca alternifolia* (MA). Todos extratos e óleos essenciais foram utilizados na concentração de 1mg/mL, adicionados ao meio Batata dextrose-ágar (BDA). Foram utilizadas ainda uma testemunha positiva, que consistiu da adição de fungicida Tiofanato metílico (marca comercial Cercobin) na concentração de 0,70 mg/L ao meio BDA; e uma testemunha negativa, a qual consistiu de placa contendo apenas meio BDA.

Preparo dos extratos etanólico e aquoso de Barbatimão (BB): Cascas da planta foram coletadas no *Campus* da UFSJ-CSL, em seguida desidratadas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C por 48 horas e obtidos um pó das cascas a partir de trituração em moinho de facas tipo Willye.

Para o extrato etanólico de BB o procedimento se deu a partir deste pó, onde foi feita a maceração, deste por 2 a 3 vezes (o volume do pó) colocado em erlenmeyer com álcool etanólico absoluto (p.a.). Este material descansou por cinco dias ao abrigo de luz, vedado. Em seguida foi realizada a filtragem em papel de filtro estéril com auxílio de um funil em um frasco de vidro. Em seguida o resíduo sólido foi descartado e o filtrado foi deixado descansando no frasco destampado para evaporação do álcool na capela por 17 dias na temperatura ambiente até a secagem total do extrato. Foram incubadas por mais 2 dias em estufa na temperatura de 40^o C, depois à 70^o C por 24 horas até a secagem total do material, obtendo-se o extrato etanólico.



Para o extrato aquoso de BB foram utilizadas 2 g do pó das cascas da planta, como descrito anteriormente, solubilizado em 80 mL de água destilada num frasco de erlenmeyer (125 mL). Esse frasco foi agitado na Incubadora Shaker Refrigerada por 30 minutos. O material foi então filtrado em filtro esterilizado e passado para dois tubos falcon, posteriormente foram levados para a Centrífuga Refrigerada (NT825) a 3500 rpm por 15 minutos. Este líquido obtido foi novamente filtrado, obtendo 40 mL de filtrado, que foi adicionado a 210 mL de meio BDA estéril em temperatura fundente.

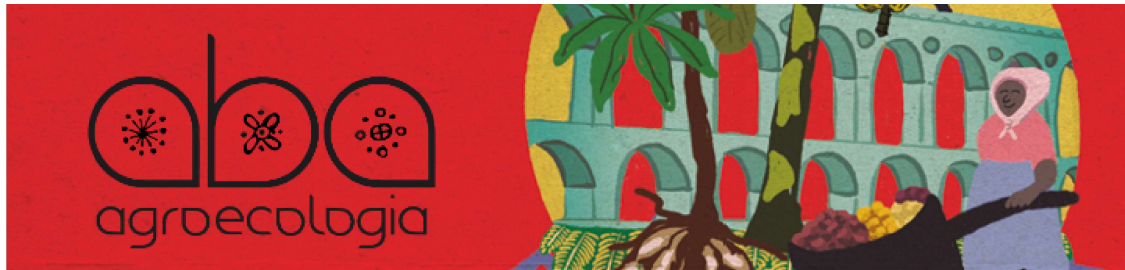
O extrato do Cravo-da-Índia (CI) foi obtido a partir de uma amostra comercial de inflorescências secas, desidratadas, adquirida em um mercado local. Foi realizada a extração através da maceração utilizando acetona (p.a.) como solvente por 7 dias.

Óleos essenciais de Hortelã (HO) e *Melaleuca alternifolia* (MA) foram obtidos pela fabricante *Consciência do cerrado* – Sítio Entoá (lote 06-2015).

Preparo do inóculo SS: Os escleródios utilizados de SS foram obtidos a partir da micoteca da UFSJ. Estes escleródios foram multiplicados previamente em meio cenoura + fubá (FERRAZ; CAFÉ FILHO, 1998). Após de 30 dias de preparo neste meio foram submetidos a lavagens em água corrente com auxílio de peneiras, e assim separados os escleródios. Estes foram secos sob papel em temperatura ambiente, depois, foram então desinfetados em uma solução de álcool a 70% (1 min.), hipoclorito de sódio a 1% (1 min.), enxaguados em água destilada, e secos novamente sobre papel de filtro estéril. Depois estes escleródios foram depositados em meio de BDA em placas de petri, e incubados a 21° C no escuro por sete dias.

Preparo do inóculo FOL: Foram coletadas plantas de alface com sintomas de fusariose. Foram feitos isolamentos a partir das raízes das plantas que apresentavam sintomas, e identificados em microscópio para verificar se seria o fungo em estudo. Para a obtenção do inóculo, o isolado selecionado foi crescido em meio BDA com antibiótico e inoculado a 24° C por sete dias, fotoperíodo 12 h luz/escuro, e foram conferidos se tratar do fungo em questão a partir de protocolo de microscopia.

Preparo dos tratamentos: Foram colocados 500 mL de BDA em erlenmeyer que depois foram esterilizados em autoclave à 127° C por 20 min. Em temperatura fundente foram acrescidos neste meio os diferentes tratamentos estudados na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e estes foram solubilizados em Tween 20 com cerca de 10 mL. Depois disso, eles foram vertidos em placas de Petri. Foi colocado 1 disco de micélio do fungo produzido anteriormente sobre o meio em placa. Estas foram incubadas por 10 dias a 24 °C ± 2 em estufa tipo BOD no escuro. Após 24 horas realizou-se a primeira avaliação, e após 5 e 8 dias mediu-se o tamanho radial da colônia de cada placa separadamente. Após 30 dias foi realizada a contagem do número de escleródios formados para SS. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (cada placa de Petri configurou uma repetição) por tratamento, comparados a duas testemunhas: meio BDA (positiva) e



meio MDA + fungicida (negativa). Os ensaios foram realizados em diferentes etapas para ambos os fitopatógenos, sendo que nos tratamentos com óleos essenciais de Hortelã (HO), *Melaleuca* (MA) e extrato acetônico de Cravo-da-Índia (CI) foi realizado no primeiro ensaio, e os extratos etanólico e aquoso de barbatimão no segundo ensaio.

Resultados e Discussão

As análises feitas para o crescimento de SS de acordo com os extratos de HO, MA, CI e BB (etanólico) apresentaram resultados significativos reduzindo drasticamente o crescimento micelial e também a produção de escleródios, resultados estes semelhantes ao controle feito pelo fungicida (Tabela 1). O tratamento BB (aquoso) não diferiu da testemunha positiva quanto a germinação e o número de escleródios produzidos, indicando que este extrato não teve propriedade antifúngica para SS. Possivelmente, a concentração estudada do extrato aquoso de BB foi insuficiente para reduzir o crescimento de SS no presente estudo.

No que se refere ao crescimento de *FOL*, os extratos de HO e CI apresentaram resultados significativos reduzindo drasticamente o crescimento micelial, resultados estes semelhantes ao controle feito pelo fungicida (Tabela 2). O tratamento MA teve resultado intermediário diferindo da testemunha positiva. Os resultados de BB etanólico e aquoso foram intermediários na eficiência de controlar *FOL*, diferindo tanto da testemunha negativa (fungicida) como da positiva (meio BDA). Estes resultados indicam que os tratamentos HO e CI foram os mais promissores no controle *in vitro* de *FOL*. Indica ainda que ambos extratos BB e MA apresentaram resultados intermediários.

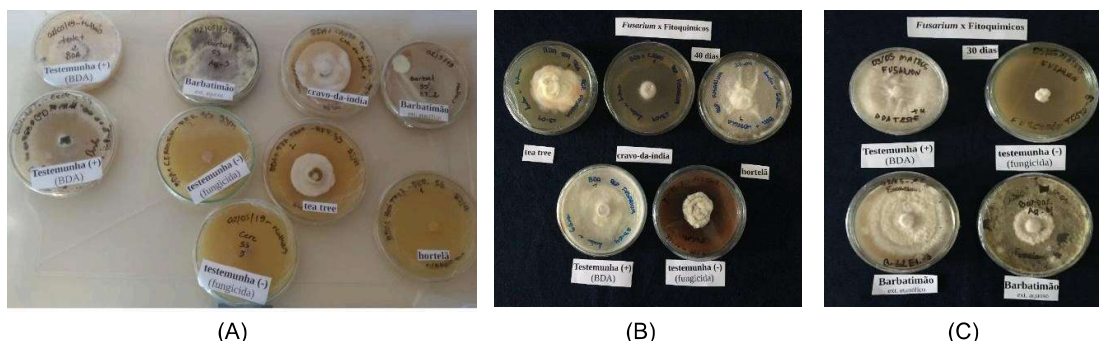
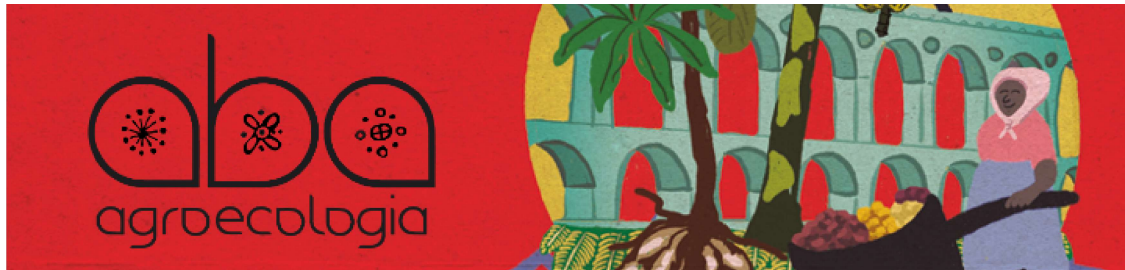


Figura 1: Aspecto do crescimento micelial de SS após 30 dias (A) e de *FOL* após 10 dias (B e C) nos tratamentos com os óleos essenciais de Hortelã, *Melaleuca*, e extrato acetônico de Cravo-da-Índia, e extratos aquosos e etanólicos de barbatimão, comparados as testemunhas, fungicida e meio de cultura BDA

Resultados semelhantes no que diz a respeito à eficiência dos óleos essenciais no controle de doenças, tanto por sua ação fungitóxica que inibe o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela presença de compostos antimicrobianos foram relatados por Peixinho *et al.* (2017) que utilizando o óleo essencial de *Mentha arvensis* observaram efeito fungicida e fungistático sobre 23 patógenos fúngicos.



Outros autores observaram que o extrato de cravo da Índia apresentou propriedades antifúngicas a *Fusarium* em tomateiro (SHARMA et al. 2017).

Tabela 1: Crescimento médio micelial (colônia) (valor máximo 9cm) e do número de escleródios (N. Escl.) de *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) observados em condições *in vitro*. Os tratamentos foram extrato etanólico e aquoso de Barbatimão (BB), óleo essencial do Cravo-da-Índia (CI) e óleo de uma marca comercial de Hortelã (HO) e de *Melaleuca* (MA), e as testemunhas fungicida (negativa), e do meio BDA (positiva).

1º ensaio SS			2º ensaio SS		
Tratamentos	Colônia (cm)*	N. escl*	Tratamentos	Colônia (cm)*	N. escl*
Fungicida	0,00 a	0 a	Fungicida	0,00 a	0 a
HO	0,00 a	0 a	BB (etanólico)	0,00 a	2 a
MA	0,00 a	3 a	BB (aquoso)	9,00 b	15 b
CI	0,00 a	7 a	BDA	9,00 b	21 b
BDA	9,00 b	42 b	-	-	-

(*) Letras e números iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

Tabela 2: Crescimento micelial (colônia) (valor máximo 9cm) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (FOL) observados em condições *in vitro*. Os tratamentos foram extrato etanólico e aquoso de Barbatimão (BB), óleo essencial do Cravo-da-Índia (CI) e óleo de uma marca comercial de Hortelã (HO) e de *Melaleuca* (MA), e as testemunhas fungicida (negativa), e do meio BDA (positiva).

1º ensaio FOL		2º ensaio FOL	
Tratamentos	Colônias (cm)*	Tratamentos	Colônias (cm)*
HO	1,70 a	Fungicida	1,88 a
Fungicida	2,68 a	BB (aquoso)	3,62 b
CI	3,00 a	BB (etanólico)	5,80 c
MA	4,80 b	BDA	9,00 d
BDA	7,62 c		

(*) Letras e números iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%

Esses resultados demonstraram que a utilização de fitoquímicos de plantas medicinais para o combate de doenças causadas por SS e FOL podem ser promissores. Vale ressaltar a necessidade de mais estudos acerca de como essas substâncias fitoquímicas, além de se testar sua efetividade em diferentes concentrações e em condições de campo, visando o desenvolvimento de fungicidas naturais.

Conclusões

Os testes realizados com os óleos essenciais das plantas de Hortelã e *Melaleuca alternifolia*, extrato cetônico de Cravo-da-Índia e extrato etanólico de Barbatimão apresentaram resultados significativos e promissores no controle na redução e inibição *in vitro*, do crescimento das hifas e na produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* quando comparado os resultados do fungicida padrão.

Testes realizados com o óleo essencial de Hortelã e com extrato cetônico de Cravo-da-Índia apresentaram resultados significativos no controle *in vitro* do



crescimento das hifas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, e extratos etanólicos e aquosos de Barbatimão e óleo essencial de *Melaleuca* apresentaram resultados intermediários, mas todos superiores ao resultado do fungicida.

Os resultados encontrados aqui, indicam que estas plantas possuem potencial para estudos futuros relacionados ao manejo agroecológico de FOL e SS, se apresentando como possível alternativa ao uso de agrotóxicos com vistas à produção de alimentos saudáveis.

Referências bibliográficas

CABRAL, Cleia S.; BRUNELLI, Katia R.; COSTA, Helcio; FONSECA, Maria E. de N.; BOITEX, Leonardo S.; REIS, Ailton. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. **Tropical plant pathology** v. 39, n.3, p.197-202. 2014.

FERRAZ, Leila C. L.; CAFÉ FILHO, Adalberto C. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.3, p.364-365. 1998.

DE MELO, Raquel N.; GOES, Vivian F.F.; CANELLI, Amanda P.; ARO, Andrea A.; MOREIRA, Bruno o.; CORREIA, Jennifer R.; CATIRSE, ALMA B..C.E.B.; REIS, Andrea C.; COSTA, Sergio M.; GODOI, Ana P.T.Antibacterial Activity of Barbatimão (*Stryphnodendron Adstringens*) against Periodontopathogens and Cytotoxic Effects on Fibroblasts. **Letters in Applied Microbiology** v.76, n.6,2023, Web.

PEIXINHO, Georgia de S.; RIBEIRO Valtemir G.; AMORIM, Edna P. R. Ação do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa phytopathologica** v.43, n.1, p.32-35, 2017.

REICH, Jonathan; CHATTERTON, Syama. Predicting field diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*: A review. **Plant pathology** v.72, n.1, p.3-18. 2023.

SHARMA, Abhishek et al. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of bioscience and bioengineering** v.123, n.3, p.308-313. 2017.