

**inCiência**

Iniciação Científica  
Embrapa



# Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

**Embrapa**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Regina Caetano Quisen*  
Editora Técnica

**Embrapa**  
*Brasília, DF*  
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

69010-970

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

cpaa.sac@embrapa.br

**Unidade responsável pelo conteúdo:**

Embrapa Amazônia Ocidental

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *André Luiz Atroch, Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza Pereira.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

**1ª edição**

CD-ROM (2013): 100 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

Embrapa Amazônia Ocidental.

---

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (10. : 2013: Manaus, AM).

Anais... / X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental; editora: Regina Caetano Quisen. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.

1 CD-ROM : color. ; 4 ¾ pol.

ISBN 978-85-7035-340-5

1. Comunicação científica. 2. Iniciação científica. 3. Anais. I. Quisen, Regina Caetano. II. Título.

# Plantas Medicinais

## Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Piper aduncum* por Bioautografia Indireta no Controle de *Moniliophthora perniciosa*

Silvia Imaculada Barros da Rocha  
Cláudia Majolo  
Maria Geralda de Souza  
Francisco Célio Maia Chaves

### Resumo

O óleo essencial de *Piper aduncum* já teve sua atividade comprovada para o controle de *Moniliophthora perniciosa* – o agente causador da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro. Em função da grande perda econômica causada por essa doença, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *P. aduncum*, cultivado nas condições de Manaus, AM, sobre o fungo *M. perniciosa*, por meio da técnica de Bioautografia Indireta (BI), para avaliação dos componentes bioativos presentes nesse óleo, além da avaliação sobre o crescimento micelial do fungo com o óleo acrescido diretamente em meio de cultura. O óleo de *P. aduncum* apresenta



ação antifúngica sobre *M. pernicioso*, entretanto a ação dos componentes isolados desse óleo não pôde ser avaliada pela técnica de BI empregada, por causa de contaminação por outros fungos durante o crescimento micelial. Sugere-se, para estudos futuros, o isolamento inicial dos componentes do óleo e a aplicação em técnicas já padronizadas para avaliação de atividade antifúngica, sendo a BI mais indicada para bactérias ou fungos com rápido crescimento micelial.

**Termos para indexação:** *Piper aduncum*, *Moniliophthora pernicioso*, bioautografia.

# Antifungal Activity of the Essential oil of *Piper aduncum* by Indirectly Bioautography in Control of *Moniliophthora perniciosa*

## Abstract

The essential oil of *Piper aduncum* has had its proven activity against *Moniliophthora perniciosa* – the causative agent of witches' room in cupuaçuzeiro. Due to the great economic loss caused by the appearance of this disease, the present study aimed to evaluate the antifungal activity of the essential oil of *Piper aduncum* cultivated in Manaus, AM conditions, on the fungus *M. perniciosa* through technique Indirect Bioautography (IB) for the evaluation of bioactive components present in this oil, in addition to the evaluation on the mycelial growth of the fungus with the oil plus directly in culture medium. The *P. aduncum* oil has antifungal action on *M. perniciosa*, however, the action of the individual components of this oil can not be assessed due to contamination by other fungi during mycelial growth, by IB technique employed. It is suggested for future studies, the initial isolation of the oil components and application in already standardized techniques for evaluation of antifungal activity, being the IB most suitable for bacteria or fungi with fast mycelial growth.

**Index terms:** *Piper aduncum*, *Moniliophthora perniciosa*, bioautography.

## Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma fruteira nativa da Amazônia (SOUZA et al., 1999). Devido às características de acidez, teor de pectina, aroma ativo e sabor muito agradável, o cupuaçu é de grande importância econômica para a região amazônica (SOUZA et al., 1999; SUFRAMA, 2003). Porém, a cultura do cupuaçu pode ser prejudicada com o aparecimento de doenças, sendo a principal a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *M. pernicioso*. Esse fungo afeta órgãos da planta em ativo crescimento, como brotações jovens, flores e frutos (GASPAROTTO et al., 1998), causando os maiores prejuízos econômicos para a cultura, já que a alta incidência reduz drasticamente a produção de frutos (GASPAROTTO; PEREIRA, 2000).

O uso de plantas medicinais no combate a fungos e bactérias vem sendo constantemente ampliado, objetivando a busca por produtos “naturais”, tanto na área da saúde humana como veterinária. Outro campo de promissora aplicação de produtos naturais vem sendo a área fitopatológica, em razão dos diversos problemas ambientais e de saúde causados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos (ZANANDREA et al., 2004). Sendo assim, a busca por produtos fitossanitários naturais, como os óleos essenciais, são estratégias importantes que podem propiciar uma agricultura sustentável, a baixo custo, com redução da poluição ambiental, resultando em produtos mais saudáveis (POLTRONIERI et al., 2008).

Os óleos essenciais vegetais são considerados uma fonte para o desenvolvimento desses novos produtos naturais, entretanto sabe-se que grande parte da flora brasileira ainda não foi estudada, inviabilizando assim a descoberta de novos compostos químicos com grande potencial fitopatogênico (STANGARLIN et al., 1999). A biodiversidade amazônica é

reconhecida por sua ampla disponibilidade de recursos naturais, e substâncias antifúngicas podem estar presentes em diversas espécies nativas, como é o caso das espécies de *Piper* (SILVA; BASTOS, 2007).

A espécie *P. aduncum* já teve sua atividade antifúngica, comprovada por meio de diferentes estudos, contra *M. perniciosa*, entretanto seria importante a avaliação isolada de componentes desse óleo para verificar a atividade fungicida de forma independente.

*P. aduncum* é um arbusto de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos, conhecido popularmente como pimenta-de-macaco, considerado uma planta oportunista, que invade áreas desflorestadas após a exploração da madeira, de alta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas. O óleo essencial de *P. aduncum* vem apresentando ação eficaz no controle de fitopatógenos. Em 2004, Bastos e Albuquerque comprovaram a ação do óleo de *P. aduncum* a 1% contra *Colletotricum musae*, evitando a podridão de bananas. Outros estudos comprovaram a ação do mesmo óleo contra *M. perniciosa* (BASTOS, 1997; BASTOS; MAIA, 2000). Em outro ensaio realizado com óleo essencial de *P. aduncum*, houve inibição no crescimento micelial, na germinação de basidiósporos de *M. perniciosa* in vitro, na concentração de 100 ppm. Nas plantas de cacau, o óleo apresentou maior eficiência de controle da doença, tanto na aplicação preventiva como na curativa (BASTOS, 2007).

Em função da grande perda econômica que a vassoura-de-bruxa representa, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *P. aduncum*, cultivado nas condições de Manaus, AM, sobre o fungo *M. perniciosa*, com uso da técnica de bioautografia indireta (BI), para a avaliação dos componentes bioativos presentes nesse óleo.

## Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica e no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental. O óleo essencial foi obtido pelo método de hidrodestilação a partir das folhas de *P. aduncum*. As extrações foram feitas em aparelho tipo Clevenger, cujo balão tem capacidade de 12.000 mL. Em cada extração foram colocados 500 g de folhas frescas no balão, cobertas com água. Em seguida, a manta aquecedora foi ligada e, a partir do momento da ebulição, foi considerado o início do processo. Após três horas, o óleo essencial foi recolhido e armazenado em vidro âmbar, em seguida foi guardado em freezer para utilização nos bioensaios.

No teste de inibição do crescimento micelial do fungo *M. pernicioso*, foram usadas alíquotas do óleo essencial de *P. aduncum* incorporadas ao meio de cultura MGLA (malte, glicerol, extrato de levedura e ágar) nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1 µg/mL, dissolvido em solução a 1% de dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de petri. Para a testemunha, foram usadas placas contendo somente o meio de cultura com 1% da solução de DMSO, sem o acréscimo de óleo essencial. Após a solidificação do meio, discos contendo micélio do fungo foram transferidos para o centro das placas. Estas foram incubadas a 25 °C, em ausência de luz. As avaliações foram feitas quando o crescimento micelial da testemunha cobriu totalmente a superfície do meio de cultura. Para cada concentração foram empregadas quatro repetições.

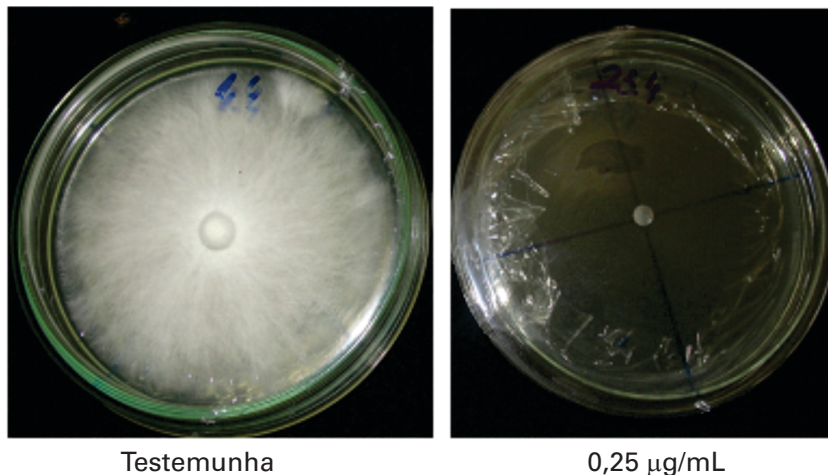
O método de BI foi separado em três etapas, duas preparativas (cromatografia em camada delgada e a preparação do meio de cultura e micro-organismos) e a própria bioautografia. Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD), alíquotas do óleo essencial de *P. aduncum* foram aplicadas nas placas cromatográficas de sílica gel, com o auxílio de um capilar. O

eluente utilizado para promover a separação dos componentes do óleo foi hexano/acetato de etila na proporção de 85:15. Após a eluição, a placa foi aerada para eliminação do solvente, para que não houvesse interferência nos testes de bioautografia. Em cada ensaio, foram preparadas cinco placas cromatográficas, sendo duas utilizadas no teste de bioautografia, uma utilizada para verificação da interferência do solvente e duas reveladas com iodo e luz ultravioleta (UV).

O meio de cultura utilizado para a bioautografia foi o Ágar MGLA. A concentração de suspensão de microrganismo foi ajustada para  $10^4$ /mL de meio de cultura. Para o ensaio de BI, as placas de sílica gel com os componentes do óleo separados foram depositadas em placas de petri. Em seguida, foi adicionado sobre a placa cromatográfica meio de cultura contendo o inóculo. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 25 °C, até a formação considerável de micélio do fungo.

## Resultados e Discussão

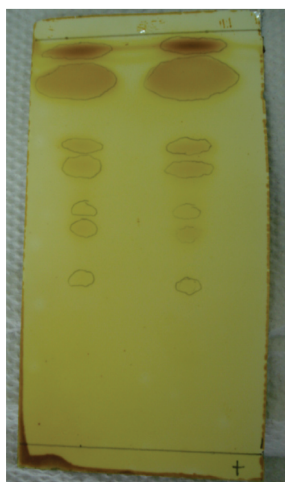
Os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial de *P. aduncum*, nas quatro concentrações testadas (0,25; 0,50; 0,75 e 1 µg/mL), inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo *M. perniciosa* (Figura 1), resultado semelhante ao obtido por Bastos (2007), empregando técnica similar de avaliação, que também observou total inibição de formação de micélio em concentrações até 0,1 µg/mL. Ainda em 2007, Silva e Bastos (2007) testaram a atividade antifúngica de outras espécies do gênero *Piper* (*P. callosum*, *P. marginatum* var. *anisatum* e *P. enckea*) sobre o crescimento micelial de *M. perniciosa* e observaram a inibição em 100% a partir da concentração de 0,75 µL/mL. Em comparação com este trabalho, percebe-se que o óleo de *P. aduncum* é mais eficaz para inibir *M. perniciosa* do que outras espécies testadas.



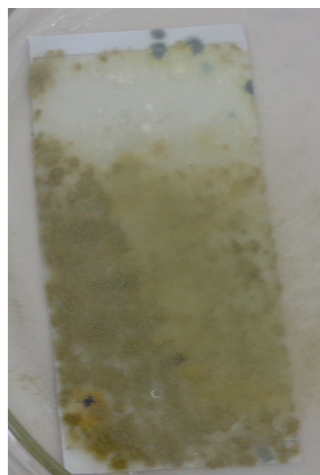
Fotos: Sílvia Imaculada Barros da Rocha

**Figura 1.** Bioensaio com óleo puro.

Para o teste de BI foi possível a separação dos componentes do óleo essencial, evidenciado pela revelação com vapor de iodo (Figura 2), bem como a avaliação de atividade de inibição de componentes isolados sobre fungo *Aspergillus* sp. (Figura 3), que possui crescimento rápido, e, neste caso, foi utilizado como testemunha.



**Figura 2.** Revelação CCD com vapor de iodo.



**Figura 3.** Bioautografia (*Aspergillus* sp.).

Fotos: Sílvia Imaculada Barros da Rocha

Para *M. perniciosa*, a verificação de zonas de inibição foi prejudicada em função do crescimento lento desse fungo, ocasionando a contaminação das placas por outras espécies, mesmo após tratamento com exposição em luz UV.

## Conclusões

O óleo de *P. aduncum* apresenta ação antifúngica sobre *M. perniciosa*, entretanto a ação dos componentes isolados desse óleo não pôde ser avaliada pela técnica de bioautografia empregada, por causa de contaminação por outros fungos durante o crescimento micelial. Sugere-se, para estudos futuros, o isolamento inicial dos componentes ou frações do óleo e aplicação em técnicas já padronizadas para avaliação de atividade antifúngica, sendo a bioautografia mais indicada para bactérias ou fungos com rápido crescimento micelial.

## Agradecimentos

À equipe de Plantas Medicinais e de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio durante o processamento do material vegetal e nas análises microbiológicas. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pela bolsa concedida.

## Referências

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.



BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 555-557, set.-out. 2004.

BASTOS, C. N.; MAIA, J. G. S. Avaliação dos efeitos protetivo e curativo do óleo essencial de *Piper aduncum* sobre a vassoura de bruxa do cacauzeiro, em casa de vegetação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 1., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Academia Cearense de Ciências, 2000. p. 47.

BASTOS, C. N. Fungitoxidade in vitro e ação curativa de óleos essenciais contra *Crinipellis pernicioso*. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, PA, n. 47, p. 137-148, 2007.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. 12 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa, 6).

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; VÉRAS, S. de M. **Poda fitossanitária no controle da vassoura-de-bruxa**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1998. 6 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico, 12).

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SANTOS, I. P. dos. **Pragas e doenças de cultivos amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 379 p.

SILVA, H. M. M. D.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 2, p. 143-145, mar./abr. 2007.

SOUZA, A. das G. C. de; SILVA, S. E. L. da; TAVARES, A. M.; RODRIGUES, M. do R. L. **A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1999. 39 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. CircularTécnica, 2).

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

SUFRAMA. **Projeto Potencialidades Regionais**. Estudo de viabilidade econômica - cupuaçu. Manaus, 2003.

ZANANDREA, I.; SANTOS, J. D.; MOURA, A. B.; LUDWIG, J.; BOSENBECKER, V. K. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 14, supl., p. 14-16, 2004.