


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL



ATIVIDADE DO ÓLEO VOLÁTIL, FASES E EXTRATO
ETANÓLICO DE *Piper aduncum* L. CONTRA *Corynespora*
cassiicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, AGENTE CAUSAL DA
MANCHA-ALVO DO TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

MARCUS VINICIUS LOPES DE LIMA

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

MARCUS VINICIUS LOPES DE LIMA

ATIVIDADE DO ÓLEO VOLÁTIL, FASES E EXTRATO
ETANÓLICO DE *Piper aduncum* L. CONTRA *Corynespora*
cassiicola (Berk. & M. A. Curtis) C.T. Wei, AGENTE CAUSAL DA
MANCHA-ALVO DO TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical; área de concentração Produção Vegetal e linha de pesquisa em Fitossanidade.

Orientadora: Prof. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes

MANAUS
2012

Ficha Catalográfica
Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação realizada pela

Lima, Marcus Vinicius Lopes de

L732a Atividade do óleo volátil, fases e extrato etanólico de *Piper aduncum* L. contra *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C.T. Wei, agente causal da mancha-alvo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Marcus Vinicius Lopes de Lima. - Manaus: UFAM, 2012.

62 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) —
Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes

1. Doença das plantas 2. Tomate – Doenças e pragas 3. *Piper aduncum* – Propiedades químicas I. Bentes, Jânia Lília da Silva (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 635.64:632(043.3)

MARCUS VINICIUS LOPES DE LIMA

ATIVIDADE DO ÓLEO VOLÁTIL, FASES E EXTRATO
ETANÓLICO DE *Piper aduncum* L. CONTRA *Corynespora*
cassiicola (Berk. & M. A. Curtis) C.T. Wei, AGENTE CAUSAL
DA MANCHA-ALVO DO TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

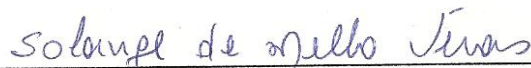
Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical; área de concentração Produção Vegetal e linha de pesquisa em Fitossanidade.

Aprovada em 31 de Agosto de 2012

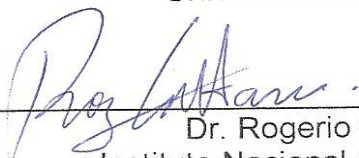
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Solange de Mello Vêras, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Rogerio Eiji Hanada, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Ao meu pai, minha mãe,
Dra. Solange e amigos
pelo incentivo para
realização deste trabalho e
ofereço aos
Amazonenses.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por mais uma oportunidade, saúde e força em mais uma conquista da minha vida.

Aos meus **pais** pela ajuda necessária ao longo da caminhada.

A **Dra. Solange de Mello Vêras**, que tem me orientado durante esses anos e tem sido um grande referencial de profissionalismo, caráter e conduta, para minha vida.

Aos doutores **Jânia Lília da Silva Bentes** e **Sérgio Massayoshi Nunomura** pelo ajuda e orientação, que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Kaoru Yuyama**, pela ajuda no processo de execução deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios do CPPN/INPA e Microbiologia/UFAM para execução dos procedimentos laboratórios.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação que me acompanharam e deram tanta força.

Aos meus grandes e melhores amigos Philipe Lemos e Adalberto Rocha (Júnior) pela a ajuda na execução do trabalho na casa-de-vegetação e Fabiane Ameida e Mara e Lumenão pelo incentivo.

Eu escrevo sem esperança de que o que eu escrevo altere qualquer coisa. Não altera em nada... Porque no fundo a gente não está querendo alterar as coisas. A gente está querendo desabrochar de um modo ou de outro...

Clarice Lispector

RESUMO

A mancha alvo do tomateiro é uma doença que ocorre nas folhas e é causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*. O fungo é considerado cosmopólita e inespecífico devido à ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica. Devido à inexistência de cultivares comerciais resistentes e produtos químicos registrados no Brasil para o controle da doença, o mesmo é feito com uso de produtos alternativos de forma curativa. Este trabalho relata o efeito antifúngico *in vitro* do extrato etanólico, fases e óleo volátil de *Piper aduncum* e o efeito curativo e profilático do extrato aquoso de *P. aduncum* em mudas de tomateiro. O extrato aquoso foi obtido por meio da maceração de 300 g de folhas verdes em 2 L de água; O extrato etanólico, por meio da maceração a frio de folhas secas com etanol; o óleo volátil obtido pelo método da hidrodestilação das folhas secas; as fases hexânica, clorofórmica, N-butanólica e hidroalcóolico por meio do fracionamento do extrato etanólico pelo processo de partição líquido-líquido. Para as análises *in vitro*, foram realizadas em placas de petri o efeito antifúngico do extrato etanólico, fases e óleo volátil de *P. aduncum* sobre o crescimento micelial, e em lâminas a germinação dos conídios, enquanto que, *in vivo*, via inoculação de suspensão de inóculo na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹ em mudas de tomateiro do cultivar Santa Cruz Kada, as análises foram feitas antes e após tratamento com extrato aquoso, nas avaliações do efeito curativo e profilático, respectivamente. O óleo volátil de *P. aduncum* não apresentou nenhuma inibição sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola* nas concentrações testadas. O extrato etanólico, fases hexânica e clorofórmica apresentaram efeito antifúngico na concentração 10000 µg.mL⁻¹ sobre o crescimento micelial e germinação dos conídios. A concentração inibitória mínima sobre o crescimento micelial foi em 2000 µg.mL⁻¹ da fase hexânica, nesta mesma concentração foi encontrado para a germinação dos conídios no extrato etanólico. O extrato aquoso de *P. aduncum* no teste de efeito curativo nas dosagens 1:1 e 1:2, apresentaram efeito significativo na redução da severidade da doença. O cálculo da AACPD confirma o efeito curativo em todas as dosagens testadas. No teste profilático o extrato aquoso não apresentou nenhuma efetividade no controle da doença.

Palavras chave: Compostos, Crescimento micelial, Germinação. Dilapiol. Severidade.

ABSTRACT

The dark-brown spot is a disease that occurs in the leaves of the tomato tree and is caused by the fungus *Corynespora cassiicola*. The fungus is considered cosmopolitan and nonspecific because of the wide host range and geographical distribution. Due to the absence of resilient and grow commercial chemicals registered in Brazil to control the disease the same is done with the use of alternative products so healing. This paper reports the in vitro antifungal effect of the ethanol extract phases and volatile oil from *Piper aduncum* and prophylactic and curative effect of aqueous extract of *P. aduncum* in tomato seedlings. The aqueous extract was obtained by macerating 300 g of fresh leaves in 2 L of water, ethanol extract by means of cold maceration of leaves with ethanol, the essential oil obtained by the method of hydrodistillation of the dry leaves, the the hexane, chloroform, N-butanol and hydroalcoholic through the fractionation of the ethanol extract by the process of liquid-liquid partition. For in vitro assays were performed in petri dishes, the antifungal effect of the ethanol extract phases and volatile oil of *P. aduncum* on mycelial growth, and germination of conidia blades while in vivo via inoculation of conidia suspension of 10^4 conidia mL^{-1} in tomato seedlings of the cultivar Santa Cruz Kada, the analyzes were done before and after treatment with aqueous extract, evaluations of prophylactic and curative effect, respectively. The volatile oil of *P. aduncum* showed no inhibition on the mycelial growth of *C. cassiicola* concentrations tested. The ethanol extract, the hexane and chloroform showed antifungal effect in $10000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration on mycelial growth and spore germination. The minimum inhibitory concentration on the mycelial growth was in $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the hexane phase, this same concentration was found for the germination of conidia in the ethanol extract. The aqueous extract of *P. aduncum* the test of curative effect at dosages 1:1 and 1:2, showed significant effect in reducing the severity of the disease. The calculation of AUDPC confirming curative effect at all doses tested. In testing the prophylactic aqueous extract showed no effectiveness in controlling the disease

Keywords: Chemicals, mycelial growth, germination. Dilapiol. Severity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito antifúngico do extrato etanólico, fases e óleo volátil de *Piper aduncum* na concentração de 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (A) Fase hexânico; (B) Fase clorofórmica; (C) Fração hidroalcoólica; (D) Fase N-butanólica; (E) Óleo volátil e (F) Testemunha/água d estilada e esterilizada.....41
- Figura 2 - Efeito curativo do extrato aquoso de *Piper aduncum* em mudas de tomateiro. (A) testemunha; (B) tratamento 1:1 e (C) tratamento 1:248

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média (mm) do halo de inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *Piper aduncum*.....39
- Tabela 2 - Porcentagem de conídios não germinados de *Corynespora cassiicola* nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *Piper aduncum*.....39
- Tabela 3 - Exemplos de efeito antifúngico de extratos, fases e óleo volátil de plantas sobre crescimento micelial e germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos45
- Tabela 4 - Avaliação do efeito curativo e profilático do extrato aquoso de *Piper aduncum* sobre a severidade e área abaixo da curva do progresso da doença48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
Macha-alvo do tomateiro	14
Etiologia.....	14
Epidemiologia.....	15
Sintomatologia.....	16
Controle.....	17
Compostos vegetais e o controle de patógenos.....	18
<i>Piper aduncum</i>	21
3. OBJETIVO GERAL	24
Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
Obtenção dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>	25
Obtenção de material vegetal e preparo do extrato etanólico	25
Obtenção das fases	26
Obtenção do óleo de <i>P. aduncum</i>	28
Obtenção das concentrações do óleo e das fases de <i>P. aduncum</i>	29
Identificação do Dilapiol no óleo essencial de <i>P. aduncum</i> por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)	30
Avaliação preliminar do efeito das fases e do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre o crescimento micelial de <i>C. cassicola</i>	30
Obtenção das concentrações do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)	31
Efeito antifúngico do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica no crescimento micelial.....	32

Efeito antifúngico do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica na germinação dos conídios	33
Fase <i>in vivo</i>	33
Preparo das mudas de tomateiro	34
Teste de Patogenicidade.....	34
Avaliação do efeito profilático e curativo do extrato aquoso de <i>P. aduncum</i> no controle da mancha alvo	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
Inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos.....	37
Efeitos curativo e profilático do extrato de <i>P. aduncum</i>	47
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	53

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Corynespora cassiicola* é um fungo que ataca uma extraordinária variedade de plantas. O fungo pode ser disseminado pelo vento e respingos d'água, além da capacidade de sobrevivência saprofítica.

O fungo *C. cassiicola* é o agente causal da mancha-alvo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) podendo causar danos significativas na cultura. O tomate é uma das hortaliças mais consumidas e disseminadas no mundo; é uma dicotiledônea pertencente à família das Solanaceae Juss. (CONABIO, 2009).

O controle de doenças depende do uso de fungicida associado aos tratamentos culturais. Vários destes têm sido utilizados para o controle de doenças de plantas, incluindo a mancha alvo (FERNANDO, et al., 2010). São raros os fungicidas que são eficazes no controle de doenças, que não causem danos ao meio ambiente, à saúde humana e aos animais (RIBAS; MATSUMURA, 2010).

Além de causarem poluição ao meio ambiente, os fungicidas são caros e quando mal conduzidos podem ocasionar a seleção de patógenos resistentes (DEISING, et al., 2008). Os métodos de controle de doença têm sido estudados com ênfase em novos compostos derivados de fontes vegetais.

Os extratos e óleos voláteis de plantas têm sido relatados como agentes antimicrobianos eficazes por apresentarem propriedades antifúngicas. Podendo ser consideradas boas alternativas de fungicidas químicos facilmente degradáveis.

As espécies do gênero *Piper* tem apresentado atividade antifúngica em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostrando-se eficazes contra fungos fitopatogênicos. Dentro

deste gênero, a espécie *P. aduncum* é a mais investigada quanto a sua composição química e efeito antifúngico do óleo volátil.

O teste com óleos voláteis e diferentes extratos de *P. aduncum* é uma tentativa de estudar a eficácia destes compostos, uma vez que as implicações sociais e econômicas tem despertado o interesse pela busca de alimentos livres de agrotóxicos, menor custo de produção e oferta produtos químicos biodegradáveis com potencial antifúngico sem causar danos ao meio ambiente e o homem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Macha-alvo do tomateiro

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis), C.T. Wei é o agente causal da mancha-alvo do tomateiro. O fungo já foi relatado em mais de 300 espécies de plantas, infecta folhas, flores, raízes e caules de várias espécies economicamente importantes, em mais de 70 países de clima tropical e subtropical (FARR, et al., 2011).

A espécie foi descrita por Ellis (1971) como cosmopolita e inespecífica devido à ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica. O organismo foi identificado pela primeira vez por Deighton em 1936 em seringueiras (*Hevea brasiliensis* L.) em Serra Leona, neste mesmo local ele relatou a ocorrência em tomateiros (WEI, 1950).

Em 1984 o fungo foi registrado pela primeira vez no Brasil em seringueiras, em Manaus, e depois em outros Estados do País (VERZIGNASSI, et al., 2009); cinco anos depois, ainda em Manaus, a doença foi relatada em tomateiros (LEROY; LOURD, 1989).

Etiologia

O fungo pertence à classe dos Deuteromicetos, subclasse Hyphomycetidae, família Dematiaceae, gênero *Corynespora* e espécie *C. cassiicola* (BARNET; HUNTER, 1972).

De acordo com a descrição de Ellis (1971), os conidióforos são eretos, ramificados, de coloração pálida ou marron-clara com até vinte septos medindo cerca de 111-850 µm.

Os conídios podem ser isolados ou em cadeias de dois a seis septos com coloração parda, dilatados na base (clavado), retos ou ligeiramente curvados, com quatro a vinte pseudoseptos, medindo cerca de cerca de 40-220 μm de comprimento; quando cultivados em meio de cultura podem chegar até 500 μm por 9-22 μm de largura (ELLIS, 1971; BLAZQUEZ, 1991).

Em meio de cultura o micélio é branco, sem estroma e floculento; mais tarde a colônia do fungo fica cinza ou marrom-escuro (ELLIS, 1971; BLAZQUEZ, 1991). Outra característica deste fungo é que o micélio cresce de maneira uniforme em todas as direções e as colônias produzem anéis de crescimento concêntricos (NGHIA, 2008).

Epidemiologia

Plantas de tomate infectadas pelo fungo, ou outros hospedeiros onde há relatos da doença, podem tornar-se importantes fontes de inóculo (DIXON, et al., 2009; SHIMOMOTO, et al., 2011).

A sobrevivência do fungo é assegurada pela capacidade de crescer de forma competitiva como um saprófita (SCHLUB; SMITH, 2007), em folhas velhas remanescentes ou caídas no chão, e em hospedeiros alternativos (VERZIGNASSI, et al., 2009).

Os conídios formados nas lesões são disseminados principalmente pelo vento e respingos de água da chuva (VERZIGNASSI, et al., 2009); o fungo também pode ser transmitido por sementes (LOPES; REIS, 2007).

Após a deposição dos conídios sobre os tecidos suscetíveis de tomateiro dar-se o início de processo de infecção, com a germinação e penetração no tecido do

hospedeiro sob condições favoráveis do ambiente; temperatura variando entre 22 a 30 °C (MULITERNO de MELO, 2009) e períodos de alta umidade relativa, acima de 90% ou período de 16 a 44 horas de molhamento foliar, onde a doença é mais problemática (LOPES; REIS, 2007).

Durante a colonização de *C. cassicola* nas folhas, o fungo libera a toxina Cassiicolin, que induz a formação da lesão necrótica, sintoma típica da doença (FORCELINI, 2010; MALIK et al., 2010).

Sintomatologia

Os sintomas da mancha-alvo do tomateiro são observados principalmente no limbo foliar, onde se formam lesões circulares, marrom-escuras, com anéis concêntricos, como em um alvo. Lesões similares, porém menores, podem aparecer no caule ou no pecíolo. Em frutos maduros, além de mancha-zonada, aparecem rachaduras (LOPES; REIS, 2007).

Ainda no limbo, as machas necróticas são rodeadas por um halo clorótico, que quando se fundem formam extensas lesões irregulares. Com o aumento da severidade as folhas caem e conseqüentemente os ramos secam (SOUZA, A. et al. 2009). A partir do reconhecimento da doença em tomateiros, podem ser adotadas medidas de controle necessárias para conter a disseminação da mesma.

Controle

No Brasil ainda não existe produtos químicos registrados e nem cultivares resistentes para o controle de mancha-alvo do tomateiro. Para isso faz-se necessário o uso de produtos alternativos associados às práticas manejo da cultura.

A única cultura agrícola que possui produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controle da mancha-alvo é a soja. São recomendados os fungicidas piraclostrobina (estrobirulina), carbendazim (benzimidazol) e epoxiconazol (triazol) + piraclostrobina (estrobirulina), todos em aplicações quinzenais (VERZIGNASSI, et al., 2009).

A desvantagem do uso de produtos químicos no controle de doenças é o surgimento de populações de patógenos cada vez mais resistentes. Segundo Teramoto et al. (2011), os fungicidas Azoxystrobin, Carbendazin, Chlorothalonil e Tiofanato-metilo não foram considerados fungitóxica, *in vitro*, para isolados *C. cassicola*, evidenciando resistência a esses fungicidas.

Miyamoto et al. (2010), identificou isolados de *C. cassicola* resistentes a Boscalide, fungicida de largo espectro inibidor de succinato desidrogenase, que é um complexo que utiliza o aceptor de elétrons FAD para efetuar a transferência dos elétrons de FADH₂ para a coenzima Q, cuja resistência ocorria devido as mudanças das características moleculares em razão da substituição de aminoácidos de genes que codificam as subunidades do succinato desidrogenase (SDH).

O uso de produtos naturais no controle de doenças de plantas é uma alternativa para a redução do uso de produtos químicos sintéticos. Para Khan e Nasreen (2010), o

estudo de novos compostos antifúngica em plantas é interessante porque são portadores de metabólitos secundários contra patógenos.

Compostos vegetais e o controle de patógenos

Algumas plantas são conhecidas como potenciais produtoras de compostos ativos com capacidade antifúngica. São vários os relatos que demonstram a eficiência destes compostos presentes em diversos óleos essenciais, fases e extratos de várias espécies de plantas atuando de duas maneiras: agindo diretamente sobre o patógeno ou ativando os mecanismos de defesa da planta através de moléculas bioativas (NARUZAWA; PAPA, 2011; BRAND, et al., 2010).

São vários os registros comprovando a eficiência de extratos vegetais obtidos de diversas espécies botânicas, como a inibição significativa do crescimento micelial de *Aspergillus* sp. Micheli, *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii* (Matsu & Tomoyasu) Gardner., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Phomopsis* sp. Toulouse com o extrato aquoso de *Allium sativum* L., evidenciando a presença de propriedades antifúngicas (VENTUROSOSO, et al., 2011).

O óleo volátil extraído das folhas de *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu apresentou efeito antifúngico com a inibição 62,5% do crescimento micelial de *F. oxysporum* e 100% da germinação dos esporos, enquanto que, a fase clorofórmica apresentou atividade antifúngica variando entre 32,4 a 45,1% (BAJPAI; KANG, 2010).

Em outro relato o óleo volátil e a fase hexânica de flores de *Cestrum nocturnum* L. também mostraram efeito inibitório sobre o crescimento micelial

de *Phytophthora capsici* L., 59,2% e 50,2% respectivamente. O óleo essencial desta espécie inibiu 100% da germinação dos esporos deste fungo (AL-REZA, et al., 2010).

O efeito antifúngico dos óleos voláteis e fases descritas acima são atribuídos à presença de compostos ativos tais como: hidrocarbonetos de mono e sesquiterpenos, mono e sesquiterpenos oxigenados, flavonoides, fenilpropanóides, produzidas pelas diversas espécies de plantas. Nestes compostos estão presentes substâncias ativas que agem individualmente ou em conjunto com outras substâncias extraídas (BAJPAI, et al., 2008; HOSSAIN, et al., 2008; KORDALI, et al., 2009; AL-REZA et al., 2010; RODRÍGUEZ, et al., 2011).

Alguns estudos têm elucidado substâncias ativas presentes nos extratos, fases e óleos voláteis de diversas plantas com potencial antifúngico, são exemplos citronelal (SEIXAS, et al., 2011), o eugenol (COMBRINCK, et al., 2009) e indutores como geraniol e nerol (COLPAS, et al., 2009). Jardim et al. (2010) relatou pela primeira vez o amplo espectro antifúngico do extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria), e dos seis compostos identificados a (Z)-ascaridole foi o principal componente antifúngico.

Quanto à bioatividade dos óleos voláteis, os compostos antifúngicos presentes nestes são terpenos fenólicos e seu modo de ação pode estar relacionado com outros compostos. A maior parte dos estudos sobre o mecanismo de ação destes compostos fenólicos tem se concentrado em seus efeitos sobre a estrutura e função das membranas celulares dos microorganismos, como por exemplo, alterações da fluidez, a permeabilidade, interação com os componentes internos da célula e a liberação de componentes intracelulares. Assim, os terpenos fenólicos ativos podem ter várias ações invasivas que poderiam levar à inibição de fungos patogênicos das plantas. Estas

ações são explicadas pelo caráter lipofílico dessas substâncias. (TROMBETA, et al., 2005; AL-REZA, et al., 2010).

A atividade antifúngica dos vários extratos e fases variam de acordo com os compostos extraídos, microorganismos testados e tipo de solvente, por exemplo, a fase hexânica *A. sativum* inibiu parcialmente o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* J. H., enquanto que o extrato etanólico inibiu completamente a germinação de esporos de *Alternaria solani* Sorauer (DOMINGUES, et al., 2009).

Rodríguez et al. (2011) também relataram maior atividade do extrato hexânica de *Agave lechuguilla* Torr., na inibição do crescimento micelial e germinação dos esporos em *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., do que o etanólico. No entanto, quando testado contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) o extrato etanólico foi mais ativo. Domingues et al. (2011), mostraram inibição de 16% do crescimento micelial e 100% da germinação de esporos de *Sclerotium rofsii* a fase clorofórmica de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke (siriúba) na concentração 1000 mg.mL⁻¹.

Em relação ao fungo *C. cassicola* são poucos os trabalhos envolvendo o uso de extratos de plantas no controle desse fitopatógeno. De acordo com Souza L. et al. (2010) o extrato aquoso de *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw., não demonstrou propriedades fungitóxicas no crescimento micelial de *C. cassicola*, no entanto, promoveu a redução da esporulação nas concentrações de 20 e 40%. Ainda, Naruzawa e Papa (2011), testaram o extrato aquoso e hidroetanólico de *Myracrodunon urundeuva* Alemão (aroeira), na concentração de 50% e obtiveram 100% da inibição do crescimento micelial e 94% e 100% da germinação dos esporos, respectivamente.

Os exemplos acima relatam o efeito antifúngico de compostos de plantas, em diferentes extratores, sobre fitopatógenos em testes *in vitro*. Porém, existem também referências da ação de extratos aplicados em testes *in vivo*, comprovando a eficiência desses subprodutos, como por exemplo, os extratos brutos aquosos de *Achillea millefolium* L. (erva-dos-carpinteiros), *Artemisia camphorata* Vill. (Cânfora-de-jardim), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* L. (Alegrim) apresentaram efeitos na redução das lesões de pinta-preta em tomateiro (ITAKO, et al., 2008). Com estes mesmos extratos as mudas de tomate apresentam uma possível indução de resistência contra *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), principalmente nos extratos aquosos de *A. camphorata* e *R. officinalis* (ITAKO, et al., 2009).

A Amazônia é o maior centro de biodiversidade do mundo, nela podem ser encontradas diversas espécies de plantas que representam uma fonte alternativa inesgotável de moléculas com potencial antifúngico. Dentre as espécies encontra-se *Piper aduncum* L. uma Piperaceae do gênero Piper.

Piper aduncum

Piperaceae é uma família predominantemente tropical que inclui de cinco a oito gêneros e aproximadamente 2000 espécies. No Brasil ocorrem três gêneros (*Peperomia*, *Manekia* e *Piper*) e 500 espécies. Esta família é bastante comum nas formações florestais brasileiras, particularmente na Mata Atlântica, onde espécies de *Piper* são comuns no sub-bosque, principalmente em áreas relativamente alteradas,

facilmente reconhecidas mesmo em estado vegetativo, pela presença de nós foliares geniculados e folhas geralmente com base assimétrica (SOUZA; LORENZI, 2008).

As espécies do gênero *Piper* possuem espigas opostas as folhas e são quase sempre plantas lenhosas e sublenhosas, com distintos nós inchados e pontas caídas (SOUZA; LORENZI, 2008). A maioria das espécies é de crescimento rápido e algumas delas têm sido relatadas a capacidade antifúngica de óleos essenciais e extratos, tais como: *Piper scutifolium* Jack (MARQUES, et al., 2010), *Piper chaba* Hunter (RAHMAN et al., 2011), *Piper cf. cumanense* Kunth (PARRA, et al., 2011), *Piper belte* L. (SINGHA, et al., 2011), *Piper sarmentosum* Roxb. (BUSSAMAN, et al., 2012).

De um ponto de vista fitoquímico as substâncias Safrol, Dilapoil, Linalol, Piperina, Piperlonguminina e Corcovadina, compostos fenólicos, ácidos tem sido comumente identificado em trabalhos anteriores com principais componentes ativos nas espécies de *Piper* (GUERRINI, et al., 2009; CREMASCO; BRAGA, 2010; MARQUES, et al., 2010; PARRA, et al., 2010) com comprovada atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos.

Dentre as espécies do gênero *Piper* encontra-se a *P. aduncum*, um arbusto com ramos pubescentes; folhas elípticas ou lanceoladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento e 7 cm de largura; espigas regularmente curvada de tamanho semelhante ao das folhas. (SILVA; OLIVEIRA, 2000).

P. aduncum tem sido quimicamente investigada e identificado compostos presentes no óleo volátil como monoterpenos, sesquiterpenos, derivados de fenilpropanóides, apresentando atividade antifúngica, inibindo completamente o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos (NEVICKIENE, et al., 2006; GUERRINI, et al.; 2009, POTZERNHEIM, et al., 2012).

Dentre estes compostos, encontra-se o Dilapiol, um fenilpropanóide, que ocorre em quantidades elevadas, variando de 35-90%, na composição do óleo volátil das espécies de *P. aduncum* da floresta Amazônica. Esta substância já foi relatada como principio ativo com potencial antifúngico, promovendo a plasmólise de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, (2005) (ARZE, et al., 2008; GUERRINI, et al., 2009; ALMEIDA, et al., 2009).

Outra substância identificada em *P. aduncum* foi um hidroperóxido, benzoato de metil, 4-hidroxi-3-(20-hidroperoxi-30-metil-30-butenil) por Lago et al. (2009) que mostraram a atividade fungitóxica, inibindo completamente o crescimento micelial de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) e *C. sphaerospermum* (penzig).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de *Piper aduncum* L. no controle da mancha alvo do tomateiro.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito do extrato etanólico, fases hexânica, clorofórmica, N-butanólica, hidroalcóolica, e do óleo essencial de *P. aduncum* sobre o crescimento micelial de *C. cassicola*.

Avaliar o efeito do extrato etanólico, fases hexânica, clorofórmica de *P. aduncum* sobre a germinação dos conídios de *C. cassicola*.

Identificar a menor concentração inibitória do extrato etanólico, fases hexânica, clorofórmica e do óleo volátil de *P. aduncum* sobre o crescimento micelial e germinação dos conídios de *C. cassicola*.

Avaliar o efeito profilático e curativo do extrato aquoso de *P. aduncum* sobre a severidade da mancha-alvo em mudas de tomateiro.

Identificar a menor concentração inibitória do extrato aquoso de *P. aduncum* sobre a mancha-alvo em mudas de tomateiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Corynespora cassicola*

O isolado do patógeno foi obtido a partir de folhas coletadas de plantas de tomateiro apresentando sintomas típicos de mancha-alvo, no ramal do Caldeirão, fazenda Amazônia, localizado no km 7, Manaus – Manacapuru, AM.

As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel e levados para o laboratório de Microbiologia da UFAM, onde foi realizado a o isolamento indireto do fungo (ALFENAS, et al., 2007), em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-dextrose-ágar)

O isolado obtido foi mantido em meio BDA inclinado, em tubos de ensaios armazenados em incubadora BOD (Biochemical Oxigem Demand TE-391, Tecnal) a 27°C sem fotoperíodo.

Obtenção de material vegetal e preparo do extrato etanólico

As folhas de *P. aduncum* foram coletadas no km 8 da BR-174, município de Presidente Figueiredo – AM e Registrado no Herbário HUAM/UFAM sob o nº 8188, coleção Vêras, S.M., 01.

Para a secagem, as folhas foram mantidas em uma estufa com circulação de ar TE 394/3 Tecnal a 40 °C por três dias. Após esse período as folhas secas foram moídas em moinho eletrônico tipo Willy TE-650 (Tecnal). O material foi recolhido em um saco de papel, identificado e levado para o laboratório de Princípios Ativos da Amazônia – INPA para obtenção dos compostos de *P. aduncum*.

O extrato etanólico foi obtido por meio da maceração a frio usando 1,542 kg de folhas moídas em três litros de etanol destilado, onde permaneceu em repouso durante quinze dias em temperatura ambiente (26 °C). Após este período, o macerado foi filtrado com gaze e papel de filtro. A quantidade obtida do macerado após a filtração foi de 600 mL. O extrato foi concentrado em rotaevaporador Fusiton a 50 °C com rotação de 42 RPM.

O extrato concentrado foi armazenado em frasco âmbar de 10 mL, fechado com papel alumínio, contendo pequenos furos, para evaporação dos solventes; submetidos a banho de areia até atingirem peso constante de 16,72 g.

O rendimento do extrato foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Teor do extrato} = M_{\text{extraído (g)}} / M_{\text{mat. Moído}} \times 100$$

$$\% \text{ Teor do extrato} = 15,01 / 1542,87 \times 100 = 97\%$$

Obtenção das fases

Para obtenção das fases de *P. aduncum*, o extrato etanólico foi fracionado pelo processo de partição líquido-líquido, utilizando os solventes de polaridade crescente: hexano [CH₃(CH₂)₄CH₃], clorofórmio (CHCl₃) e N-butanol (C₄H₁₀O) respectivamente; isolando os constituintes químicos presentes de acordo com sua polaridade.

O extrato etanólico foi redissolvido com 100 mL de metanol/H₂O destilada na proporção 9:1 (90 mL de metanol misturado com 10 mL de água), que agora passa a ser chamado de fase hidroalcoólica. A dissolução foi obtida em lavadora Ultra-Sônica (Unique). Em seguida, o extrato foi adicionado em um funil de separação.

Para obtenção da fase hexânica, 100 mL do solvente hexano foi adicionado no funil de separação contendo fase hidroalcolica. Para a formação das fases hexânica e hidroalcolica, o funil foi colocado em um tripé e a tampa da parte superior aberta. No momento da formação das fases, a hexânica tomou a parte superior, enquanto que a hidroalcolica, a parte inferior.

O processo de concentração da fase hexânica foi realizado em rotaevaporador Fusiton. A concentração foi obtida a 40 °C e 60 RPM. A retirada do material concentrado foi feito com a adição de pequenas alíquotas do solvente hexano no balão e solubilizado em lavadora Ultra-Sônica. O material foi armazenado em frasco âmbar, tampando com papel alumínio contendo pequenos furos e levado para banho de areia até atingir peso constante.

Para obtenção da fase clorofórmica, a fase hidroalcolica foi adicionada ao funil de separação e ajustada na proporção 7:3, com adição de 30 mL de água destilada. Em seguida, 100 mL do solvente clorofórmio foram adicionados no funil. A coleta e o processo de concentração foram os mesmos descritos anteriormente.

Para obtenção da fase N-butanólica, 50 mL de água destilada e 100 mL do solvente N-butanol foram adicionados à fase hidroalcolica no funil. A coleta e processo de concentração são o mesmo que o descrito para as fases anteriores. No momento da formação das fases, a fase N-butanol ficou na parte superior do funil. Para concentrar a fase N-butanólica a temperatura usada foi 60 °C e rotação 90 RPM, devido ao ponto de ebulição ser maior que os demais solventes.

Obtenção do óleo de *P. aduncum*

O óleo foi obtido pelo método de hidrodestilação em um sistema extrator Clevenger modificado, que se divide em duas técnicas: arraste a vapor (CRAVEIRO, et al., 1981) e coobação (SANTOS, et al., 1998). O processo de coleta e obtenção da biomassa seca segue o mesmo que o descrito anteriormente.

Foram utilizados 1117,21g de folhas secas em estufa em 3000 mL de água destilada, aquecida a 100 °C em manta aquecedora até ebulição da mistura (SANTOS, et al., 2004).

Os vapores de água e os compostos voláteis foram levados ao condensador para realizar a troca de calor, condensando os vapores com a água de refrigeração em operação. Nessa etapa, foram visualizadas no tubo separador do extrator, as formas líquidas do óleo essencial e da água, com esta retornando para o balão através do tubo de retorno e o óleo volátil, por ser mais pesado que a água, se alojando no fundo do tubo separador. Esse ciclo se repetiu continuamente durante quatro horas (SANTOS, et al., 2004).

O hidrolato destilado foi adicionado em funil de separação com 300 mL de dicloro metano para obter a separação da água e do óleo. O processo foi repetido três vezes. Em seguida foi realizado o processo de concentração em um trap llambor TGI de 500 mL acoplado ao rotaevaporador Fusiton a 50 °C e 60 RPM, obtendo um rendimento de 7,1 mL de óleo volátil (SANTOS et al. 2004).

$$T_O = V_o \text{ (mL)} / B_m \text{ (g)} \times 100$$

$$T_O = 7,61 / 1117,21 = 0,68 \%$$

Onde: TO = teor de óleo volátil em porcentagem (mL do óleo essencial em 100 g de biomassa úmida; Vo = volume de óleo essencial lido diretamente na proveta; Bm = Biomassa vegetal; 100 = fator de conversão para porcentagem.

O óleo foi armazenado em um frasco âmbar, fechado, a 5 °C para futuras avaliações.

Obtenção das concentrações do óleo e das fases de *P. aduncum*

Para obtenção das concentrações da fase hexânica (10,06 g), foram utilizados 100 mg do material seco que foi misturado e dissolvido em 10 mL do solvente Tween 80 a 2,5% em lavadora Ultra-Sônica (Unique), obtendo a concentração padrão de 10000 µg.mL⁻¹.

As concentrações 1000 e 100 µg.mL⁻¹ foram obtidas pelo processo de diluição. Foram retirados da solução estoque 1 mL e 100 µL, e adicionados em frasco âmbar contendo 9 e 9,9 mL de Tween 80 a 2,5 %, respectivamente.

O mesmo processo foi realizado para obtenção do óleo volátil e das fases clorofórmica (4,16 g), N-butanólica (1,92 g) e hidroalcolica (0,58 g). O solvente utilizado para as fases e óleo volátil foi dimetilsulfóxido (DMSO).

Identificação do Dilapiol no óleo essencial de *P. aduncum* por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)

A porcentagem relativa de dilapiol foi determinada em um cromatógrafo Thermo, modelo Trace GC Ultra, equipado com uma coluna capilar de sílica Supelcowax-10 de 30 m com 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme. As condições de funcionamento foram temperatura de injetor a 250 °C, programação de forno: 0 min a 120° C, subindo 6° C/min até 240° C, permanecendo por 10 min. O arraste, feito por gás hélio a 1,4 mL/min. e modo de injeção split na razão de 1:20 com injeção de 1 µL. A zona de transferência foi a 250 °C. O Detector de Espectrometria de Massas, da Thermo, modelo DSQ-II, com ionização por impacto eletrônico (70 eV), foi programado em modo *Full Scan* com faixa de varredura de 50 a 650 m/z, ion source a 200° C.

Avaliação preliminar do efeito das fases e do óleo essencial de *P. aduncum* sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*

Preliminarmente foi realizado um ensaio visando avaliar o efeito das fases hexânica, clorofórmica, N-butanólica, hidroalcolica e do óleo volátil da planta, no crescimento micelial do fungo. Foram utilizadas placas de petri de 100 x 15 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA onde foram perfurados poços de aproximadamente 8 mm de diâmetro em pontos equidistantes, nos quais foram depositadas alíquotas individuais de 30 µL das concentrações 10000, 1000 e 100 µg.mL⁻¹ das fases e do óleo volátil. Como testemunha foi utilizada água destilada e esterilizada. No centro de cada placa foi depositado um disco de meio de cultura de aproximadamente 8 mm de diâmetro contendo a colônia do fungo *C. cassiicola*. Foram

feitas três repetições de cada concentração. As placas foram incubadas em BOD sem fotoperíodo, a 27 °C por cinco dias.

A avaliação foi feita por meio da observação da formação de halo de inibição do crescimento micelial do fungo, nos diferentes tratamentos. Somente as fases hexânica e clorofórmica apresentaram halo de inibição na concentração 10000 µg/mL e foram selecionados para os experimentos seguintes.

Obtenção das concentrações do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Após a identificação da concentração e fases que apresentaram efeito antifúngico sobre *C. cassicola*, foram preparadas novas diluições das mesmas, com o objetivo de identificar a concentração inibitória mínima CIM.

Para obtenção das concentrações da fase hexânica foram utilizados 300 mg do material vegetal seco misturados em 30 mL de tween 80 a 2,5% e dissolvidos em lavadora Ultra-Sônica (Unique), obtendo uma solução padrão de 30000 µg/mL.

Para obter as concentrações: 10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 µg.mL⁻¹, foram retirados da solução padrão 10, 8, 6, 4, e 2 mL e adicionados em frasco âmbar, esterilizado, contendo 0, 2, 4, 6 e 8 mL de Tween 80 a 2,5%, respectivamente, seguindo o mesmo processo descrito acima.

A fase clorofórmica e o extrato etanólico foram obtidos através do mesmo procedimento descrito para obtenção da fase hexânica, utilizado-se os solventes DMSO e etanol, respectivamente. O extrato e as fases foram esterilizados em membrana Millipore® de 0,22 µm de diâmetro de poro.

Efeito antifúngico do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica no crescimento micelial

Para o ensaio do efeito antifúngico no crescimento micelial de *C. cassicola* foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente.

Foram adicionados em cada poço 30µL das concentrações, obtidas no item anterior, (10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 µg.mL⁻¹) das fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico. O fungicida Priori[®] (Syngenta) foi utilizado como controle positivo e água destilada e esterilizada como controle negativo.

No centro de cada placa foi depositado um disco de 8 mm de diâmetro de meio de cultura contendo colônia do fungo. A avaliação foi feita medindo o halo de formado entre a borda dos poços e a colônia do fungo com um paquímetro digital (Digimess) no momento em que o crescimento do micélio do fungo atingiu o poço que continha a testemunha.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 com 10 repetições; sendo os fatores três sub-produtos vegetais (fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico) e cinco concentrações de cada. Cada repetição foi constituída de uma placa. A análise estatística dos dados foi realizada no programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011) e aplicado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Efeito antifúngico do extrato etanólico e das fases hexânica e clorofórmica na germinação dos conídios

Para este ensaio foi utilizado o método descrito por Nelly (1978) com modificações. Foi utilizado uma alíquota de 1 mL de suspensão do inóculo do fungo na concentração 10^4 conídios.mL⁻¹ diluído em 30 µL das concentrações (10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 µg.mL⁻¹) das fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico. Os controles positivo e negativo foram os mesmo do item anterior.

Sobre lâminas cobertas com papel celofane foi depositada uma alíquota de 10 µL de cada tratamento e mantidos em BOD sem fotoperíodo, a 27 °C durante 48 horas. A quantificação dos esporos germinados foi realizada em 50 conídios escolhidos aleatoriamente. Para isso foi fixado 10 µL de água destilada para observação da germinação em microscópio óptico Motique BA310, na objetiva EF-N Plan 40x/0,65 (∞/0,17). Foi considerado como germinado, os conídios que apresentaram indício de formação de tubo germinativo (DOMINGUES et al., 2011).

O delineamento experimental, a análise estatística e o teste aplicado foram os mesmo que o descrito para avaliação do crescimento micelial, onde cada lâmina cotinha duas alíquotas de 10 µL e cada alíquota representou uma repetição.

Fase *in vivo*

Os trabalhos *in vivo* foram desenvolvidos em casa de vegetação no setor de olericultura da Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM.

Preparo das mudas de tomateiro

Foram utilizadas plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada (Paulista) da Islapro semeadas em uma bandeja de isopor, medindo 68 x 34 cm com 128 células contendo substrato Tropstrato HT[®] Hortaliças, foram semeadas três sementes em cada célula.

A irrigação foi realizada duas vezes ao dia. Após trinta dias da semeadura, quando as mudas já apresentavam quatro folhas definitivas, foram transplantadas para copos polietileno de 500 mL contendo latossolo amarelo peneirado e com acidez corrigida. Para isso foi adicionado e misturado 1 g de calcário dolomítico com 500 mg de solo. A quantidade recomendada do corretivo foi obtida por meio do cálculo de correção com base nos resultados analíticos da amostra do solo. Teste de

Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com mudas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, visando verificar a viabilidade patogênica do isolado de *C. cassiicola* a ser utilizado nas fases seguintes do trabalho.

A inoculação das plantas foi realizada trinta e três dias após germinação das sementes utilizando suspensão de inóculo na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹, pulverizada na superfície abaxial e adaxial das plantas. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida, preparada com plástico transparente e umedecidos, durante 48 horas.

A avaliação foi feita pela observação do surgimento dos sintomas típicos da doença nas plantas. Foi feito o reisolamento do fungo para a confirmação da etilogia.

Avaliação do efeito profilático e curativo do extrato aquoso de *P. aduncum* no controle da mancha alvo

Nesta fase, 300 g de folhas frescas foram trituradas em 2 L de água em um liquidificador. Em seguida, o extrato foi filtrado com coador de algodão e armazenado em garrafas plásticas a 5 °C para futuras aplicações.

Para a avaliação do efeito profilático foi utilizado o extrato aquoso de *P. aduncum* nas dosagens de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (volume de extrato aquoso/volume de água), pulverizados durante dez dias em mudas de tomateiro com trinta e três dias de idade. Após esse período foram inoculados esporos de *C. cassiicola*, seguindo a mesma metodologia descrita no teste de patogenicidade.

Para a avaliação do efeito curativo, o patógeno foi primeiramente inoculado nas mudas de tomate e após quarenta e oito horas de incubação em câmara úmida foi iniciada a aplicação do extrato aquoso nas mesmas dosagens utilizadas no ensaio anterior.

A avaliação do experimento foi feita diariamente durante dez dias após a inoculação do fungo nas quatro folhas baixas de cada planta, por meio da quantificação da severidade dos sintomas, de acordo com a escala de notas descrita por Oliveira et al. (2006), com atribuição de notas: 0 = Ausência de sintomas; 1 = < 1 % de área foliar afetada (afa); 2 = 1 a 3 % de afa; 3 = 3,1 a 6 % de afa; 4 = 6,1 a 12 % de afa; 5 = 12,1 a 25 % de afa; 6 = 21,5 a 50 % de afa e 7 = > 50,1 % de afa.

Com os dados da severidade da doença foram elaborados para cada tratamento o cálculo da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), utilizando a fórmula descrita por Campbell e Madden (1990), $AACPD = \sum [((y_1+y_2)/2) \times (t_2-t_1)]$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela experimental constituída de um copo com duas mudas de tomateiro. A análise estatística dos dados foi realizada no programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011) e aplicado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos

As fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *P. aduncum* inibiram o crescimento micelial e na germinação dos conídios de *C. cassiicola*. As concentrações da fase hexânica e o extrato etanólico não apresentaram diferenças estatísticas na avaliação da inibição do crescimento micelial.

Na fase hexânica, todas as concentrações testadas neste estudo não diferiram estatisticamente do fungicida Piori na avaliação da inibição do crescimento micelial. Na concentração de $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observado o maior halo de inibição, 7,86 mm. Já na avaliação da germinação dos conídios, nesta fase, foi observada inibição de 87,40% da germinação dos conídios, que foi mais eficiente que o fungicida; nas concentrações 6000, 4000 e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ observou-se que foram menos eficientes na germinação dos conídios em relação ao fungicida, porém, foram superiores quando comparados com a água, o controle negativo. (Tabela 1 e 2).

Na fase clorofórmica, em relação à avaliação da inibição do crescimento micelial, as concentrações 10000, 8000, 6000 e $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram mesmo efeito que o fungicida. O maior halo de inibição foi 7,35 mm em $8000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quanto a germinação dos conídios, as concentrações 10000, 8000 e $6000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não diferiram estatisticamente do fungicida Piori, sendo que a maior concentração inibiu 84,20% destes; em 4000 e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a inibição foi significativa quando comparados com o controle positivo (Tabela 1 e 2).

No extrato etanólico as concentrações 10000, 8000 e $6000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram mais eficientes, com halos de inibição, 11,47, 10,75 e 9,43 mm, que em 4000, $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$

e o Fungicida, que esses não apresentaram diferenças estatísticas. Na avaliação da germinação dos conídios todas as concentrações foram eficientes quando comparados com o controle positivo. As concentrações 10000 e 8000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram 97,20 e 92,80% da germinação, que foram superiores as concentrações 6000, 4000, 2000 e o fungicida, onde não diferiram estatisticamente (Tabela 1 e 2).

Ao comparar a atividade antifúngica entre as fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólica de folhas de *P. aduncum* observou-se que na concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estes compostos tiveram o mesmo efeito na avaliação da inibição do crescimento micelial, sendo que, na fase hexânica foi obtido o maior halo de inibição, 8,13 mm. Ainda, nos diferentes compostos, observou-se uma variação dos resultados nas concentrações aplicadas tanto nos ensaios de crescimento micelial quanto da germinação dos esporos. (Tabela 1 e 2).

Em relação à CIM sobre o crescimento micelial do fungo, a concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das fases hexânica e extrato etanólico, apresentaram halo de inibição de 8,57 e 7,03 mm respectivamente, onde os mesmos não diferiram estatisticamente do fungicida, quando submetidos ao teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Já na fase clorofórmica a CIM foi encontrada em 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 1).

Para o teste de germinação dos conídios a CIM foi obtida na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, das fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico, quando comparados com o controle positivo, onde promoveu inibição acima de 50% e que somente o extrato etanólico não diferiu estatisticamente do controle positivo (Tabela 2).

Tabela 1 - Média (mm) do halo de inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *Piper aduncum*

Fases e extrato	Concentrações $\mu\text{g.mL}^{-1}$					Controles	
	10000	8000	6000	4000	2000	(+)	(-)
Fase hexânica	7,86 bA	8,71 bA	7,55 bA	8,13 aA	8,57 aA	7,17 aA	0,00 aB
Fase clorofórmica	6,42 bA	6,63 cA	7,35 bA	7,29 aA	5,59 bB	7,17 aA	0,00 aB
Extrato etanólico	11,47 aA	10,75 aA	9,43 aA	7,01 aB	7,03 bB	7,17 aB	0,00 aC

Nota: * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas = linhas, letras minúsculas = colunas. (+) fungicida Puri e (-) água destilada e esterelizada (testemunha)

Fonte: Vinicius Lima.

Tabela 2 - Porcentagem de conídios não germinados de *Corynespora cassiicola* nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *Piper aduncum*

Fases e extrato	Concentrações $\mu\text{g.mL}^{-1}$					Controles	
	10000	8000	6000	4000	2000	(+)	(-)
Fase hexânica	87,40 bA	73,60 bB	63,60 cC	60,80 bC	50,40 bD	79,20 aB	30,00 aE
Fase clorofórmica	84,20 bA	77,00 bA	79,20 bA	64,20 bB	59,60 bB	79,20 aA	30,00 aC
Extrato etanólico	97,20 aA	10,75 aA	89,40 aB	86,20 aB	87,80 aB	79,20 aB	30,00 aC

Nota: * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas = linhas, letras minúsculas = colunas. (+) fungicida Puri e (-) água destilada e esterelizada (testemunha)

Fonte: Vinicius Lima.

A inibição obtida nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico de *P. aduncum* nos ensaios de crescimento micelial e germinação dos conídios, neste estudo, são importantes, pois indicam a presença de substâncias ativas extratidas nos diferentes extratores que interferem no desenvolvimento e no processo de germinação e infecção de *C. cassiicola*.

Em ensaios fitoquímicos no Equador, Guerrini et al. (2009) identificaram 46 constituintes no óleo volátil de *P. aduncum*, representando 95,7% da composição. Dentre estes o Dilapiol, um fenilpropanóide, foi a substância química encontrada em maior quantidade (45,92%), estavam presentes também as substâncias Piperitone (8,4%) e trans-ocimeno (19%) em quantidades consideráveis.

Neste estudo a quantidade de Dilapiol encontrada foi de 33,55%, que está de acordo com as quantidades relatadas, variando de 30 a 90%, em quimiotipos frequentemente encontrado no Sudeste Asiático, Oceania e nas espécies da floresta Amazônica, onde neste último esta substância tem sido descrita como o principal constituinte do óleo volátil de *P. aduncum* (RALI, et al., 2007; ARZE, et al., 2008; SILVA, A. et al., 2009).

No Estado do Pará, Brasil, Almeida et al. (2009) confirmam a ação fungicida do Dilapiol obtido por cromatografia em coluna, onde o óleo volátil de *P. aduncum* foi fracionado com solvente hexano resultando em frações contendo 95,0-98,9% de Dilapiol. Em seguida, as frações obtidas foram submetidas a ensaios microbiológicos. As concentrações acima de 0,6 ppm inibiram completamente a germinação de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora), agente causal da vassoura de bruxa.

No presente trabalho de pesquisa não foi observado inibição na concentração de 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo volátil de *P. aduncum* no crescimento micelial de *C. cassicola* (Figura 1). O que indica que a ação antifúngica do óleo volátil não esta diretamente relacionada ao Dilapiol, mais com a presença de um conjunto de substâncias agindo simultaneamente nas fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico, pois as substâncias puras podem apresentar resultados diferentes quando comparados com conjunto de compostos, neste último, os resultados são mais próximos da realidade (GUERRINI, et al., 2009).

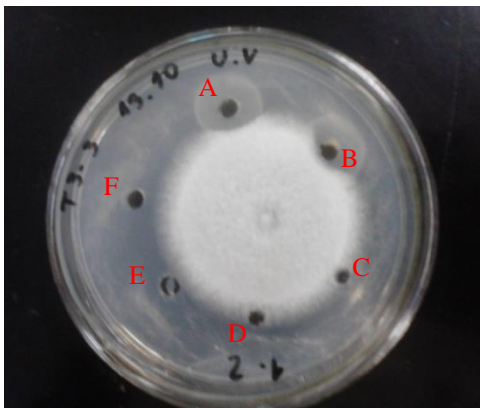


Figura 1 – Efeito antifúngico do extrato etanólico, fases e óleo volátil de *Piper aduncum* na concentração de 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (A) Fase hexânico; (B) Fase clorofórmica; (C) Fração hidroalcolólica; (D) Fase N-butanólica; (E) Óleo volátil e (F) Testemunha/água d estilada e esterilizada

Fonte: Vinicius Lima

De acordo com Morandim-Giannetti et al. (2010) no óleo volátil de *P. aduncum*, de plantas coletadas em São Paulo, não foi identificado Dilapiol na sua composição, porém apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill., neste caso a maior parte da composição do óleo era constituída de monoterpenos e a substância mais abundante foi Linalol (31,80%), sendo que, os sesquiterpenos foram mostrados em quantidades significativas e estruturalmente diversificada.

Ainda em São Paulo Navickiene (2006), identificou por meio de bioautografia direta em camada simple TCL e análise por cromatografia gasosa CG, a presença de sesquiterpenos em óleos volátil obtidos das folhas de *P. aduncum*, onde a menor

concentração da solução do óleo volátil capaz de promover a completa inibição do crescimento dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, foi de 50 µg.mL⁻¹.

A atividade antifúngica do óleo volátil de *P. aduncum* sobre fitopatógenos tem sido relacionada à presença de constituintes químicos identificados em análises cromatográficas. Neste estudo a atividade das fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico podem ser explicados com base nos estudos realizados nesta linha de pesquisa.

A inibição do crescimento micelial e germinação dos conídios na fase hexânica obtido neste trabalho poder ser atribuído à presença de substâncias que foram extraídas pelo solvente hexano e que mostraram-se antifúngicos a *C. cassicola*. Silva W. et al. (2009) avaliaram a toxicidade fase hexânica em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini*, e atribuíram este efeito a presença de Dilapiol (94,84%), pequenas quantidades de sesquiterpenos como: Neorodiol (0,74%), Globulol (0,65%) e Espatulenol (0,64). Estas substâncias foram quantificadas por CG-EM, a partir hidrodestilação da fase hexânica.

Com relação ao efeito antifúngico do extrato etanólico, um exemplo a ser citado é o de Lago et al. (2009) que fracionaram o extrato etanólico de folhas de *P. aduncum* e por cromatografia identificou três prenilados de benzoatos de metilo, uma flavonona e dois cromenos. O composto hidroperóxido, benzoato de metilo, 4-hidroxi-3-(20-hidroperoxi-30-metil-30-butenil) apresentou elevada atividade fungitóxica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, em bioautografia direta em placa de TLC, onde a CIM foi de 1 µg.mL⁻¹. Este resultado foi semelhante aos controles positivos (nistanina e miconazol) utilizado nesta mesma concentração inibindo crescimento dos

fungos. Isso indica que essa substância pode estar presente no extrato etanólico deste estudo.

O extrato etanólico e fase hexânica de *P. aduncum* apresentaram maior halo de inibição em todas as concentrações contra *C. cassiicola*. A CIM para ambos foi em $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em *P. chaba*, o solvente etanol também foi bastante eficiente na extração de substância ativas nesta espécie, promovendo 54,4 – 68,2% da inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *P. capsici*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizotonia solani* J.G. Kühn e *Colletotrichum capsici* (Syd.) EJ Butler & Bisby; ainda, a CIM variou entre $250 - 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no extrato etanólico e na fase clorofórmica, enquanto que, na fase hexânica, a atividade antifúngica foi menos eficiente (RHAMAM, et al, 2011).

A fase hexânica, em relação à fase clorofórmica e extrato etanólico de *P. aduncum*, na concentração de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou o maior halo de inibição, sendo este de 8,57 mm, maior que o controle positivo, onde o halo foi de 7,17 mm, não havendo diferença estática entre ambos.

Neste estudo a fase hexânica mostrou-se mais eficiente que o fungicida Piori em relação à média do tamanho da formação do halo de inibição. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o solvente hexano ser apolar e apresentar afinidade com os compostos ativos presentes no óleo essencial de *P. aduncum* (SILVA W. et al., 2009).

Neste estudo o efeito antifúngico da fase clorofórmica de *P. aduncum* foi menos eficiente, pois os halos de inibição do crescimento micelial apresentam médias menores em todas as concentrações desta fase, diferente do observado na fase hexânica e extrato etanólico contra o fungo *C. cassiicola*. Este resultado difere dos estudos recentemente obtidos por Bussaman et al. (2012) em que a fase clorofórmica de folhas

de *P. sarmentosum*, na concentração de 2,5% mostrou-se mais ativo que o etanólico, cuja inibição foi de 77,75% e 16,5% ,respectivamente, no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

O mesmo resultado foi observado ainda em *P. belte*, em que a fase clorofórmica inibiu 72,36-78,53% e CIM foi encontrado em 17,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que inibiu completamente o crescimento micelial de *C. capsici* (JOHNNY, et al., 2011). Nesta mesma espécie a fase hexânica não apresentou nenhuma atividade antifúngica contra *R. solani* (SEEMA, et al., 2011).

Em trabalhos realizados com outras espécies de plantas, observa-se uma variação da atividade antifúngica em diferentes extratores. Alguns exemplos podem ser tomados como a fase clorofórmica de *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu que apresentou maior atividade antifúngica, com inibição de 32,4-45,1% do crescimento micelial, onde a CIM foi observada em 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *F. oxysporum* e *F. solani*, enquanto que a fase hexânico não apresentou nenhum efeito antifúngico (BAJPAI; KANG, 2010). Resultado diferente foi obtido com a fase hexânica de *C. ambrosioides* na concentração de 0,3%, que inibiu completamente o crescimento micelial dos fungo *F. oxysporum* (JARDIM, et al., 2010).

O desenvolvimento de pesquisas nesta linha de efeito antifúngico de extratos, fases e óleo volátil de plantas sobre o crescimento micelial e germinação dos esporos fungos fitopatogênicos *in vitro* vem sendo bastante explorado e já apresenta resultados promissores (Tabelas 3).

Tabela 3 - Exemplos de efeito antifúngico de extratos, fases e óleo volátil de plantas sobre crescimento micelial e germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos

Planta	Patógeno	Composto	Referências
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Colletotrichum acutatum</i> J. H.	Fase hexânica Extrato etanólico	Domingues et al. 2009
<i>Cestrum nocturnum</i> L.	<i>Phytophthora capsici</i> L.	Fase hexânica Óleo volátil	Al- Reza et al. 2010
<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Colletotrichum musae</i> (Berk. & M.A. Curtis) Arx	Óleo volátil	Romero et al. 2009
<i>Alpinia galanga</i> L.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penzig)	Fase clorofórmica	Johnny et al. 2010
<i>Agave lechuquilla</i> Torr.	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Extrato hexânico Extrato etananólico	Rodríguez et al. 2011

Em relação às fases N-butanólica e hidroalcóolica de *P. aduncum* não foram observados efeitos antifúngicos destas sobre o crescimento micelial de *C. cassicola*, esse fato pode ter ocorrido, porque os princípios ativos que foram extraídos por estes solventes não apresentaram atividade sobre o fungo, ou podem estar em pequenas quantidades (ALMEIDA, T. et al., 2009; AYATOLLAHI, et al., 2010).

Na avaliação da germinação dos conídios de *C. cassicola* neste estudo, observou-se a superioridade da atividade antifúngica do extrato etanólico de *P. adundum* em relação às fases hexânica e clorofórmica. Semelhantemente, Domingues et al. (2009) obtiveram maior efeito no extratos etanólico do que na fase hexânica de *Coffea arábica* L., onde o primeira na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, inibio 81,3% da germinação dos conídios de *C. acutatum*.

Neste trabalho, a CIM da germinação dos conídios de *C. cassicola* foi obtida no extrato etanólico na concentração 2000 µg.mL⁻¹ com inibição de 87,8%. Nesta mesma concentração Rodríguez et al. (2011) relatam a inibição de 94,3% da germinação dos conídios de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., sobre o extrato etanólico de *Yucca filirera* Chaub. O efeito antifúngico deste extrato esta relacionado com a

presença de compostos polifenólicos ativos que apresentam afinidades com o solvente polar etanol.

Quanto ao gênero *Piper*, a fase clorofórmica de *P. sarmentosum* na concentração de 2,5% inibiu completamente a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, enquanto que, o extrato etanólico a inibiu apenas 56,75%. Este resultado difere do obtido nesta pesquisa, em que o extrato etanólico foi mais eficiente que a fase clorofórmica e que CIM do primeiro não diferiu estatisticamente do fungicida Piori.

Em *P. belte*, o extrato de metanólico, na concentração de 10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou maiores percentuais de inibição da germinação dos esporos de *C. capsici*, variando entre 72,91 e 80,93% (JOHNNY, et al., 2011). Esses valores são similares aos obtidos neste trabalho, em que o extrato etanólico apresentou a maior atividade antifúngica, confirmando a presença de compostos ativos, que apresentam afinidades com este solvente de mesma polaridade que o metanol.

De acordo com a metodologia de Bagum et al., 2007 os extratos de planta, obtidos por solventes, que inibem mais de 50% da esporulação são considerados efetivos no controle, as fases hexânica, clorofórmica e extrato etanólico, apresentam potencial antifúngico na sua menor concentração, inibindo 50,4%, 59,6% e 87,8% respectivamente.

Ao comparar os resultados obtidos nesta pesquisa com outras anteriores, considera-se uma variação da atividade antifúngica dos extratos, fases e óleos voláteis na inibição do crescimento micelial e germinação dos esporos. Isso pode ocorrer devido à presença de substâncias que apresentam afinidades com os solventes no momento do fracionamento, tipos de compostos químicos presentes nas diferentes espécies de

plantas, quantidade de substâncias extraídas, idade da planta, tempo de coleta da planta, tipo de clima, solo, manejo e método de extração (DOMINGUES, et al., 2009; SILVA, A. et al., 2009; VENTUROSO, et al., 2011; BUSSAMAN, et al., 2012).

O efeito antifúngico dos óleos voláteis, extratos e fases obtidos por diferentes solvente é atribuído a presença de diversos compostos ativos como hidrocarbonetos de mono e sesquiterpenos, mono e sesquiterpenos oxigenados presentes nas diversas espécies de plantas e também nas do gênero *Piper*, dentre estes piperitone (JOHANN, et al., 2007), α -humelene, Globulol, Espatulanol, Nerolidiol, Linalol, 1-8 ciolene (RAHMAN, et al. 2011) Dilapoil (GUERRINI, et al., 2009). Segundo Oliveira et al., 2011, o mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular.

O sucesso de resultados bem sucedidos dos compostos a partir de plantas e seus órgãos são largamente dependentes do solvente utilizado na extração. Isso explica a variação dos resultados obtidos tanto nesta, como em outras pesquisas já realizadas.

Efeitos curativo e profilático do extrato de *P. aduncum*

No teste do efeito curativo, os tratamentos 1:1 e 1:2 (extrato bruto/água) apresentaram efeito significativo na redução da severidade da doença. Já os tratamentos 1:3, 1:4 não diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 4).

Ao considerar a AACPD foi observado efeito significativo de todos os tratamentos avaliados em comparação com a testemunha (Skott-Knott 5%), demonstrando efeito curativo do extrato aquoso de *P. aduncum* sobre *C. cassicola* em tomateiro (Figura 2).

No teste profilático não houve diferença significativa quanto à severidade da doença entre os tratamentos e a testemunha. Esse mesmo resultado foi obtido para AACPD, demonstrando que o extrato aquoso não tem efetividade no controle da doença.

O ensaio profilático apresentou maior porcentagem de severidade de doença quando comparado com o ensaio curativo, indicando o efeito direto no patógeno e não induzindo resistência a planta de tomate (Tabela 3).

Tabela 4 - Avaliação do efeito curativo e profilático do extrato aquoso de *Piper aduncum* sobre a severidade e área abaixo da curva do progresso da doença

Tratamentos	Curativo		Profilático	
	Severidade (%)	AACPD	Severidade (%)	AACPD
1:1	2,39 b	448,63 b	8,16 a	1343,85 a
1:2	3,09 b	441,79 b	15,14 a	2658,93 a
1:3	3,91 a	429,28 b	24,23 a	3353,06 a
1:4	4,75 a	581,16 b	15,67 a	2764,80 a
Testemunha	5,23 a	919,82 a	23,67 a	4477,56 a

Nota: * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. AACPD – área abaixo da curva do progresso da doença

Fonte: Vinicius Lima.

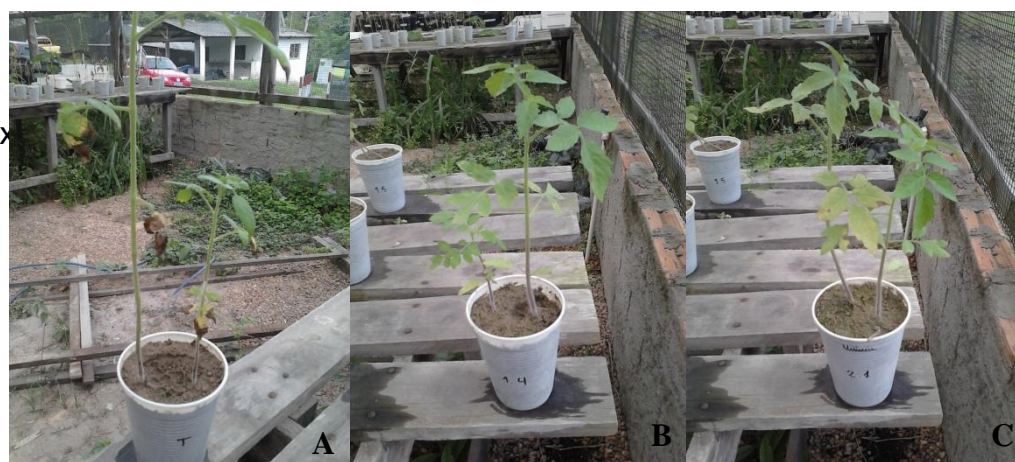


Figura 2 - Efeito curativo do extrato aquoso de *Piper aduncum* em mudas de tomateiro. (A) testemunha; (B) tratamento 1:1 e (C) tratamento 1:2

Fonte: Vinicius Lima

Os estudos realizados neste trabalho estão de acordo com trabalhos anteriores, em que o teste de efeito curativo implica na redução do desenvolvimento dos sintomas da doença quando aplicados durante de período de incubação do fitopatógeno no tecido suscetível, diminuindo o desenvolvimento e a severidade da doença (GODOY; CANTERI, 2004; FARIA, et al., 2009; PERINI, et al, 2011).

A atividade antifúngica demonstrada no ensaio curativo confirmam os resultados obtidos nos testes *in vitro*, em que não se verificou o efeito fungitóxico e sim um antagonismo do extrato aquoso, inibindo parcialmente o desenvolvimento do fungo no tecido suscetível. Neste estudo, o extrato aquoso de *P. aduncum* reduziu a severidade da doença e a AACPD, demonstrando que a presença da substância dilapiol e de compostos ativos como hidroperóxidos, mono e sesquiterpenos, identificados nesta espécie, podem ter sido extraídos em água e estar atuando diretamente sobre o fitopatógeno.

A presença de substâncias ativas, com potencial efeito antifúngico, identificadas em extrato bruto e dissolvidas em água e as mesmas purificadas já tem sido relatada. Saha et al. (2012) que isolaram xanthatin, uma lactona sesquiterpênica, de *Xanthium strumarium* L. e mostraram a redução máxima da porcentagem de doença fúngica foliar, agindo diretamente sobre fungo *Curvularia eragrostidis* (P. Hennings) J. A. Meyer.

Em relação à severidade e AACPD, resultados semelhantes a esta pesquisa foram relatados em trabalhos anteriores utilizando extrato aquoso de plantas sobre fungos fitopatogênicos em ensaios de efeito curativo, como é o caso do extrato aquoso de *A. sativum* que reduziu 62,94% da severidade e a AACPD foi de 75,43, nas dosagens de 20 mL.L⁻¹, de míldio causado por *Plasmopara viticola*

(Berk. & M. A. Curtis) Berl. & De Toni (LEITE, et al., 2011). Neste estudo o extrato aquoso de *P. aduncum* reduziu a severidade da doença em 55,07 e 40,92% e AACPD foi 448,64 e 441,79, nos tratamentos 1:1 e 1:2 respectivamente.

Menezes et al. (2009) também analisaram o efeito curativo no controle de *Alternaria solani* Sor, em tomateiros, onde o extrato de alho e gengibre foram eficientes no controle, com valores de AACPD menores que os da testemunha e índice de severidade em 32%.

É difícil comparar os resultados obtidos a partir de diferentes estudos porque a composição química dos extratos varia muito. Em estudos anteriores, as análises do efeito antifúngico em teste *in vivo* de vários extratos mostram que eles apresentam diferentes resultados contra fungos fitopatogênicos de diferentes plantas (BAJPAI, et al., 2009).

O sucesso no teste de efeito curativo do extrato aquoso de *P. aduncum* em comparação com os trabalhos já mencionados pode ser atribuído ao contato do extrato com a superfície das folhas suscetíveis, a movimentação translaminar e transcutilar dos compostos com estrutura química que permitem a entrada e penetração nas células das plantas, tornando-se tóxicos aos processos vitais do fungo sem afetar mesma (MENEZES, et al., 2009; BAJPAI, et al., 2009; LEITE, et al., 2011).

A redução significativa na severidade da doença e na AACPD com o uso do extrato aquoso no teste profilático, ou seja, de maneira preventiva, deve-se à existência de composto (s) ou substância (s) com ação antifúngica extraída dos tecidos pela água. Este fato não foi observado com tanta eficiência neste estudo.

Segundo Falkenberg et al. (2004), o solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível, extraindo apenas as substâncias desejadas em maior quantidade. A água

extrai as saponinas e alcalóides. Portanto, no extrato aquoso, no presente trabalho, não contém determinadas substâncias bioativas ou podem estar em quantidades muito baixas.

Faria et al. (2009) confirmam essa idéia ao observarem que o extrato hidroetanólico de *Mormodica charantia* L. na concentração de 20% aplicada de forma preventiva, seis e três dia antes da inoculação de escleródios de *S. rolfsi*, junto a semente de feijão da cultivar “carioquinha”, apresentou média de severidade de 0,6% e redução da mesma de 74%, enquanto que o extrato aquoso no controle da doença não apresentou diferença do controle quando aplicado de forma preventiva. Estes autores argumentam que a ineficiência deste extrato pode ter sido devido à ausência ou baixas quantidades de compostos bioativos extraídos no extrato aquoso.

Plantas de tomateiros tratadas com extratos brutos aquosos de *A. camphorata* e *R. officinalis* na concentração de 20 e 30%, verificou-se a redução e até mesmo ausência de lesões em folhas acima das que recebem tratamentos, indicando a indução de mecanismos de defesa contra *C. fluvus*, tais como: lignificação, papilas ou enzimas relacionadas a patogênese (α , 1-3 glucanase, quitinase), levando a diminuição da severidade de cladosporiose no tomateiro (ITAKO, et al., 2009). Tornando evidente a ausência de compostos químicos em *P. aduncum* ou ineficiência deste na indução de mecanismos de defesa contra *C. cassicola*.

6. CONCLUSÕES

As fases hexânica, clorofórmica e o extrato etanólico de *P. aduncum* foram eficientes na inibição do crescimento micelial e germinação dos conídios de *C. cassiicola*.

O óleo essencial de *P. aduncum* não apresentou nenhuma atividade antifúngica, nas concentrações testadas, no crescimento micelial do fungo.

O extrato etanólico apresentou efeito antifúngico em todas as concentrações testadas contra *C. cassiicola*. Neste foi observado o maior halo de inibição do crescimento micelial na concentração 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quanto a germinação dos conídios, neste extrato foi encontrado a CIM em 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que deferindo significativamente do controle positivo.

As fases hexânica e clorofórmica apresentaram efeito antifúngico sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*, porém a menor concentração 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fase clorofórmica não diferiu estatisticamente do controle negativo. A CIM sobre o crescimento micelial foi encontrado na fase hexânica em 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

No este *in vivo*, o extrato aquoso foi eficiente no controle da doença, reduzindo a severidade nos tratamentos 1:1 e 1:2 (extrato/água) no teste de efeito curativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 53-90.

ALMEIDA, R. R. P. et al. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n. 9, p. 1427-1433, 2009.

ALMEIDA, T. F. et al. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 196-201, 2009.

AL-REZA, S. M. et al. Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 86-92, 2010, 2010.

AYATOLLAHIA, A. M. et al. Biological Screening of *Euphorbia Aellenii*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 429-436.

ARZE, J.B.L., et al. Essential oils from Bolivia. VIII. Piperaceae: *Piper heterophyllum* Ruiz et Pavón, *P. aduncum* L. **Journal of essential oil-bearing plants**, v. 11, n. 1, p. 53-57, 2008.

BAJPAI, H. R. et al. Microbial conversion and *in vitro* and *in vivo* antifungal assessment of bioconverted docosahexaenoic acid (bDHA) used against agricultural plant pathogenic fungi, **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 695-704, 2009.

BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, n. 4, p. 327-336, 2010.

BAJPAI, V. K. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8903-8908, 2008.

BARNETT, H. L., HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 2 ed. Mineapolis, Minnessotta, 1972.

BEGUM, J. et al. Antifungal activity of forty higher plants against phytopathogenic fungi. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v.24, n.1, p. 76-78, 2007.

BLAZQUEZ, C. H. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. p. 23.

BRAND, S. C. et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1881-1887, 2010.

BUSSAMAN, P. et al. Effect of crude leaf extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. **Hindawi Publishing Corporation Psyche**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to Plant Diseases Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 1990.

COLPAS, et al., Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 191-195, 2009.

COMBRINCK, S. et al. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. [33, n. 2](#), p. 344–349, 2011.

CONABIO. **Catálogo taxonômico de Especies de México. 1. Capital Natural do México**, Cidade do México, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et al.. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC- Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 1981, 210 p.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) Para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 737-740, 2010.

DEISING, H. B. et al. Mecanismos e significado de resistência a fungicidas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

DIXON, L. J. et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015-27, 2009.

DOMINGUES, R. J. et al. Ação “*in vitro*” de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n. 4, p. 643-649, 2009.

DOMINGUES, R. J. et al. Avaliação do potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n. 3, p. 149-151, 2011.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous hyphomycetes*, Kew Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

FALKENBERG, M. B. et al. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004. p. 229-246.

FARIA, F. A. et al. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 383-389, 2009.

FARR, D. F.; ROSSMAB, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal databases. Systematic Botany and Mycology Laboratory, ARS, USD**. (2011). Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>. Acesso em: 12 de janeiro 2011.

FORCELINI, C. A. Doenças em soja: entendendo as diferenças entre biotróficos e necrotróficos. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, XX, ed 120, p. 7-10, 2010.

GODOY, C. V; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 97-101, 2004.

GUERRINIA, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 39–48, 2009.

HOSSAINA, M. A. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n.3, p. 328–334, 2008.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.

ITAKO, A. T. et al. Controle de *Cladosporium fluvum* em tomateiros por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.1, p.75-83, jan./mar., 2009

JARDIM, C. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010.

JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 632-637, 2007.

JOHNNY, L. et al. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: Phyllachorales). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 20, p. 4157-4165, 2011.

JOHNNY, L. et al. The effect of herbal plant extracts on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Applied Biosciences**, v. 34, n. 1, p. 2218-2224, 2010.

KHAN, Z.S.; NASREEN, S. Phytochemical analysis, antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. **Journal of Agriculture Technology**, v. 6, n. 4, p. 793-805, 2010.

KORDALI, S. et al. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and *n*-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 3, p. 562–570, 2009.

LAGO, J. H. G. et al. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96–98, 2009.

LEITE, C. D. et al. Extrato de alho e óleo vegetal no controle do míldio da videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 429-436, 2011.

LEROY, M.; LOURD, M. Doença foliar do tomateiro causada por *Corynespora cassiicola* em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 32-36, 1989.

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido**. EMBRAPA HORTALIÇAS, Brasília, n. 53, p. 1-12, 2007 (circular técnico).

MALIK, A. et al. Modeling the three-dimensional structures of an unbound single-chain variable fragment (scFv) and its hypothetical complex with a *Corynespora cassiicola* toxin, cassiicolin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 16, n. 12, p. 1883–1893, 2010.

MARQUES, J. V. et al. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1807-1813, 2010.

MENEZES, V. O. et al. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

MIYAMOTO, T. et al. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. **Plant Pathology**, v. 59, n. 5, p. 873–881, 2010.

MORANDIM-GIANNETTI, A. A. et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814, 2010.

MULITERNO de MELO, M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

NARUZAWA, E.S.; PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 408-412, 2011.

NAVICKIENE, H. M. D. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NELLY, D. **Laboratory and greenhouse procedures methods for evaluation fungicides, nematocides and bactericides**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1978. 140 p.

NGHIA, N. A. et al. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 189–201, 2008.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OLIVEIRA, E. C. P. et al. Avaliação do óleo de copaíba (*Copaifera* spp) na inibição do crescimento micelial in vitro de fitopatógenos. *Ciências Agrárias*, Belém, n. 46, p. 53-63, 2006.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 855p.

PARRA, J. E. et al. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 280–282, 2011.

PERINI, V. B. M. et al. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2: p. 23-27, 2011.

POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25-31, 2012.

RAHMAN, A. et al. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 573–579, 2011.

RALI, T. et al. Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L. and *Piper gibbilimum* C.DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. Chemistry Department, University of PNG, Papua New Guinea. **Molecules**, v. 12, p. 389–394, 2007.

REZENDE, J. A. M. et al. Conceito de doenças, sintomatologia e diagnose: Isolamento de agentes fitopatogênicos. In: AMORIM, Lilian; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. 1, 2011. p. 54.

RIBAS, P. P., MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RODRÍGUEZ, D. J. et al. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 960– 966, 2011.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências biológicas e da saúde**, v. 11, n. 4, p. 8-15, 2009.

SAHA, D. et al. Control of foliar diseases of tea with *Xanthium strumarium* leaf extract. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 376– 382, 2012.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório: Descrição do Sistema de Extração de Óleos Essenciais**. Belém: EMBRAPA, n. 99, 2004. 6 p.(Comunicado técnico).

SANTOS, A. S. et al. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 28, n. 2, p. 128, 1998.

SCHLUB, R. L.; SMITH L. J. **Diagnostic Features of *Corynespora cassiicola* and its Associated Diseases**. NPDN, 2007.

SEEMA, M. et al. *In vitro* studies of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* Kuhn infecting FCV tobacco in Karnataka Light Soil, Karnataka, India. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 5, p. 1321-1329, 2011.

SEIXAS, P.T.L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, especial, p. 523-526, 2011.

SHIMOMOTO, Y. et al. Corynespora blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Journal of General Plant Pathology: JGPP**, v. 74, n. 4, p. 335–337, 2008.

SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 13p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 23).

SILVA, A. C. et al. Efeito in vitro de compostos de plantas de plantas sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1853-1860, 2009.

SILVA, W. C. et al. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 267-274, 2009.

SINGHA, I. M. et al. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2583–2589, 2011.

SOUZA, A. F. et al. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and Berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, p. 72–74, 2009.

SOUZA, L. S. et al. Doses de extrato de *Arrabidaea bilabiata* no controle de fungos fitopatogênicos. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2010, Ribeirão Preto. **Anais**, Ribeirão Preto; 2010. p. 454 – 458.

SOUZA, V. C.; LORENZI. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 80 p.

TERAMOTO, A. et al. Reaction of hybrids, inhibition in vitro and target spot control in cucumber. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 342-348, 2011

TROMBETA, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial **Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Mancha-alvo em mogno-africano no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 70-71, 2009.

VENTUROSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

WEI, C.T. Notes on *Corynespora*. **Mycological papers**, v. 34, p. 1-10, 1950.