USO DE EXTRATO DE *Plectranthus barbatus* COMO CONTROLE ALTERNATIVO DE *Colletotrichum musae*

¹Yasmim Freitas Figueiredo; ²Luciana Schulthais Altoé; ²Lucas Caetano Gonçalves; ³Marcelo Barreto da Silva.

1 Mestranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, e-mail: yasmim_f@hotmail.com.

2 Mestrando, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brasil.

3 Professor, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brasil.

Recebido em: 03/10/2016 – Aprovado em: 21/11/2016 – Publicado em: 05/12/2016
DOI: 10.18677/EnciBio_2016B_101

RESUMO

A antracnose, doença que ocorre pré-colheita e pós-colheita da banana, é causada pelo fungo *Colletotrichum musae* que leva a baixa qualidade dos frutos e traz prejuízos a sua comercialização. Este trabalho teve como objetivo padronizar frações ativas contra o *C. musae* obtidas através do extrato de folhas e flores de boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*) coletadas em diferentes meses do ano. As coletas foram realizadas nos meses de novembro à julho. Após, as folhas e flores sofreram processos de secagem, trituração e extração etanólica pela técnica de maceração. O extrato obtido foi seco para completa eliminação do solvente e redissolvido em concentração padronizada de etanol para aplicação nas placas cromatográficas. As frações de cada extrato foram separadas de acordo com o grau de polaridade pela técnica de cromatografia em camada delgada através da qual obteve-se 3 frações. Cada fração obtida foi dissolvida em dimetilsulfóxido e vertida em meio de cultura (BDA) fundente. Os tratamentos foram feitos em triplicata e foi avaliado o crescimento radial do fungo após 5 dias em BOD (25°C). Os melhores resultados foram obtidos a partir de flores coletadas no mês de fevereiro e a fração com maior inibição foi a fração 3 e 2. Obteve-se até 60% de inibição de crescimento do micélio do fungo em placa de Petri.

PALAVRAS-CHAVE: antracnose, banana, pós-colheita

USE EXTRACT OF *Plectranthus barbatus* AS A ALTERNATIVE CONTROL OF *Colletotrichum musae*

ABSTRACT

Anthrachnose, banana disease occurs in the pre-harvest and post-harvest, caused by *Colletotrichum musae* brings loss to their marketing. This work aimed to use methods for standardization of extracts of fractions microbiologically active sheets and flowers of false boldo (*Plectranthus barbatus*) and know the relationship of the months and extract fraction related to the activity of the pathogen. Leaf samples and flowers were taken from November to July. These processes suffered drying, grinding and ethanolic extraction into three fractions by macerating technique. Subsequently drying was performed, then dissolved in DMSO and transferred into flux culture medium (PDA). The treatments were evaluated in triplicate and the radial growth of

the fungus after 5 days under growth chamber (25 ° C). The best results were obtained from flowers collected in February and the fraction with highest inhibition was obtained fraction 3 and 2 to 60% growth inhibition of the fungal mycelium in petri dish.

KEYWORDS: anthracnose, banana, post-harvest

INTRODUÇÃO

A Banana é uma das frutas mais consumidas, sendo cultivada em muitos países e com uma produção mundial em 2012 de 133,3 milhões de toneladas (FAO, 2015). O consumo desta fruta é normalmente feito *in natura*, entretanto a banana é afetada por diversas doenças que propiciam rápida deterioração pós-colheita, diminuindo a qualidade do fruto (THUWAPANICHAYANAN et al., 2011).

Entre as doenças pós-colheita da banana se destaca como mais importante a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum musae* que leva a perdas de 30 a 40% dos frutos comerciáveis (MIRSHEKARI et al., 2012).

A antracnose é uma infecção latente, onde os esporos dos fungos infectam a banana ainda verde no campo, levando a manchas de coloração escura de vários tamanhos na casca dos frutos (LICHTENBERG & LICHTENBERG, 2011), o que diminui a aceitação por parte dos consumidores por tornar a aparência fora da faixa esperada para a aceitação da fruta (FRANCIS, 1995). O controle do *C. musae* ao longo dos anos se deu através do uso de produtos químicos (NEGREIROS et al., 2013).

O uso persistente de fungicidas resultou no surgimento de cepas resistentes ao patógeno (DE LAPEYRE DE BELLAIRE & CHILIN-CHARLES, 2008), além de uma série de problemas ambientais e de saúde, devido à toxicidade residual, carcinogenicidade, desequilíbrio hormonal, e toxicidade ao sistema reprodutor masculino (KUMAR et al., 2010). Assim, tem havido uma pressão crescente para minimizar a utilização de fungicidas sintéticos devido aos efeitos nocivos para a saúde humana e para o ambiente.

Estratégias alternativas estão sendo testadas para substituir fungicidas convencionais (BALLESTER et al., 2011). Uma alternativa para o controle das fitopatologias causadas por fungos é o uso de extratos de plantas, devido ao fato de serem constituídos de substâncias químicas bioativas capazes de prevenir a resistência dos patógenos (SILVA et al., 2012), além de possuírem uma fácil biodegradação e serem menos tóxico para o ambiente e para saúde humana que os produtos sintéticos (ILONDU, 2011).

Os extratos podem ser provenientes de espécies vegetais que possuam substâncias bioativas em sua composição, muitas vezes com potencial ação inseticida, fungicida, acaricida, antibacteriana e atividades citotóxicas (TEPE et al., 2004). Um exemplo é o gênero *Plectranthus* (Lamiaceae) que compreende cerca de 300 espécies de ervas e arbustos nativos das regiões tropicais, sendo os usos medicinais mais conhecidos por trazer benefícios a saúde humana como ação antibacteriana, antiviral, anti-malária e antifúngica (LUKHOBBA et al., 2006).

Posto isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de inibição *in vitro* promovida por frações dos extratos de diferentes partes de *Plectranthus barbatus* coletada em diferentes períodos do ano em relação ao crescimento dos fungos *Colletotrichum musae* isolados de bananas prata infectadas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas e flores foram coletadas dos meses de novembro de 2011 à julho de 2012 em uma área de cultivo orgânico da Escola Nova Esperança, no município de São Mateus – ES (Latitude: 18° 42' 58" S; Longitude: 39° 51' 32" W; Altitude: 36m), que possui clima Aw, de acordo com a proposta por Köppen (PEREIRA et al., 2002).

As partes da planta foram coletadas ao amanhecer e logo após cada amostra foi lavada com água corrente, seca em estufa com temperatura aproximada de 40°C por sete dias e posteriormente triturada com o auxílio de um moinho de facas (Marconi® - Modelo 340). O pó obtido de cada amostra foi armazenado em saco plástico sobre refrigeração e ao abrigo de luz. Foram utilizados reagentes de grau analítico (Merck): etanol e hexano.

O preparo das soluções e limpeza das vidrarias foi realizado com água filtrada por meio de osmose reversa (Permuton®). A extração etanólica foi realizada pela técnica de maceração, em que 50g da amostra pulverizada foi adicionada a 200mL de etanol PA. Após sete dias de maceração, o extrato obtido foi filtrado a vácuo, obtendo-se assim o extrato bruto da planta. Para maior concentração do extrato, o solvente foi eliminado com evaporador rotativo, em temperatura inferior a 40°C.

O extrato concentrado foi redissolvido em 5mL de etanol para aplicação em placas cromatográficas, pela técnica de cromatografia de Camada Delgada conforme descritos por JAMAL & SILVEIRA (2002). Para obtenção das frações dos diferentes extratos, com auxílio de uma pipeta graduada de 1 mL, foram feitos depósitos de gotas dos extratos concentrados na extremidade da placa revestida por camada de sílica (Sílica gel 60G Merck) ativada a 110°C. Após o período de corrida baseado na diferença de polaridade entre os componentes do extrato e o hexano, as diferentes bandas formadas na placa cromatográfica foram identificadas, separadas da sílica e secas. Amostras do fungo *Colletotrichum musae* utilizadas foram provenientes de frutos de banana doentes obtidos de lavouras do município de São Mateus – E.S., sendo estas mantidas em tubos de ensaio. O isolado do fungo foi ativado cinco dias antes da montagem do experimento. Foram utilizados discos de micélio obtidos da extremidade da placas. Cada fração obtida foi diluída em 150µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente adicionada em Erlemeyer contendo 30mL de BDA (Batata – Dextrose – Ágar) fundente e vertido em três placas de Petri de 9cm diâmetro estéreis.

Após solidificação do meio, foi inserido um disco de 5mm de diâmetro de micélio posicionado no centro de cada placa. A avaliação foi realizada no quinto dia, na qual o crescimento radial do fungo foi obtido, sendo medido o diâmetro da colônia formada em dois sentidos ortogonais. Foram realizados os ensaios de bio-atividade em todas as amostras, sendo estas divididas em três frações, conforme a polaridade, a fração um é a mais apolar e a fração três é a mais polar.

Com isso foram utilizados 43 tratamentos (42 frações e 1 testemunha) em triplicata. Os dados foram convertidos para porcentagem, sendo analisados estatisticamente e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott (p=0,05) por meio do programa R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve pouca variação na atividade dos extratos tanto em relação a parte da planta, folha ou flor, quanto aos meses em que foram realizada a coleta do material vegetal (novembro, dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho e julho).

Entretanto, os melhores resultados foram obtidos principalmente das frações 3 e 2, sendo que a fração 1 é a mais apolar e a 3 é a fase estacionária, mais polar (Tabela 1).

TABELA 1. Porcentagem de inibição do crescimento radial das colônias de *C. musae* por adição das frações dos extratos de *Plectranthus barbatus* ao meio de cultura.

Tratamento	Porcentagem de Inibição
F2 Flor de Fevereiro	59,8a
F3 Flor de Fevereiro	58,7a
F3 Flor de Março	58,4a
F3 Folha de dezembro	57,7a
F3 Flor de Novembro	56,2a
F2 Flor de Novembro	55,6a
F2 Flor de Março	53,8a
F3 Folha de Fevereiro	53,1a
F3 Flor de Dezembro	52,7a
F2 Folha de Maio	51,2a
F2 Folha de Fevereiro	50,9a
F1 Folha de Julho	50,4a
F2 Folha de Julho	47,7a
F3 Folha de Julho	47,2a
F3 Folha de Novembro	44,9b
F2 Folha de Janeiro	42,2b
F2 Folha de Março	40,7b
F3 Folha de Janeiro	38,1b
F2 Folha de Abril	37,8b
F2 Flor de Julho	35,0b
F3 Flor de Julho	34,3b
F1 Folha de Março	33,2b
F1 Folha de Janeiro	32,5b
F3 Folha de Junho	32,0b

F1: fração 1, F2: fração 2 e F3: fração 3. Segundo teste de Scott-Knott ($p=0,05$).

Os melhores resultados foram observados principalmente na fração 3, que indica um comportamento bastante polar do princípio ativo, no entanto, a inibição mais significativa ocorreu na fração 2 (Tabela 1). Considerando os resultados com mais de 50% de inibição, como se pode observar na Figura 1, os mesmos foram obtidos normalmente de flor em concordância com estudos publicados por PERES et al. (2009).

FIGURA 1. Porcentagem de inibição de crescimento radial de colônias de *C. musae*, expostas a diferentes frações de extratos de mil-folhas

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais é relacionada aos metabolismos secundários, assim são passíveis de sofrer influência do ambiente (PEREIRA & CARDOSO, 2012). Desta forma é possível observar que não houve diferença significativa nos 13 extratos com maiores porcentagens de inibição e estes não tiveram uma constância de resultados.

O uso deste extrato é promissor, pois foram testadas frações dos extratos brutos, com concentração de aproximadamente 10 ppm no meio de cultura, sendo obtida inibição máxima de quase 60% do crescimento do fungo. Tendo como parâmetros os produtos químicos do mercado atuam em concentrações de 1000 ppm, tem-se a expectativa é a obtenção maior volume de extrato nas frações polares possuirá satisfatório controle do patógeno.

CONCLUSÃO

O extrato de folhas e flores de boldo inibe o crescimento do fungo de pós-colheita da banana *Colletotrichum musae* e dos extratos utilizados. O extrato que teve maior potencial de inibição foi o proveniente da fração 2, com polaridade média, do extrato de flor de boldo coletado no mês de fevereiro.

REFERÊNCIAS

BALLESTER, A.R.; LAFUENTE, M.T.; FORMENT, J.; GADEA, J.; DE VOS, R.C.; BOVY, A.G.; GONZÁLEZCANDELAS, L. Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance. **Molecular Plant Pathology** v. 12, p. 879–897, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1364-3703.2011.00721.x>>.

DE BELLAIRE, L.L.; CHILIN-CHARLES, Y. A laboratory method to evaluate the sensitivity of *Colletotrichum musae* to postharvest fungicides. **Fruits** v. 63, p. 263-266, 2008. Disponível em: <<http://www.fruits->

journal.org/articles/fruits/abs/2008/04/i8409/i8409.html>.
<http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2008021>

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. OCDE-FAO PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS 2015-2024. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto de 2016.

FRANCIS, F.J. Quality as influenced by color. **Food Quality and Preference**, v.6, p. 149–155, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0950-3293\(94\)00026-R](http://dx.doi.org/10.1016/0950-3293(94)00026-R)>.
[http://dx.doi.org/10.1016/0950-3293\(94\)00026-R](http://dx.doi.org/10.1016/0950-3293(94)00026-R)

IHAKA, R. & GENTLEMAN, R. R: **A language for data analysis and graphics** . **Journal of Computational and Graphical Statistics**, 5(3):299–314, 1996. 5.

JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. **Caderno didático Aula +** (Química Orgânica Experimental). 1. ed. Governador Valadares: Editora UNIVALE, 2002. v. 01. 144p

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539–543, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.028>>.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.028>

LICHTENBERG, L.A.; LICHTENBERG, P.S.F. Advances on the brazilian banana crop. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 29-36, out. 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000500005&lng=pt&nrm=iso>.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000500005>

ILONDU, E.M. Evaluation of some aqueous plant extracts used in the control of pawpaw fruit (*Carica papaya* L.) rot.fungi. **Journal of Applied Biosciences** v. 37, p. 2419-2424, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4314/job/v37.2419-2424>>.
<http://dx.doi.org/10.4314/job/v37.2419-2424>

LUKHOB, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. Plectranthus: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology** v. 103, p. 1–24, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>>.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>

NEGREIROS, R.J.Z.; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, O.L.; CECON, P.L.; SIQUEIRA, D.L. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35(1), 51-58, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000100007>>.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000100007>

MIRSHEKARI, A.; DING, P.; KADIR, J.; GHAZALI, H.M. Effect of hot water dip treatment on postharvest anthracnose of banana var. Berangan. **African Journal of**

Agricultural Research, v.7, p. 6-10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.056>>. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.056>
PEREIRA, A. R.; ANGELOCCI, L. R.; SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia: Fundamentos e Aplicações Práticas. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2002. 478p.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.D.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.

PERES, R. L.; MORAES, S. C. S.; CARVALHO, C. A.; NASCIMENTO, P.C.; CARVALHO, L. M.; SILVA, M. B.; RAMPELOTTO, P. H.; ROSA, M. B. *Achillea millefolium* – Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 81-93, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/ref.v6i3.7654>>. <http://dx.doi.org/10.5216/ref.v6i3.7654>

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J.O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p. 80 – 86, 2012.

TEPE, B.; DONMEZ, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; VARDAR-UNLU, G. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chem.** v. 84, p. 519-525, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00267-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00267-X)>. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00267-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00267-X)

THUWAPANICHAYANAN, R.; PRACHAYAWARAKORN, S.; KUNWISAWA, J.; SOPONRONNARIT, S. Determination of effective moisture diffusivity and assessment of quality attributes of banana slices during drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1502-1510, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.003>>. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.003>