

## **Extrato de *Pimenta dioica* no controle *in vitro* de *Aspergillus niger*, patógeno da cultura do sisal**

<sup>1</sup>Tamara Thays Barbosa Leal, <sup>2</sup>Francisco Éder Rodrigues de Oliveira, <sup>3</sup>Vanuze Costa de Oliveira, <sup>2</sup>Sergio David Parra Gonzalez, <sup>2</sup>Rafael Mota da Silva, <sup>2</sup>Ademilde Silva dos Reis, <sup>2</sup>Francieli da Silva

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: tamarathays02@hotmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: ederigt@yahoo.com.br, sedapa@hotmail.com, rafamotaprego@hotmail.com, ademildereis@gmail.com, francieli.silva@gmail.com.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001, Kennedy, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: vanuze.costa@gmail.com.

**Resumo:** O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.) é uma planta de grande importância econômica na região Nordeste do Brasil. No entanto, a podridão vermelha do tronco, tem sido o principal problema fitossanitário desta cultura, causando danos econômicos consideráveis. Este estudo objetivou avaliar o efeito do extrato de Pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* L.) no controle de *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.), fungo causador da podridão vermelha. Nos testes *in vitro* foram utilizados 500 g de folhas de *P. dioica* em 1 L de água destilada no preparo do extrato aquoso e adicionou-se 10%, 25% e 50% ao meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a temperatura de 28 °C ± 2 °C, posteriormente foi avaliado o crescimento micelial e a esporulação de *A. niger*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições. Os resultados obtidos no crescimento micelial do *A. niger*, quando aplicados nas concentrações de 10%, 25% e 50% de extrato aquoso de *P. dioica*, apresentaram inibições de 5,55%, 73,33% e 100% respectivamente. O extrato aquoso de *P. dioica* mostrou-se eficiente no controle *in vitro* do fungo *A. niger*.

**Palavras chave:** *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Controle biológico, Podridão vermelha.

### **Extract *Pimenta dioica* in vitro in control of *Aspergillus niger*, pathogen culture of sisal**

**Abstract:** The sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.) is a plant of great economic importance in the Northeastern region of Brazil. However, red rot has been the main phytosanitary problem of this crop, causing considerable economic damage. This study aimed to evaluate the effect of the extract allspice (*Pimenta dioica* L.) in control of *Aspergillus niger* var. *niger* (van Tiegh.), fungus causing red rot. In *in vitro* tests 500 g of leaves of *P. dioica* in 1 L of distilled water to prepare the aqueous extract was added and 10%, 25% and 50% to PDA medium were used. The plates at 28 °C ± 2 °C were incubated subsequently evaluated the mycelial growth and sporulation of *A. niger*. The experimental design was completely randomized with ten repetitions. The results obtained in *A. niger* mycelial growth when applied at concentrations of 10%, 25% and 50% aqueous extract of *P. dioica* showed inhibitions 5.55%, 73.33% and 100%, respectively. The aqueous extract of *P. dioica* showed efficient in the *in vitro* control of the fungus *A. niger*, etiologic agent of red rot sisal.

**Key words:** *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Alternative control, Ped rotten.

## Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex. Engelm.) é uma cultura de grande importância no semiárido dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, sendo estes, os maiores produtores de sisal do País; a atividade nestes estados gera em torno de meio milhão de empregos (Coutinho et al., 2006a).

Na Bahia, cerca de 75 municípios são responsáveis por 95% da produção nacional de fibra do sisal. A área cultivada com sisal no Estado ocupa em torno de 190 mil hectares, sendo principalmente, cultivadas em pequenas áreas com até 15 hectares, onde a mão de obra familiar predomina (Santos et al., 2010).

A cultura do sisal é rústica, de alta tolerância ao estresse hídrico, ela pode ser afetada por doenças capazes de causar danos econômicos consideráveis (Cunha & Martins, 2012). No Brasil, a principal doença fitossanitária enfrentada pelos produtores de sisal é a podridão vermelha do tronco (Coutinho et al., 2006b). Esta doença é causada pelo fungo *Aspergillus niger* var. *niger* (Tiegh.), que afeta as folhas das plantas tornando-as impróprias ao desfibramento. Assim, com a progressão da doença a planta pode chegar a senescência. Na planta o *A. niger* causa escurecimento dos tecidos internos do tronco. As áreas colonizadas variam da coloração cinza escuro ao rosa pálido e se estendem da base das folhas à base do tronco. Em plantas com estádios avançados da doença ocorrem murcha, as folhas se tornam amareladas e o tronco se torna completamente apodrecido (Santos et al., 2010).

Neste sentido, o método mais usual para controle de doenças é por meio do uso de produtos sintéticos (Brum et al., 2014). No entanto, há sérios problemas que estes produtos ocasionam, tanto ao meio ambiente quanto ao organismo humano e animal, demonstrando, assim, a necessidade de métodos seguros e menos prejudiciais e que possam contribuir com o desenvolvimento vegetal (Broglio et al., 2014). Diante disto, o uso de extratos vegetais vem sendo adotado e, tem sido comprovado seus efeitos positivos no controle de patógenos, pragas e doenças. Isso se deve, especialmente, à eficácia do seu princípio ativo que causa poucas perturbações ao meio ambiente.

Vários extratos já foram estudados para o controle de doenças e fungos, mostrando sua

eficiência no controle de micro-organismos causadores de grandes perdas na produção agrícola (Zanandrea et al., 2004, Itako et al., 2009, Brum et al., 2014 & Gama et al., 2015). Dentre os extratos vegetais podemos enfatizar o de alho (Santos et al., 2010, Souza & Soares, 2013), nim (Almeida et al., 2009) e o de pimenta (Ribeiro & Bedendo, 1999).

Entre as pimenteiras, podemos destacar a Pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* L.), pertencente à família *Myrtaceae*, que tem características bem marcantes, como folhas alongadas, aroma e exsudado por quase toda a planta. Para alguns pesquisadores (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016), a principal finalidade relacionada à esta espécie vegetal é o uso das folhas para tratamentos capilares problemas respiratórios, analgésico, dentre outros; Zabka et al. (2009) relacionaram estes benefícios à presença de compostos como o eugenol, metil eugenol e  $\beta$  cariofileno. Além disso, das folhas e frutos dessa pimenteira são obtidos extratos e óleos naturais (Oliveira et al., 2009), dos quais podem-se citar: os alcaloides, terpenóides e fenóis, conforme constataram Park et al. (2007).

A *P. dioica* é usada na medicina popular e contem diversos benefícios como; ação antipirética, anti-inflamatória, analgésica, repelente, fungicida e antioxidante (Bigliazzi, 2005). O extrato da Pimenta da Jamaica possui ação significativa na inibição de fitopatógenos com propriedades bacteriostáticas/ fungicidas (Brasil, 2010).

Devido a isso, a utilização de extratos vegetais no controle de pragas e doenças tornou-se objetivo de estudos em todo mundo (Santos et al., 2013; Machado et al., 2007). Assim sendo, há um aumento na diversidade das espécies estudadas que servem de matéria prima para obtenção destes extratos.

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito do extrato de Pimenta da Jamaica (*P. dioica*) no controle *in vitro* de *A. niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal (*A. sisalana*).

## Material e métodos

O experimento foi realizado no laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), campus Cruz das Almas, Bahia. Folhas de *Pimenta dioica* L. foram coletadas no município de Taperoá no Baixo Sul

da Bahia. Utilizaram-se sacos de papel para o armazenamento e transporte das folhas até a chegada ao laboratório. Após 24 horas da coleta, foram pesadas 500 g de folhas, adicionado 1 L de água destilada. As folhas foram trituradas em um liquidificador por cinco minutos. Posteriormente foi procedida a filtração do material em membrana de 0,45 mm. O extrato filtrado foi esterilizado por 10 minutos em luz UV e, em seguida adicionado ao meio de cultura BDA (Agar, Batata e Dextrose), ao atingir a temperatura de  $\pm 45$  °C. Em seguida o meio foi homogeneizado e distribuído em placas de Petri.

Foram utilizadas três concentrações do extrato: 10%, 25% e 50%, além do tratamento controle sem adição de extrato, acrescentando-se  $1 \text{ mL}^{-1}$  de Tormicina para evitar crescimento bacteriano. Passadas 24 horas da solidificação do meio, foi realizada a transferência de esporos de *A. niger*, com uma alça de platina flambada, para o centro da placa de Petri contendo BDA e extrato aquoso de *P. dioica*. Foi utilizada uma cultura de *A. niger* com sete dias de crescimento, à temperatura ambiente.

As placas foram incubadas à temperatura de  $28 \pm 2$  °C e o crescimento micelial foi avaliado com auxílio de uma régua milimetrada a cada 24 horas. O diâmetro da colônia foi medido, até que a colônia do tratamento controle atingisse as bordas da placa.

Para a avaliação da esporulação de *A. niger*, ao fim do experimento, foram adicionados às placas 20 mL de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada e as colônias foram raspadas com uma alça de Drigalsk. Em seguida, avaliou-se a concentração de esporos de *A. niger* dessa suspensão, em câmara de Neubauer e microscópio de luz CTR 5000 (Leica), sendo calculada a concentração de esporos no volume total de 20 mL da solução salina.

Para avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial em  $\text{cm dia}^{-1}$  (IVCM) utilizou-se a equação (1), proposta por Maguire (1962) e utilizado por Carvalho et al. (2011):

$$IVCM = \frac{\sum(D-Da)}{N}$$

Em que:

D = diâmetro atual da colônia (cm),

Da = diâmetro da colônia do dia anterior (cm),

N = número de dias após a inoculação

Os dados foram submetidos à análise de

variância pelo teste *F* e regressão utilizando-se o Software SAS 9.0 (Statistical, 2002).

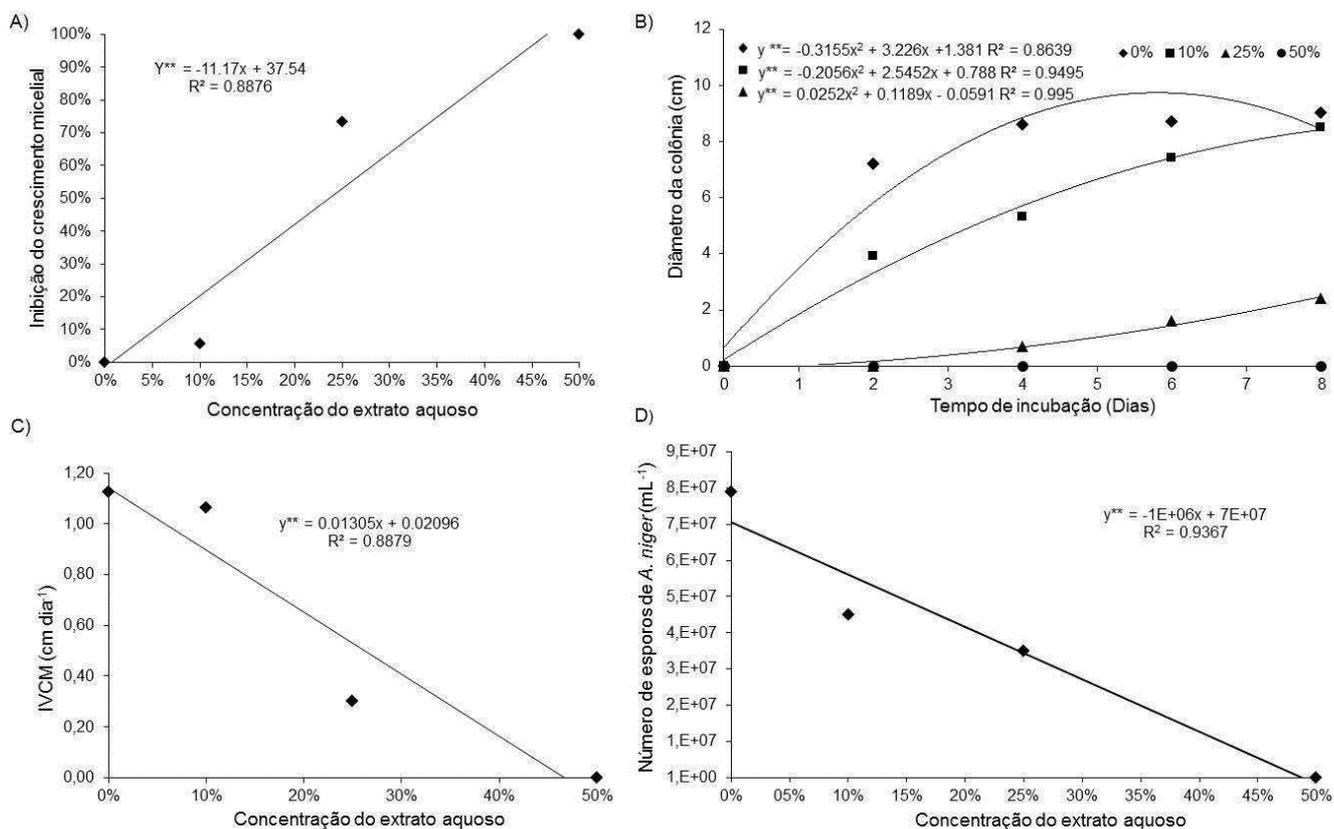
## Resultados e discussão

Quando utilizadas baixas concentrações do extrato de *P. dioica*, não foi observado potencial inibitório no crescimento micelial do *A. niger*. As concentrações de 10% e 25% apresentaram inibições no crescimento micelial de 5,55% e 73,33%, respectivamente, em meio de cultura BDA. A concentração de 50% inibiu 100% o desenvolvimento do fungo (Figura 1a). As concentrações estudadas 0%, 10% e 25% apresentaram os diâmetros finais de 9,0; 8,77 e 1,98 cm respectivamente, enquanto que no tratamento com 50% do extrato, não houve crescimento do *A. niger* (Figura 2).

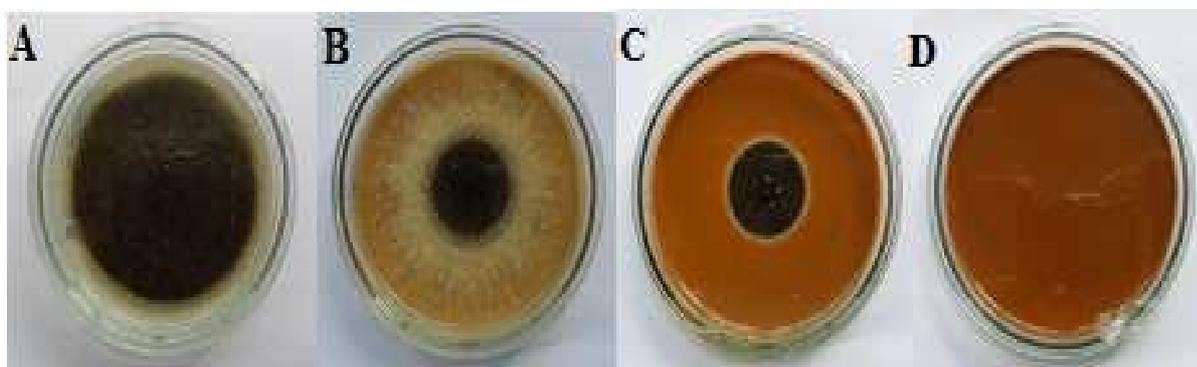
O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) nas concentrações estudadas constituiu-se de  $1,12 \text{ cm dia}^{-1}$  para o tratamento controle. Ao se utilizar a concentração de 10% de extrato aquoso de folhas de *P. dioica*, apresentou IVCM de  $1,06 \text{ cm dia}^{-1}$ . Os melhores resultados foram alcançados nos tratamentos com 25% e 50% de extrato que apresentaram respectivamente de 0,3 e 0,0  $\text{cm dia}^{-1}$  para o IVCM do *A. niger* (Figura 1b). Ao trabalhar com extratos vegetais no controle de fitopatógenos em plantas de tomate, Itako et al. (2009) comprovaram efeito significativo deste produto sobre o fungo *Cladosporium fulvum*. Embora sejam cultura e fitopatógeno diferentes dos estudados nesta pesquisa, pode-se comprovar que os extratos vegetais exercem efeitos favoráveis no controle de patógenos nas plantas que possuem grande importância econômica para o Brasil e para o mundo.

Em condições *in vitro*, o extrato aquoso de folhas *P. dioica* proporcionou a inibição da esporulação e diminuição no diâmetro da colônia de *A. niger* (Figura 1c). Ao realizarem trabalhos com bactérias, Bara e Vanetti (1998) mostraram a eficiência do extrato alcoólico, utilizando o método de difusão em ágar, feitos a partir de frutos de *P. dioica*, na inibição de *Yersinia enterocolitica* (Schleifstein & Coleman, 1939), com halo de inibição de 3,5 mm.

**Figura 1** - A) Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* em meio de cultura BDA com extrato aquoso de folhas de *Pimenta dioica*; B) Índice de velocidade de crescimento micelial de *Aspergillus niger* em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de *Pimenta dioica* com 10 dias de incubação; C) Diâmetro do micélio de *Aspergillus niger* em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de *Pimenta dioica* com 10 dias de incubação; D) Produção de esporos por *Aspergillus niger* em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de *Pimenta dioica* após dez dias de incubação.



**Figura 2** - Crescimento micelial e esporulação por *Aspergillus niger* em placas de Petri em meio de cultura BDA com extrato aquoso de folhas de *Pimenta dioica* em diferentes concentrações: A) controle(-) BDA sem extrato; B) 10%; C) 25% e D) 50%.



Utilizando extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.), Souza & Soares (2013) verificaram que a concentração maior que 5% desse extrato em meio BDA, inibiu 100% no crescimento micelial do *A. niger*. Também utilizando extrato de alho, na concentração de 50.000 mg L<sup>-1</sup>, Santos et al. (2010), verificaram que o extrato proporcionou o diâmetro de 1,6 cm na colônia do *A. niger* em meio BDA. Mostrando, assim, que apesar da inibição, ainda houve o crescimento da colônia, enquanto que na concentração de 50% de extrato de folhas de *P. dioica*, não houve crescimento.

Resultados do efeito antifúngico desta planta também foram encontrados por Zabka et al. (2009). Os autores relacionaram esse efeito à abundância dos compostos químicos, como o eugenol. Os autores ainda relataram que os resultados significativos podem ser comparados à eficiência dos antifúngicos sintéticos; porém, com a vantagem do uso da *P. dioica* ser menos agressivo ao ambiente e aos seres humanos e animais.

Na avaliação do número de esporos em meio BDA com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas *P. dioica*, foi observado que houve diferença entre os tratamentos testados (Figura 1d). O tratamento controle apresentou um número de esporos superior aos tratamentos com adição de 10%, 25% e 50% (Figura 1d). Gama et al. (2015) trabalhando com produtos de origem vegetal, constataram a eficiência de produtos homeopáticos no crescimento micelial e esporulação do *A. niger*. Os autores afirmaram que o uso destes produtos pode ser uma boa estratégia para reduzir o emprego de produtos sintéticos, contribuindo, para uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente.

A inibição visualizada no crescimento do *A. niger* na presença do extrato de *P. dioica* (Figura 1c) pode ser explicada pela presença em quantidade de eugenol (4-alil-2-metoxifenol). As folhas da *P. dioica* contêm 2% a 3% de óleo essencial, sendo que o eugenol aparece em uma percentagem de 64% a 77% (Minott, Brown, 2007 & Zabka et al., 2009). Segundo Roobbers et al. (1997) o eugenol dispõe de um amplo espectro de ação contra fungos, bactérias e leveduras. O que possivelmente ocasionou a inibição no crescimento do fungo causador da podridão vermelha no sisal. O trabalho desenvolvido por Delespaul et al. (2000) evidenciou que eugenol apresenta atividade antifúngica e o teste *in vitro*

no mesmo estudo revelou a ação do eugenol contra *A. niger*.

Entretanto, é importante destacar que estes trabalhos com extratos vegetais foram realizados em laboratório, o que implica que estas pesquisas devem ser realizadas em casa de vegetação e em condições de campo para que a eficiência seja comprovada.

## Conclusão

O extrato aquoso de *P. dioica* nas concentrações de 25% e 50% mostraram-se eficientes na inibição do crescimento micelial do *A. niger*, sendo que a concentração de 50% inibiu totalmente a esporulação do patógeno.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES] e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia [FAPESB] pela concessão das bolsas de estudo e apoio financeiro.

## Referências

- Almeida, T. F., Camargo, M., & Panizzi, R. C. (2009). Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. *Summa Phytopathologica*, 35 (3), 196-201.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. (2016). Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 103, 89-94.
- Bara, M. T. F., & Vanetti, M. C. D. (1998). Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 7/8 (1), 22-34.
- Bigliuzzi Jr., D. (2005). *Pimenta dioica* L. (Revisão Bibliográfica, 9p). Canavieiras: Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa, Associação Argentina de Fitomedicina.
- Brasil (2010). Agentes antimicrobianos químicos e naturais. *Food Ingredients Brasil*, 15, 36-42.

- Recuperado em 19 julho, 2013, de <http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>.
- Broglio, S. M. F., Lopes, D. O. P., Santos, D. S., Dias-Pini, N. S., Girón-Pérez, K., & Micheletti, L. B. (2014). Evaluación del control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vivo con *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata*. *Magistra*, 26 (4), 543-546.
- Brum, R. B. C. S., Castro, H. G., Cardon, C. H., Pereira, A. S., Cardoso, D. P., & Santos, G. R. (2014). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. *Magistra*, 26 (3), 365-375.
- Carvalho, R. R. C., Warwick, D. R. N., Souza, P. E., & Carvalho Filho, J. L. S. (2011). Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. *Scientia Plena*, 7 (9), 1-5.
- Coutinho, W. M., Luz, C. M., Suassuna, N. D., Silva, O. R. R. F., & Suinaga, F. A. (2006a) *A podridão do tronco do sisal* (Comunicado Técnico, n. 281, 4p). Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Coutinho, W. M., Suassuna, N. D., Luz, C. M., Suinaga, F. A., & Silva, O.R.R.F. (2006b) Bole roto of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31 (6), 605-605.
- Cunha Neto, I. L., & Martins, F. M. (2012). Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine Exen-Gelm (Agavaceae). *Revista Caatinga*, 25 (2), 72-78.
- Delespaul, Q., Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C., & Bessière, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (2), 256-266.
- Gama, E. V. S., Silva, F., Santos, I., Malheiro, R., Soares, A. C. F., Pereira, J. A., & Armond, C. (2015). Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 649-656.
- Itako, A. T., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Tolentino Jr. J. B., & Cruz, M. E. S. (2009). Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, 76 (1), 75 - 83.
- Machado, L. A., Silva, & V. B., Oliveira, M. M. (2007). Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. *Biológico*, 69 (2), 103-106.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*, 2 (2), 176-177.
- Minott, D. A., & Brown, H. A. (2007). Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. trees based on composition of leaf volatiles. *Journal of Essential Oil Research*, 19 (4), 354-357.
- Oliveira, R. A., Reis, T. V., Sacramento, C. K., Duarte, L. P., & Oliveira, F. F. (2009). Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (3), 771-775.
- Park, I. K., Kim, J., Lee, S. G., & Shin, S. C. (2007). Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Nematology*, 39 (3), 275-279.
- Ribeiro, L. F., & Bedendo, I. P. (1999). Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agricola*, 56 (4), 1267-1271.
- Roobbers, J. E., Speedie, M. K., & Tyler, V. E. (1997). *Farmacognosia e farmacobiotechnologia* (372p). São Paulo: Premier.
- Santos, M. B., Santos, C. Y., Almeida, M. A., Santos, C. R. S., Sant'anna, H. L. S., Santos, O. S. N., Silva, F., & Martins, G. N. (2010). Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12 (1), 13-17.
- Santos, P. L., Prando, M. B., Morando, R., Pereira, G. V. N., & Kronka, A. Z. (2013). Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. *Enciclopédia Biosfera*, 9 (17), 2562-2576.

Schleifstein, J., & Coleman, M. B. (1939). An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *Journal of medicine*, New York State, 39, 1749 - 1753.

Souza, L. S. S., & Soares, A. C. F. (2013). Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. *Tecno-lógica*, 17 (2), 124-128.

Statistical, A. S. (2002). *User's guide* (Version 9.0. Cary) [Software]. NC: SAS Institute Inc.

Zabka, M., Pavela, R., & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 30, 250-253. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.04.002.

Zanandrea, I., Juliano D. S., Andréa, B. M., Juliane, L., & Veridiana, K. B. (2004). Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14, 1 (supl.), 14-16.

Recebido em: 31/05/2015

Aceito em: 29/12/2016