

## Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs

SCAPIN, C.R.\*; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.

Universidade Estadual de Maringá - UEM, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, CEP: 87020-900, Maringá-Brasil \*claudiascapin@hotmail.com

**RESUMO:** A helmintosporiose, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum*, é uma das principais doenças do milho-pipoca cultivado no Brasil. Devido às características da cultura, como porte da planta, extensão da área de plantio e rentabilidade econômica, o emprego de resistência genética e controle químico têm sido as principais formas de controle da doença. O emprego de agrotóxicos na agricultura tem levado riscos à saúde humana e freqüentes danos ao meio ambiente. Assim, na busca de métodos alternativos para o controle da helmintosporiose foi avaliado o efeito fungitóxico dos extratos vegetais das plantas *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Artemisia camphorata* (cânfora) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no crescimento micelial de *E. turcicum*, em dois meios de cultura (BDA - batata-dextrose-ágar; e LCH - lactose caseína hidrolisada). Os extratos de alecrim e cânfora foram os que apresentaram maior inibição do crescimento micelial nos dois meios de cultura, enquanto que os extratos de mil-folhas e capim limão estimularam o crescimento micelial em meio LCH.

**Palavras-chave:** helmintosporiose, cânfora, alecrim, mil-folhas, capim-limão

**ABSTRACT:** *In vitro* fungitoxicity of plant extracts on *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. Helminthosporiose is caused by the fungus *Exserohilum turcicum* and represents one of the main diseases in popcorn grown in Brazil. Due to its characteristics, such as plant size, planting area extension and economic profitability, the use of genetic resistance and chemical control has constituted the main procedure against such disease. The use of pesticides in agriculture has resulted in risks to the human health and frequent damages to the environment. Thus, the fungitoxic effect of plant extracts of *Achillea millefolium* (yarrow), *Cymbopogon citratus* (lemon grass), *Artemisia camphorata* (camphor) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) on the mycelial growth of *E. turcicum* was evaluated by using two culture media (PDA - potato dextrose agar, and LCH - lactose-casein hydrolysate) in order to set alternative methods for controlling helminthosporiose. Rosemary and camphor extracts led to higher mycelial growth inhibition in both culture media, whereas yarrow and lemon grass extracts stimulated mycelial growth in LCH medium.

**Key words:** helminthosporiose, camphor, rosemary, yarrow, lemon grass

### INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) destaca-se como uma das mais importantes economicamente e socialmente no mundo, sendo a segunda em termos de produção mundial (FAO, 2000). No Brasil, cerca de 12 milhões de hectares foram plantados na safra de 2004/2005, alcançando produtividade média de 3.700 Kg ha<sup>-1</sup>, sendo considerada baixa quando comparada com as obtidas nos Estados Unidos e China, respectivamente, média de 10.000 e 5.000 Kg ha<sup>-1</sup> (Mathioni, 2006). Dentre os fatores limitantes da produtividade da cultura do milho, estão as doenças,

sendo a helmintosporiose uma das principais (Pereira et al., 2005).

A helmintosporiose ou queima-das-folhas, causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs (sin. *Helminthosporium turcicum* Pass.), é doença de ocorrência generalizada nas regiões produtoras de milho do Brasil, constituindo-se em um dos principais problemas fitossanitários dessa cultura, podendo causar danos quantitativos e qualitativos em locais com alta umidade e temperaturas moderadas durante o ciclo de cultivo (Pinto, 2004). Além disso, a

helminthosporiose pode aumentar a suscetibilidade dos tecidos às podridões do colmo, causadas por *Diplodia* sp. e *Fusarium* sp. (Balmer & Pereira, 1987). Segundo Fernandes & Oliveira (1997), estes patógenos causam podridões somente em tecidos senescentes característicos de plantas de milho em final de ciclo ou estressadas.

O emprego de resistência genética e controle químico são as principais formas de manejo das doenças que ocorrem no milho, pois características como porte da planta, extensão da área de plantio e a rentabilidade econômica da cultura, somadas à ineficiência de outros métodos de controle, têm limitado a utilização de outros métodos de controle (Gianasi, 1996). O controle químico, além dos riscos à saúde humana e do impacto ambiental ocasionado, tem elevados custos com produtos e aplicações, sendo viável a maioria das vezes apenas em campos de produção de sementes (Gianasi, 1996).

Com isso esforços têm sido direcionados na busca de alternativas utilizando substâncias naturais com propriedades fungicidas no controle desta doença. Os compostos secundários presentes em plantas medicinais, pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, entre outras (Di Stasi, 1996). Muitos deles apresentam atividade antimicrobiana, como é o caso dos alcalóides, com origem biossintética a partir da via metabólica do ácido shiquímico (Bennett & Wallsgrove, 1994). Outros compostos podem ainda apresentar atividade antiinflamatória, analgésica, inseticida, colérica e colagoga (Correa Júnior et al., 1994).

A utilização de extrato bruto ou óleos essenciais com propriedades antimicrobianas é frequentemente empregado com sucesso no controle de agentes fitopatogênicos (Fiori et al., 2000; Balbi-Peña et al., 2006; Itako et al., 2008; Rozwalka et al., 2008). Estes trabalhos constataram efeitos fungitóxicos (fungicida/ fungistático) em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se extrato bruto ou óleos essenciais de curcuma (*Curcuma longa*), mil-folhas (*Achillea millefolium*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cânfora (*Artemisia camphorata*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora* H.), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) e calêndula (*Calendula officinalis*). Fiori et al. (2000) estudaram o efeito do extrato bruto de eucalipto, erva-de-são-joão (*Ageratum conyzoides*), capim-limão, e mil-folhas no crescimento micelial *in vitro* de *Didymella bryoniae* e verificaram que todos os extratos foram eficientes na inibição do crescimento micelial e que o extrato da erva-de-são-joão foi o mais efetivo, inibindo 95% do crescimento na concentração de 50%.

Desta forma verifica-se que o uso de outras plantas medicinais no controle de fitopatógenos apresenta futuro promissor. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar efeito de extratos vegetais das plantas medicinais *Achillea millefolium*; *Cymbopogon citratus*; *Artemisia camphorata* e *Rosmarinus officinalis* no crescimento micelial de *Exserohilum turcicum*, em dois meios de cultura (BDA e LCH).

## MATERIAL E MÉTODO

### Local de trabalho

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

### Obtenção do isolado

O isolado de *E. turcicum* foi obtido a partir de plantas naturalmente infectadas, em campo comercial da região Noroeste do Estado do Paraná. A partir de culturas puras, foram obtidas culturas monospóricas e estas mantidas em tubos de ensaio à temperatura de 5±2°C.

### Preparo dos extratos brutos de plantas medicinais e avaliação

Foram testadas quatro plantas medicinais *Achillea millefolium* L. (Família Asteraceae) (mil-folhas); *Cymbopogon citratus* DC. Stapf. (Família Poaceae) (capim limão); *Artemisia camphorata* Vill (Família Asteraceae) (cânfora) e *Rosmarinus officinalis* L. (Família Lamiaceae) (alecrim) obtidas do horto de plantas medicinais da Universidade Estadual de Maringá.

Folhas frescas e sadias das espécies selecionadas foram trituradas, separadamente, em caldo de batata por três minutos e os homogenatos resultantes filtrados em gaze e papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se o extrato bruto aquoso (EBA). Este foi incorporado ao meio BDA (200 g de batata; 20 g de dextrose; 17 g de ágar; 100 mL de água destilada) ou em meio LCH (37,5 g de lactose; 3,0 g de caseína hidrolizada; 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>; 17 g de ágar e 1000 mL de água; (micronutrientes, 723,5 mg de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9 H<sub>2</sub>O, 439,8 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 203,0 mg de MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O e 1000 mL de água) de maneira a se obter as concentrações de 1, 10, 20 e 40%, sendo em seguida esterilizados por autoclavagem (20 minutos a 121°C) e, posteriormente homogeneizados e distribuídos em placas de Petri.

Após a solidificação do meio, disco de 8,0 mm de diâmetro de micélio do isolado de *E. turcicum* com 10 dias de idade, cultivado em meio BDA, foi transferido para o centro das placas de Petri, e estas mantidas a 25±2°C na ausência de luz. No tratamento

controle (testemunha) foram utilizadas placas de Petri contendo BDA e LCH. A avaliação foi realizada através da mensuração do crescimento micelial, em sentidos diametralmente opostos, em dias alternados, iniciando 24 horas após a instalação do experimento até o momento em que as colônias fúngicas no tratamento controle cobriram 2/3 da superfície do meio de cultura. Para o cálculo do percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) em meio de cultivo utilizou-se a fórmula  $PIC = (\text{cresc. testemunha} - \text{cresc. tratamento/cresc. testemunha}) \times 100$ , de acordo com Bastos (1997).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 32 tratamentos e quatro repetições, em esquema fatorial  $2 \times 4 \times 4 + 2$ , cujos fatores foram dois meios de cultura (BDA e LCH), quatro EBAs (*A. millefolium*; *C. citratus*; *A. camphorata* e *R. officinalis*), quatro concentrações (1, 10, 20 e 40%) e duas testemunhas (sendo uma para cada meio).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Verificou-se que os extratos vegetais de *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia camphorata* e *Achillea millefolium* tiveram efeito fungitóxico sobre *E. turcicum*, inibindo o crescimento micelial para a maioria dos tratamentos.

Em meio BDA, a exceção do EBA de *C. citratus* à concentração de 1%, as demais concentrações e plantas utilizadas nos experimentos foram estatisticamente diferentes do tratamento testemunha, sendo observado o aumento do efeito inibitório com o aumento da concentração dos extratos (Tabela 1). A partir da concentração de 1%, os extratos *R. officinalis*, *A. camphorata* e *A. millefolium*, proporcionaram inibição do crescimento micelial de *E. turcicum* em 19, 14 e 12% respectivamente. Os maiores efeitos na inibição do fungo ocorreram na concentração de 40%,

proporcionando controle no crescimento micelial de 54, 58, 38 e 27%, para *R. officinalis*, *A. camphorata*, *A. millefolium* e *C. citratus* respectivamente (Tabela 1).

Fato diferente foi constatado por Itako et al. (2008), quando testando *in vitro* o efeito do EBA das plantas medicinais *A. millefolium*, *A. camphorata*, *C. citratus* e *R. officinalis* no crescimento micelial de *Alternaria solani*, também em meio BDA, verificaram que estes extratos não tiveram efeito sobre o crescimento micelial do fungo.

Para o meio LCH, o EBA de *R. officinalis* e *A. camphorata* em todas as concentrações foram estatisticamente diferentes do tratamento testemunha, sendo crescente a inibição do crescimento micelial com o aumento das concentrações do EBA de ambas as espécies, onde os maiores efeitos foram observados para a concentração de 40%, sendo 59 e 53%, respectivamente. Para a espécie *C. citratus*, a exceção da concentração do EBA 40%, que não diferiu estatisticamente da testemunha, as concentrações de 1, 10 e 20% o crescimento micelial foi maior, diferindo dos demais tratamentos. Para o EBA de *A. millefolium*, a concentração de 1% estimulou o crescimento micelial de *E. turcicum* (7,71 cm) em relação ao tratamento controle (6,26 cm), diferindo entre eles. Na concentração de 10 e 20% o crescimento micelial não diferiu do tratamento testemunha (6,36 e 6,10 cm, respectivamente), contudo o EBA 40% teve efeito inibitório (5,17 cm), diferindo estatisticamente do tratamento testemunha (Tabela 2).

Para todos os extratos vegetais nos dois meios utilizados, a relação entre concentração do extrato (1, 10, 20 e 40%) e o crescimento do fungo *E. turcicum* foram descritas por equações de regressões lineares, mostrando que com o aumento da concentração dos extratos o crescimento micelial foi menor. Contudo, para as espécies *A. millefolium* e *C. citratus* no meio LCH, o crescimento micelial foi maior que no tratamento testemunha para as concentrações de 1, 10 e 20% para *C. citratus* (Figura 1).

**TABELA 1.** Efeito *in vitro* dos extratos aquosos de *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Artemisia camphorata* (cânfora) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre o crescimento micelial de *Exserohilum turcicum*, utilizando meio de cultura BDA.

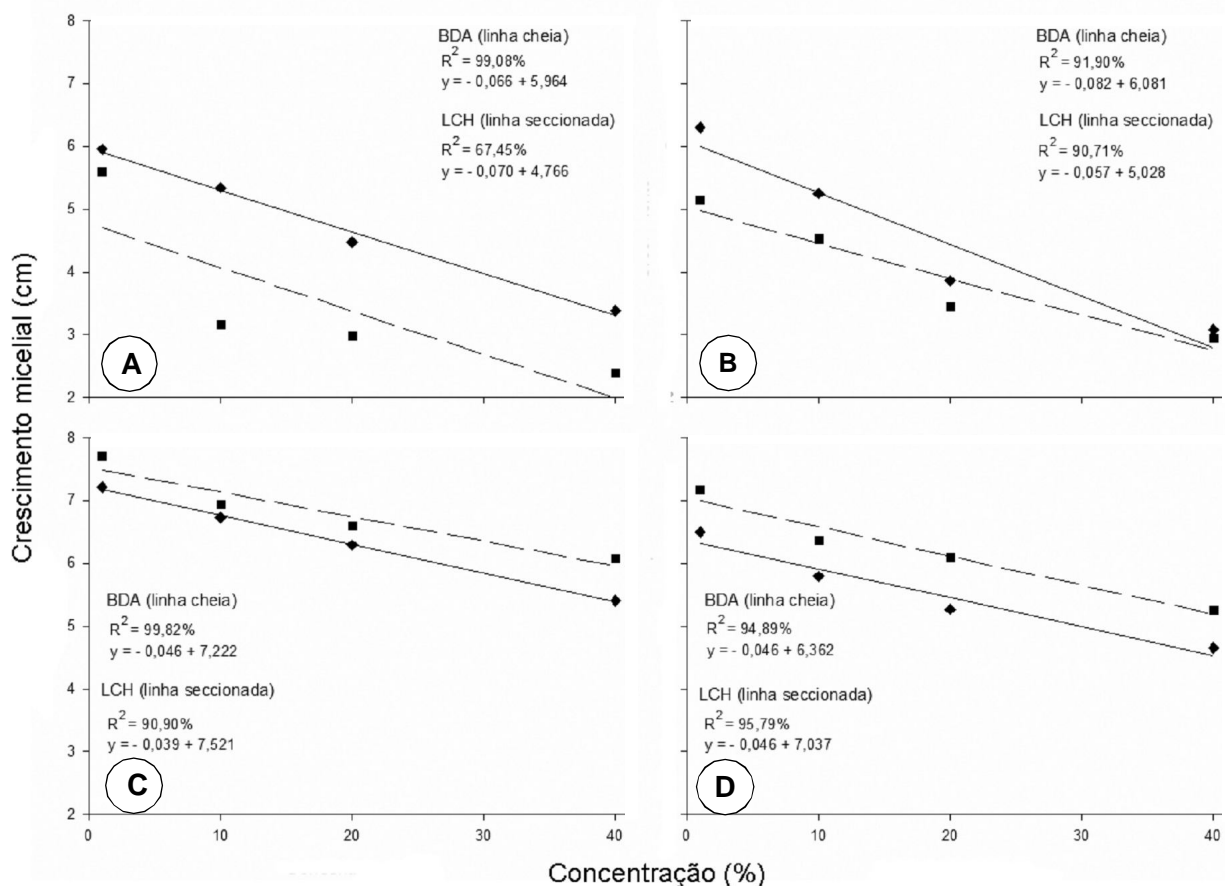
Tratamentos	BDA Test.	Controle (%)	1% (cm)	Controle (%)	10% (cm)	Controle (%)	20% (cm)	Controle (%)	40% (cm)	Controle (%)
Alecrim	7,36 e <sup>1</sup>	0	5,95 Ad	19	5,34 Ac	27	4,48 Bb	39	3,43 Ba	54
Cânfora	7,36 e	0	6,30 Bd	14	5,25 Ac	29	3,86 Ab	48	3,07 Aa	58
Mil-folhas	7,36 e	0	6,50 Bd	12	5,79 Bc	21	5,27 Cb	28	4,70 Ca	38
Capim-limão	7,36 d	0	7,21 Cd	3	6,73 Cc	9	6,29 Db	15	5,43 Da	27
BDA	-	-	7,36 C	0	7,36 D	0	7,36 E	0	7,36 E	0

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 2.** Efeito *in vitro* dos extratos aquosos das plantas medicinais *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Artemisia camphorata* (cânfora) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre o crescimento micelial de *Exserohilum turcicum*, utilizando meio de cultura LCH.

Tratamentos	LCH	Controle (%)	1% (cm)	Controle (%)	10% (cm)	Controle (%)	20% (cm)	Controle (%)	40% (cm)	Controle (%)
Alecrim	6,26 d <sup>1</sup>	0	5,60 Bc	11	3,16 Ab	45	2,98 Ab	47	2,33 Aa	59
Cânfora	6,26 e	0	5,15 Ad	18	4,53 Bc	28	3,44 Bb	45	2,98 Ba	53
Mil-folhas	6,26 b	0	7,16 Dc	-14	6,36 Cb	-2	6,10 Cb	3	5,17 Ca	16
Capim-limão	6,26 a	0	7,71 Ec	-21	6,93 Db	-11	6,60 Db	-5	6,05 Da	3
LCH	-	-	6,26 C	0	6,26 C	0	6,26 C	0	6,26 D	0

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 1.** Crescimento micelial (cm) de *Exserohilum turcicum* sob diferentes concentrações de extratos brutos aquosos de (A) *Rosmarinus officinalis* (B) *Artemisia camphorata* (C) *Cymbopogon citratus* e (D) *Achillea millefolium* em meio BDA e LCH.

Concordando com estes resultados, Franzener et al. (2003) verificaram que o extrato aquoso de *A. camphorata*, na concentração de 50%, inibiu 39% do crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana* e a esporulação foi totalmente inibida já na concentração de 10%. Fiori et al. (2000) verificaram que o extrato de *Eucalyptus citriodora* foi o mais

eficiente em inibir o crescimento micelial de *Didymella brioniae*, enquanto que os extratos de *A. millefolium* e *Ageratum conyzoides* foram responsáveis por 52 e 46% na inibição da germinação dos esporos do fungo, respectivamente.

Rodrigues et al. (2006) mostraram a eficiência dos extratos de *Zingiber officinale* e *Corymbia*

*citriodora* na redução do crescimento micelial de *Helminthosporium* sp. Pandey et al. (2002), avaliaram o efeito do EBA de diferentes espécies sobre *Helminthosporium sativum* e constataram a completa inibição do patógeno com o uso de extrato de *Mangifera indica*, enquanto que os extratos de *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Lawsonia inermis* e *Matricaria chamomila* inibiram 90%.

O conhecimento do efeito fungitóxico de compostos secundários presentes no extrato bruto em plantas medicinais pode constituir-se em mais uma forma de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas. Assim, com os resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que a utilização de extratos brutos aquosos de *Achillea millefolium*; *Cymbopogon citratus*; *Artemisia camphorata* e *Rosmarinus officinalis* constituem um agente potencial para o controle de *E. turcicum*.

## REFERÊNCIA

- BALBI-PEÑA, M.I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.3, p.310-4, 2006.
- BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. v.2, p.595-634.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.
- BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p.617-33, 1994.
- CORREA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.
- DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. p.109-27.
- FAO. **Production Yearbook**. Roma, 2000. 260p.
- FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1997. n.26, 78p.
- FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, n.7/8, p.483-8, 2000.
- FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.503-7, 2003.
- GIANASI, L.; CASTRO, H.A.; SILVA, H.P. Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, safra 93/94. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.214-7, 1996.
- ITAKO, A.T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.241-4, 2008.
- MATHIONI, S.M. **Agressividade de isolados de Cercospora zeae-maydis em genótipos de milho**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PANDEY, M.K. et al. Mycotoxic potential of some higher plants. **Plant Disease Research**, v.17, n.1, p.51-6, 2002.
- PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Piracicaba: Ceres, 2005. cap.55, v.2, p.477-88.
- PINTO, N.F.J.A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.134-8, 2004.
- RODRIGUES, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, p.123-7, 2006.
- ROZWALKA, C.L. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-7, 2008.
- SILVA, I. et al. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste, 1995. 203p.