

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO AGRICULTURA E AMBIENTE  
CURSO DE AGRONOMIA

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE**  
*Colletotrichum* spp. **AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE**  
**PÓS-COLHEITA EM PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum***  
*chinense* jacq.)

**Acadêmico: Maurício Franco dos Santos**

Humaitá-AM  
Junho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE  
CURSO DE AGRONOMIA

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE**  
*Colletotrichum* spp. **AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE**  
**PÓS-COLHEITA EM PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum***  
*chinense* jacq.)

**Acadêmico: Maurício Franco dos Santos**

**Orientador: Moises Santos De Souza**

**Coorientador: Alessandro Machado da Silva**

Trabalho apresentado como parte das exigências do curso de Agronomia para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Humaitá-AM  
Junho de 2017

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237e Santos, Maurício franco dos  
Efeito de extratos vegetais sobre *Colletotrichum* spp. Agente causal da antracnose pós-colheita em pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* jacq.) / Maurício franco dos Santos. 2017 29 f.: 31 cm.

Orientador: Moisés Santos De Souza  
Coorientador: Alessandro Machado da Silva  
TCC de Graduação (Agronomia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Controle alternativo. 2. doenças de plantas. 3. fitopatógenos. 4. Pimenta-de-cheiro. I. Souza, Moisés Santos De II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE  
CURSO DE AGRONOMIA

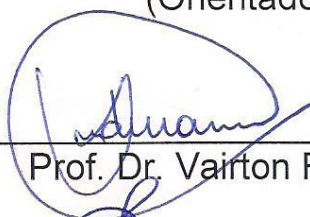
**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE  
*Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE  
PÓS-COLHEITA EM PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum  
chinense* jacq.)**

Acadêmico: Maurício Franco dos Santos  
Orientador: Prof. Me. Moisés Santos de Souza


Trabalho de conclusão de curso defendido e APROVADO  
em: 28/06/2017, com a banca examinadora composta pelos  
seguintes professores:



Prof. Me. Moisés Santos de Souza  
(Orientador)



Prof. Dr. Vairton Radmann



Prof. Me. Dalton Dias da Silva Júnior

Humaitá-AM  
Junho de 2017

## **DEDICO**

A minha mãe Antônia Franco dos Santos, a minha esposa Tereza Fernandes Nunes, ao meu filho Pedro Nunes dos Santos e aos meus irmãos e irmãs, que foram minhas fontes de força e inspiração durante todo o período da faculdade e para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida e por tudo o que tens me proporcionado. Agradeço a minha mãe Antônia Franco dos Santos pelo seu Amor e por ter sempre me apoiado e me ajudado. Agradeço a minha esposa Tereza Fernandes Nunes por estar ao meu lado me apoiando e me incentivando. Agradeço aos meus irmãos que me acompanharam durante toda a faculdade. Agradeço ao Professor Moises Santos de Souza e Alessandro Machado da Silva pela orientação e por tornar possível a realização deste trabalho. Agradeço a Universidade Federal do Amazonas. Agradeço a todos os professores do Instituto de Educação Agricultura e Ambiente e aos amigos que direto ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Teste de patogenicidade, (A) - Pimentas sem lesões, (B) - Pimentas sendo inoculadas com <i>Colletotrichum</i> spp., (C) - Pimentas com lesões de antracnose.....	8
Figura 2: Obtenção dos extratos aquosos (A) 20g de folha vegetal triturada em 300 ml de água; (B) agitação em agitador; (C) misturas nas provetas sob agitação ocasional; (D) extratos filtrados.....	9
Figura 3: Meio de cultura com os extratos, (A) BDA; (B) Pimenta Longa; (C) Embaúba;(D) Mandioca; (E) Nim; (F) Urtiga.....	10
Figura 4: Avaliação dos experimentos, (A) medição do raio da colônia em dois sentidos ortogonais; (B) Contagem de esporos em microscópio ótico.....	11
Figura 5: Índice de velocidade de crescimento micelial. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	12
Figura 6: Médias da esporulação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	13
Figura 7: Colônias de <i>Colletotrichum</i> spp. As letras representam os tratamentos e os números representam o verso e o reverso das colônias. A - testemunha, B - embaúba, C - urtiga, D - pimenta longa, E - mandioca, F - nim, 1 – reverso da colônia e 2 – verso da colônia. ....	15

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise de variância do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e da esporulação.....	12
---	----

## SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA. ....	2
2.1 Gênero <i>Capsicum</i> .....	2
2.2 Antracnose .....	3
2.3. Controle .....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Geral.....	6
3.2 Específicos .....	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	7
4.1. Obtenção dos isolados.....	7
4.2. Teste de Patogenicidade.....	8
4.3. Obtenção dos extratos .....	8
4.4. Preparação do meio de cultura.....	9
4.5. Avaliação do crescimento micelial.....	10
4.6. Avaliação da esporulação .....	11
4.7. Análise estatística.....	11
5. RESULTADOS.....	11
6. DISCUSSÕES.....	13
8. CONCLUSÃO .....	17
7. REFERÊNCIAS.....	18



## RESUMO

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente produzidas no Brasil abrangendo todas as regiões do país, com grande importância econômica e social, principalmente para pequenos e médios produtores. Contudo a grande incidência de doenças limita a produção, sendo a antracnose causada por fungos do gênero *Colletotrichum* a principal doença que afeta os frutos de pimenta. Para o controle desta doença várias medidas de controle são recomendadas, entre elas o uso de fungicidas sintéticos, entretanto, em razão dos problemas que estes produtos podem acarretar, extratos vegetais vêm sendo estudados como alternativa de controle. Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito de extratos aquoso de plantas no controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.) de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.). Os isolados de *Colletotrichum* spp., foram obtidos a partir de frutos de pimenta-de-cheiro com sintomas da doença, os extratos aquosos foram obtidos a partir de folhas secas e trituradas de nim (*Azadirachta indica*), pimenta longa (*Piper aduncum* L.), urtiga (*Urtica dioica*), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e embaúba (*Cecropia pachystachya*). Foram avaliados o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a esporulação dos fungos *Colletotrichum* spp. submetidos aos tratamentos com os extratos vegetais. Os extratos das plantas estudadas não inibiram o crescimento micelial nem a esporulação do fungo *Colletotrichum* spp., mas proporcionaram maior crescimento e esporulação quando comparado com a testemunha que continha somente BDA.

**Palavras chave: Controle alternativo, doenças de plantas, fitopatógenos.**

## 1. INTRODUÇÃO

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente produzidas no Brasil abrangendo todas as regiões do país, acompanhando os avanços das tecnologias de produção. O cultivo de pimentas e pimentões tem-se aumentado significativamente nos últimos anos, contudo a grande incidência de doenças limita a produção. Segundo Kimati *et al.* (2005), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), é uma das mais importantes doenças fúngicas, que em local de alta concentração de inóculo e em épocas chuvosas, a doença pode afetar 100 % dos frutos em pouco tempo.

Para o controle desta doença pode-se utilizar várias medidas, como o controle integrado, mais a aplicação de produtos químicos continua sendo o método mais utilizado (JOHNNY *et al.*, 2011). Contudo este método pode ocasionar alguns problemas, como o surgimento de fitopatógenos resistentes aos químicos utilizados (SILVA *et al.*, 2012), assim como contaminação dos ecossistemas, rios, lagos, solo e lençol freático e conseqüentemente, peixes, animais, etc, bem como riscos à saúde humana, principalmente pelo consumo de alimentos contaminados. De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2011 90 % (noventa por cento) dos pimentões apresentavam resíduo de algum tipo de agrotóxico acima do permitido, sendo que 84 % dos resíduos correspondia a agrotóxicos não autorizados para a cultura do pimentão, (ANVISA, 2013).

Extratos vegetais vêm sendo estudados como alternativa de controle. Araújo *et al.* (2014) encontrou resultados eficientes estudando extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão, assim como Marcondes *et al.* (2014) apresenta resultados positivos em relação a diminuição do desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme* em seu trabalho com o uso de extratos aquosos de plantas medicinais.

Estes resultados mostram que as plantas possuem substâncias fungitóxicas e podem ser utilizadas no controle de microrganismos fitopatogênicos. Este trabalho tem por objetivo avaliar o uso de extratos aquoso de plantas no controle da antracnose pós-colheita de pimenta-de-cheiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA.

### 2.1 Gênero *Capsicum*

O centro de origem do gênero *Capsicum* abrange toda a região tropical das américas, desde o México, América central e América do sul, variando o centro de diversidade de acordo com a espécie, (ALMEIDA, 2015). Muito antes da colonização das américas pelos europeus as pimentas do gênero *Capsicum* eram amplamente utilizadas pelas populações nativas das Américas. Segundo Barbieri e Stumpf, (2008) registros de sítios arqueológicos em Tehuacán, no México, mostram que as pimentas deste gênero eram cultivadas a cerca de nove mil anos. Sendo que a partir do século XVII durante as grandes navegações para a colonização do continente este gênero foi distribuído mundialmente, (SOUZA e ROSSI 2014)

O gênero *Capsicum* possui cerca de 30 espécies, nas quais 10 são silvestres e as outras 20 são classificadas de acordo com o nível de domesticação, em domesticadas ou semidomesticadas. De todas as espécies conhecida as *Capsicum baccatum*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens* são as mais cultivadas, sendo que o mercado atual é liderado pelas três ultimas, (SOUZA e ROSSI, 2014).

Segundo Costa *et al* (2008) a Amazônia é um importante centro de diversidade deste gênero principalmente as pimentas da espécie *Capsicum chinense* Jacq., sendo importante fornecedor de genes para os programas de melhoramento genético desta espécie. Barbosa *et al* (2002) encontrou 4 espécies do gênero *Capsicum* domesticadas no estado de Roraima, sendo as espécies, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. annuum* L. e *C. baccatum*, com uma grande diversidade de formas, cor e pungência, as quais 76,7% dos acessos encontrados eram de *Capsicum chinense* Jacq., isto mostra a importância desta espécie para a região.

Necessitando de altas temperaturas, (de 25 °C a 30 °C), esta espécie pode ser cultivada todo o ano em regiões tropicais, nas regiões de clima ameno no inverno, deve ser cultivada nos meses mais quentes do ano, com espaçamento de 1,2 m a 1,5 m entre linhas e 0,8 m a 1,0 m entre plantas (PINTO e MARTINS, 2011).

A espécie *Capsicum chinense*, assim como as outras espécies do gênero *Capsicum*, são importantes economicamente e socialmente, principalmente por ser cultivados na maioria das vezes em pequenas propriedades com o uso da mão de obra familiar, seus frutos além de ser utilizados como condimentos e especiarias, também são utilizados na medicina popular, como anestésica e anti-inflamatória, (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

As pimentas são comercializadas na forma *in natura*, conservas, páprica, pó de pimentão e pimenta doce madura vermelha (SIGNORINI, 2013). No Brasil são cultivados anualmente uma área de cerca de dois mil ha<sup>-1</sup>, sendo os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A produtividade média depende do tipo de pimenta cultivada, variando de 10 a 30 t.ha<sup>-1</sup>.ano (EMBRAPA, 2007).

## 2.2 Antracnose

O gênero *Colletotrichum* pertence a divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Sordariomycetidae e família Glomerellaceae (DAMM, 2009). Nas regiões tropicais e subtropicais a antracnose é causada por um complexo de espécies de *Colletotrichum*, é uma das doenças mais importantes, que afetam as plantas do gênero *Capsicum*, (PEREIRA, 2011). Os fungos deste gênero afetam praticamente todas as variedades comerciais de pimenta além de outras diversas culturas, como pimentão, manga e caju, também pode afetar diversas plantas daninhas, (GASPAROTTO *et al.*, 2014).

Segundo Sousa Junior *et al.* (2009) os *Colletotrichum* tem especificidade para determinados grupos de hospedeiros, apontando o complexo *C. gloeosporioides* como causador de antracnose em solanáceas. A espécie *C. acutatum* também é apontada por Tozze Jr. (2007) como sendo predominantemente a responsável pelo aparecimento da doença em *Capsicum*.

A antracnose causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* pode afetar todos frutos que se encontram em ambientes com alta concentração de inóculo e alta umidade, os fungos podem atacar toda a planta, mas somente nos frutos é que apresentam os sintomas típicos como depressão circular com diâmetro variado, podendo também aparecer massas de conídios de cor rosada, na

parte aérea da planta apresentam manchas necróticas circulares a alongadas (KIMATI *et al.*, 2005).

De acordo com Pinto e Martins, (2011) o fungo sobrevive na área de cultivo em restos da cultura, hospedeiros alternativos e sementes, e quando se encontra na presença da hospedeira, e ambiente favorável, temperatura elevada e alta umidade, o patógeno se desenvolve sendo disseminado através dos respingos da chuva, da irrigação, pelo vento e através de sementes contaminadas.

### **2.3. Controle**

O controle desta doença pode ser feito de diversas formas como através do uso de sementes saudáveis, rotação de cultura, aplicação de fungicida sintético ou não sintético, entre outros, (KIMATI *et al.*, 2005). Para um bom controle da antracnose em pimentas, o plantio deve ser feito em época seca ou em estufa, quando o ambiente está menos favorável à doença, fazer plantios menos adensado na época de chuva e calor, destruir restos culturais, fazer rotação de cultura, e quando necessário fazer pulverização com fungicidas registrados e manter os frutos em ambiente arejado quando armazenado, (PINTO & MARTINS, 2011).

Alguns ingredientes ativos registrados para o controle de antracnose em pimenta são, oxiclóreto de cobre e mancozebe (AGROFIT, 2017). Diversos trabalhos visam encontrar alternativas para substituir estes produtos. Lima *et al.* (2007) reduziu a severidade da antracnose em frutos de manga com tratamento hidrotérmico associado com ou sem embalagem e com ou sem refrigeração. Contudo a principal vertente de estudos nas universidades são os produtos naturais biológicos que vem apresentando resultados satisfatórios, como os apresentados nos trabalhos de Oliveira *et al.* (2016), Marcondes *et al.* (2014), Araújo *et al.* (2014), Almeida *et al.* (2009), que estudando os efeitos de extratos vegetais e óleos essenciais de diversas plantas obtiveram bons resultados no controle de *Colletotrichum* spp.

Além de estudos com extratos vegetais existem trabalhos avaliando o antagonismo entre diferentes microrganismos para o controle de doenças de plantas. Isaias *et al.* (2014), avaliando a ação antagônica e de metabólitos

bioativos de *Trichoderma* spp. (gênero muito usada no controle biológico) contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae* constatou que os metabólitos secundários do antagonista exercem efeito significativo sobre essas espécies patogênicas. Mello *et al.* (2006) constatou a eficiência de *Dicyma pulvinata* no biocontrole de *Microcyclus ulei* causador do mal da folha de seringueira.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito de extratos aquosos de nim, pimenta, urtiga, Mandioca e embaúba no controle *in vitro* da antracnose de pimenta-de-cheiro.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar o índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum* spp, sob tratamento com extrato aquoso de plantas;
- Avaliar a esporulação de *Colletotrichum* spp., sob tratamento com extrato aquoso de plantas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitossanidade, do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente da Universidade Federal do Amazonas.

### 4.1. Obtenção dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos a partir de frutos de pimenta-de-cheiro com sintomas da doença adquiridas em um supermercado da cidade de Humaitá-AM. Levados ao laboratório, os frutos foram lavados em água corrente e secos em papel toalha. Com um bisturi retirou-se fragmentos da zona limítrofe de transição entre a área da lesão e tecido sadio, em seguida foi feita a desinfestação superficial dos fragmentos submetendo-os à assepsia em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, em álcool 70% durante 30 segundos e três lavagens em água destilada esterilizada por tempos iguais de 30 segundos. Após o processo de desinfestação, foram depositados cinco fragmentos equidistantes em placas de Petri contendo meio de cultura AA (ágar e água), e mantidos a luz e temperatura do laboratório ( $\pm 26$  °C e fotoperíodo de 12 horas) até surgirem as primeiras hifas no meio de cultura as quais foram repicados para novas placas contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar).

Após o crescimento e esporulação das colônias foram feitos os procedimentos para obtenção de uma cultura monospórica, a metodologia foi adaptada de Maier *et al* (2003), no qual com o auxílio de uma alça de platina foi feito uma raspagem superficial na cultura e diluído em 10 mL de água destilada e esterilizada, sendo feito uma diluição em série transferindo 1 mL da suspensão para outro erlenmayer contendo 9 ml de água, até obter uma suspensão na concentração  $10^{-3}$ . Foi transferido uma gota de 100  $\mu$ L para placas de Petri contendo meio de cultura AA, em duplicatas. Após 48h os esporos germinados foram transferidos para placa contendo meio BDA e posteriormente conservados em tubos de ensaio com meio BDA inclinado (ALFENAS e MÁFIA, 2007) e em água destilada e esterilizada (CASTELLANI, 1939) até a montagem dos experimentos.



## 4.2. Teste de Patogenicidade

A cultura pura do isolado de pimenta foi submetido a teste de patogenicidade ao qual foi positivo para antracnose. Para a realização do teste foi utilizado pimentas-de-cheiros ainda verdes, as pimentas foram lavadas em água e hipoclorito para desinfestação superficial, as mesmas foram dispostas em uma caixa tipo gerbox sobre papel umedecido com água destilada e esterilizadas, sobre os frutos foi depositado uma gota de 20µL de suspensão de conídios a  $10^5$  esporos mL. As lesões característica da antracnose apareceram a partir do 4º dia da inoculação comprovando que o fungo isolado é o agente causador da doença nos frutos de Pimenta-de-cheiro em pós-colheita.

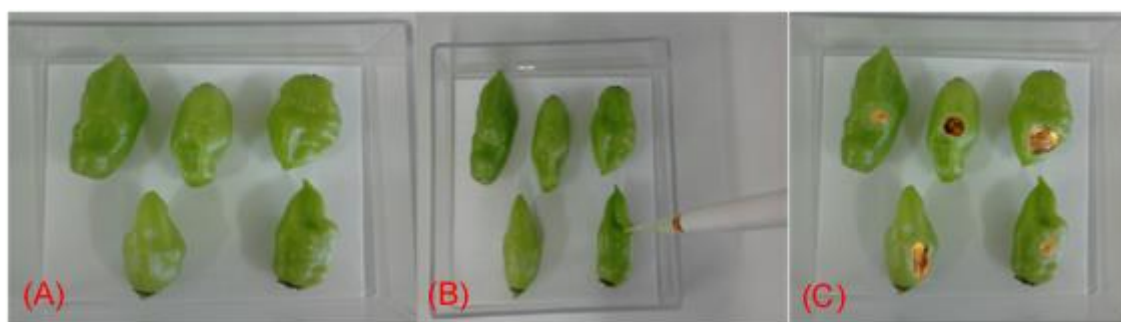


Figura 1: Teste de patogenicidade, (A) - Pimentas sem lesões, (B) - Pimentas sendo inoculadas com *Colletotrichum* spp., (C) - Pimentas com lesões de antracnose.

## 4.3. Obtenção dos extratos

Os extratos aquosos foram obtidos a partir de folhas secas e trituradas de nim, pimenta longa, urtiga, mandioca e embaúba, coletadas no município de Humaitá-AM. As plantas coletadas estavam livres de pragas e doenças sem ramos danificados por vento ou animais e apresentavam boas condições fisiológicas. Após a coleta as folhas foram lavadas em água corrente e desidratadas em estufa a 50 °C por 48 horas, e trituradas em liquidificador e mantidas em sacos plásticos para uso posterior.

O extrato foi obtido por maceração, segundo Navarro (2005). Em uma balança de precisão foi pesado 20 g de folha seca e triturada de cada espécie

vegetal acima citada e transferido para um erlenmayer de 500 mL, contendo 300 mL de água destilada e agitado por 10 minutos em um agitador. O conteúdo foi transferido para uma proveta de 1000 mL e completado com água destilada até 1000 mL, deixando em repouso por 72 horas com agitações ocasionais, decorrido este tempo os extratos foram filtrados em gaze dupla obtendo assim o extrato bruto.

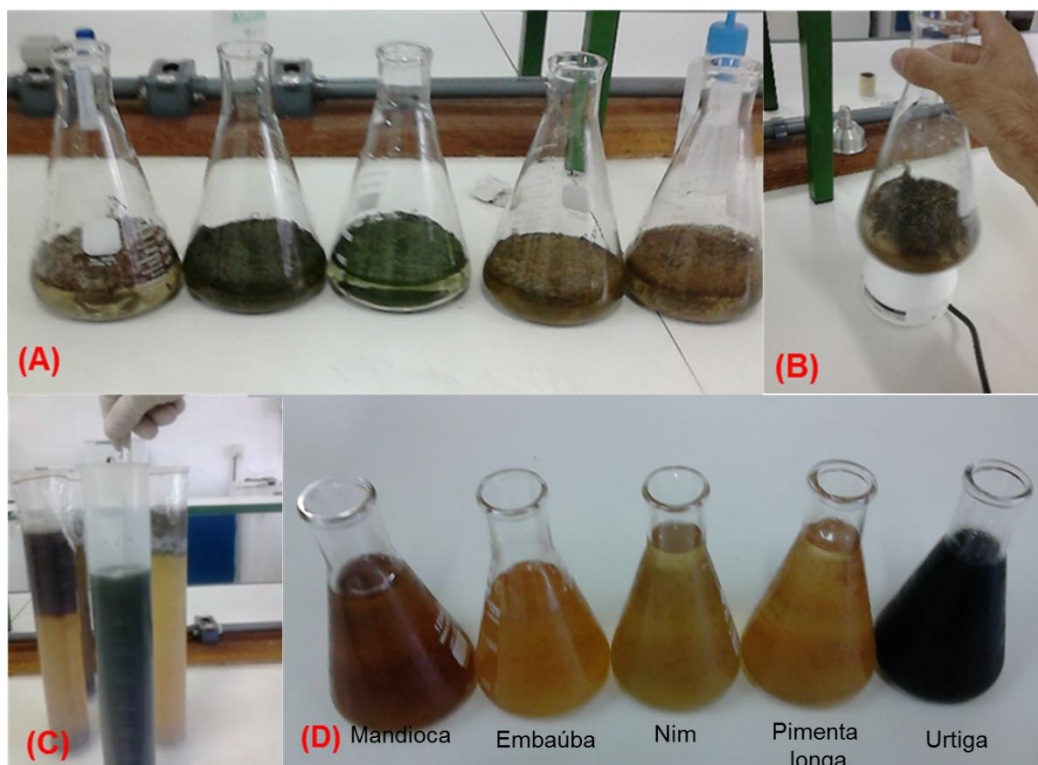


Figura 2: Obtenção dos extratos aquosos (A) 20g de folha vegetal triturada em 300 ml de água; (B) agitação em agitador; (C) misturas nas provetas sob agitação ocasional; (D) extratos filtrados.

#### 4.4. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura contendo os extratos vegetais foi preparado usando 125 mL de BDA e 125 mL de extrato vegetal, na testemunha utilizou-se 125 mL de BDA e 125 mL de água destilada totalizando 250 mL de meio de cultura. Os extratos foram adicionados ao BDA e esterilizado em autoclave por 15 minutos em temperatura de 121 °C a 1 atm. Em câmara de fluxo laminar, foi vertido 20 mL do meio de cultura para cada placa de Petri com dimensões 20 x 100 mm.

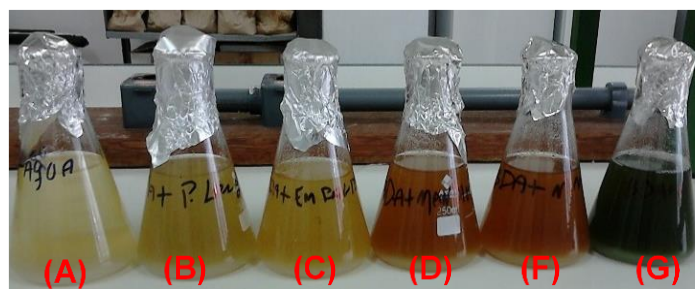


Figura 3: Meio de cultura com os extratos, (A) BDA; (B) Pimenta Longa; (C) Embaúba; (D) Mandioca; (E) Nim; (F) Urtiga

Após a solidificação do meio cultura foi transferido um disco de 5 mm de diâmetro da cultura monospórica para o centro de cada Petri placa contendo os extratos brutos das diferentes plantas, conforme Silva et al. (2009). As laterais das placas foram vedadas com filme de PVC para evitar possível contaminação evaporação dos compostos e ressecamento do meio de cultura (AQUINO *et al.*, 2014). As placas foram mantidas em temperatura ambiente  $\pm$  26 °C e fotoperíodo de 12h.

#### 4.5. Avaliação do crescimento micelial

A avaliação do crescimento micelial do fungo foi feita através de medições diárias do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, até que a colônia de um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Foi calculado o diâmetro médio de cada leitura através dos dados obtidos no sentido longitudinal e transversal. Estes valores foram usados para o cálculo do índice de velocidade crescimento micelial (IVCM) de acordo com a fórmula descrita por Aquino *et al.*, (2014).

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

onde

IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial,

D = Diâmetro médio atual,

Da = Diâmetro médio do dia anterior e

N= Número de dias após a montagem do experimento.

#### 4.6. Avaliação da esporulação

Cinco colônias de cada tratamento, com 12 dias de idade foram selecionadas do experimento anterior para avaliação da esporulação. A suspensão de esporos foi obtida adicionando 20 mL de água destilada na placa de Petri e passado levemente um pincel de cerdas macias sobre a colônia para retirar os esporos. Com uma pipeta depositou-se uma pequena amostra desta suspensão em câmara de Neubauer para contagem em microscópio ótico sob objetiva de 40X. Foram contados os esporos de dois quadrantes dispostos diagonalmente e feito a média de esporos por quadrante.

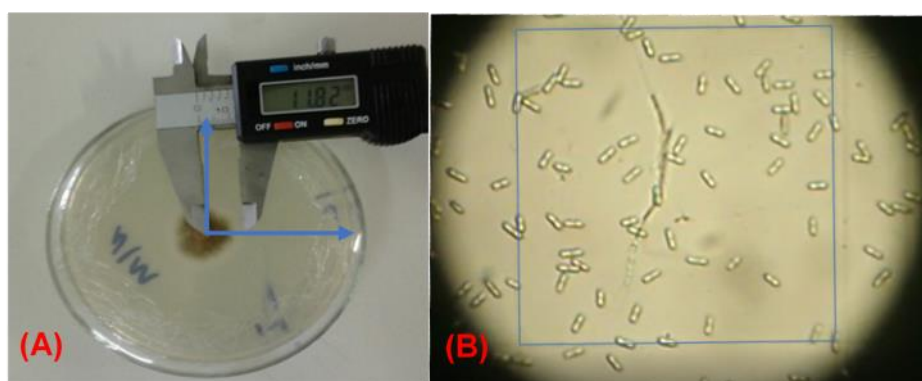


Figura 4: Avaliação dos experimentos, (A) medição do raio da colônia em dois sentidos ortogonais; (B) Contagem de esporos em microscópio ótico.

#### 4.7. Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos (extratos de nim, pimenta longa, urtiga, mandioca, embaúba e testemunha) e 10 repetições para a avaliação do IVCM e 6 tratamentos e 5 repetições para a avaliação da esporulação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR.

### 5. RESULTADOS

De acordo com a análise de variância (Tabela 1) houve pelo menos uma diferença significativa para o IVCM e para a esporulação. O extrato de

urtiga apresentou o maior valor de IVCM em relação aos demais tratamentos. Os extratos de nim e embaúba apresentaram valor de IVCM superior a testemunha mas não diferiram dos extratos pimenta longa e mandioca. Os tratamentos com extratos de pimenta longa e mandioca não diferiram da testemunha, (Figura 5).

Tabela 1: Análise de variância do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e da esporulação.

IVCM				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	236,6608	47,33216	13,5182**
Resíduo	54	189,07395	3,50137	
Total	59	425,73475		
CV % =	16,41			

Esporulação				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	7798745,381	1559749,076	20,3354**
Resíduo	24	1840827,736	76701,15568	
Total	29	9639573,117		
CV % =	34,2			

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < ,01$ )

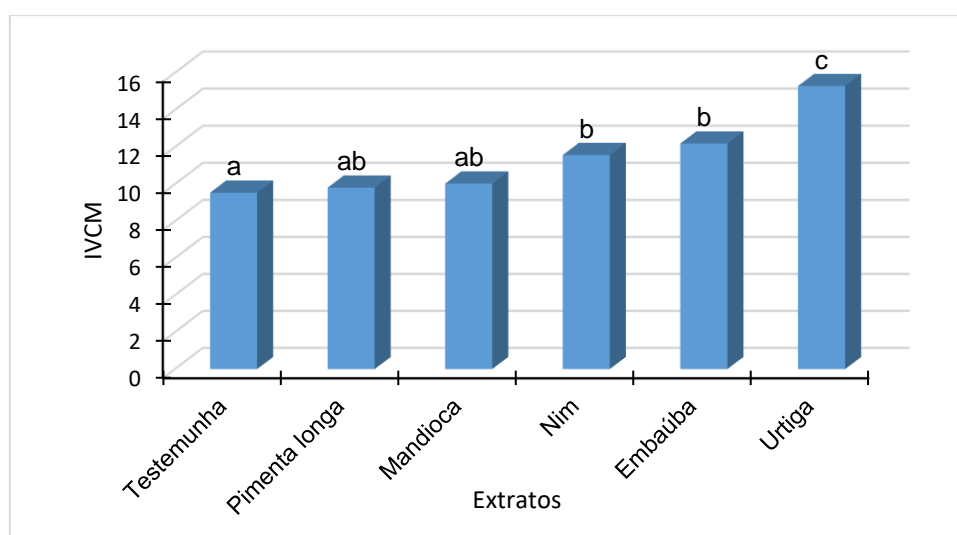


Figura 5: Índice de velocidade de crescimento micelial. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto a esporulação o nim e urtiga propiciaram uma maior esporulação em relação aos demais tratamentos. Os extratos de pimenta

longa e embaúba apresentaram número de esporos superior a testemunha mas não diferiram do extrato de urtiga (que apresentou maior esporulação juntamente com o extrato de nim), nem do extrato de mandioca que por sua vez não diferiu da testemunha, (Figura 6).

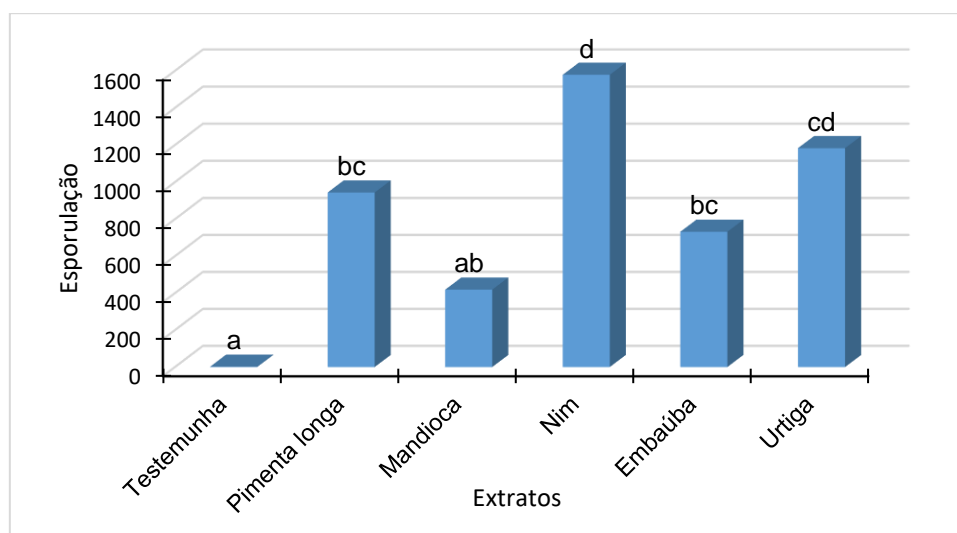


Figura 6: Médias da esporulação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6. DISCUSSÕES

Garcia et al (2012), observou baixa inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, quando submeteu o mesmo a tratamento com extrato de mandioca, assim como neste trabalho ao qual não houve inibição do crescimento micelial nem da esporulação de *Colletotrichum* spp. tratado com extrato de mandioca.

Quanto ao extrato de pimenta longa, Lobato et al (2006) utilizando extrato aquoso de *Piper aduncum* L. inibiu em 27 e 55 % o crescimento micelial dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora capsici*. Outros derivados desta planta já são mais estudados, como o óleo essencial, assim, na pesquisa desenvolvida por Bastos e Albuquerque (2004) que avaliando o controle de *Colletotrichum musae* em banana na pós-colheita que nos trabalhos constatou que o óleo de *P. aduncum* em concentrações acima de  $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , inibiu em 100 % o crescimento micelial e a germinação dos conídios.

Borges et al (2013) observou um percentual de inibição 35,0 % na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* da soja pelo óleo essencial de *Piper aduncum*. Também o extrato do fruto de pimenta longa reduziu o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, em 43% (GARCIA et al 2012). O óleo de *P. aduncum* é rico em dilapiol, substância que é comprovadamente antifúngica, (BETTIOL, 2009). Esta substância está presente no óleo de pimenta longa, ao qual só pode ser extraído através de solventes específicos ou em alta temperatura. Negreiros e Miqueloni (2013) extraíram o óleo e dilapiol desta planta submetendo as amostras à temperatura de ebulição da água (100 °C) por 60 minutos para biomassa seca e 180 minutos para biomassa verde.

A Urtiga apresentou o maior IVCM e o nim apresentou uma maior esporulação (Figura 5 e 6), mostrando que essas plantas podem estimular a o crescimento e a esporulação de *Colletotrichum* spp. Os dados obtidos com os extratos de urtiga corroboram com os resultados encontrados por Carvalho (2010) o qual observou que o extrato aquoso de urtiga estimulou o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Segundo o mesmo isto ocorre pelo fato de carboidratos, proteínas e outras substâncias importantes no metabolismo do fungo e presentes na planta enriquecerem o meio de cultura favorecendo seu crescimento

Os dados obtidos com o tratamento com extrato de nim contrastou com os resultados encontrados por alguns autores, como, Brito e Nascimento, (2015) que estudando o potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis*, obteve alta porcentagem de inibição do crescimento micelial e esporulação. Silva et al, (2012) obteve redução no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum f. sp vasinfectum* e *P. oryzae.*, com porcentagem de inibição de 23,76; 35,63 e 51,60 % respectivamente. Contudo alguns autores encontraram resultados diferentes, como, Araújo et al 2014 observou pouca inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum scovillei* utilizando extratos de folhas e sementes de nim, quando comparado com extrato de *Piper marginatum*. Almeida et al (2009) estudando o efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, observaram que todos os extratos apresentaram inibição sobre o crescimento



micelial. O mesmo autor observou ainda que o extrato de nim não inibiu a esporulação.

Jamal (2008) não obteve inibição do crescimento de *Colletotrichum musae* quando avaliou a ação do extrato de um outas espécie do gênero *Cecropia* (*Cecropia glaziovii*) o que mostra que a espécie deste gênero pode não apresentar substâncias inibitórias de fungos. Souza et al (2014) estudando o efeito de extrato de embaúba sobre bactérias patológicas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* não observou atividade antimicrobianos. Hernández-Terrones et al (2007), encontrou efeito alelopáticos dos extratos metanólicos da casca, do tronco e das raízes da embaúba sobre a germinação e desenvolvimento da parte aérea do capim-colonião. São raros os trabalhos referentes ao efeito de extrato de embaúba sobre fungos fitopatogênicos, sendo necessário uma maior investigação desta planta.

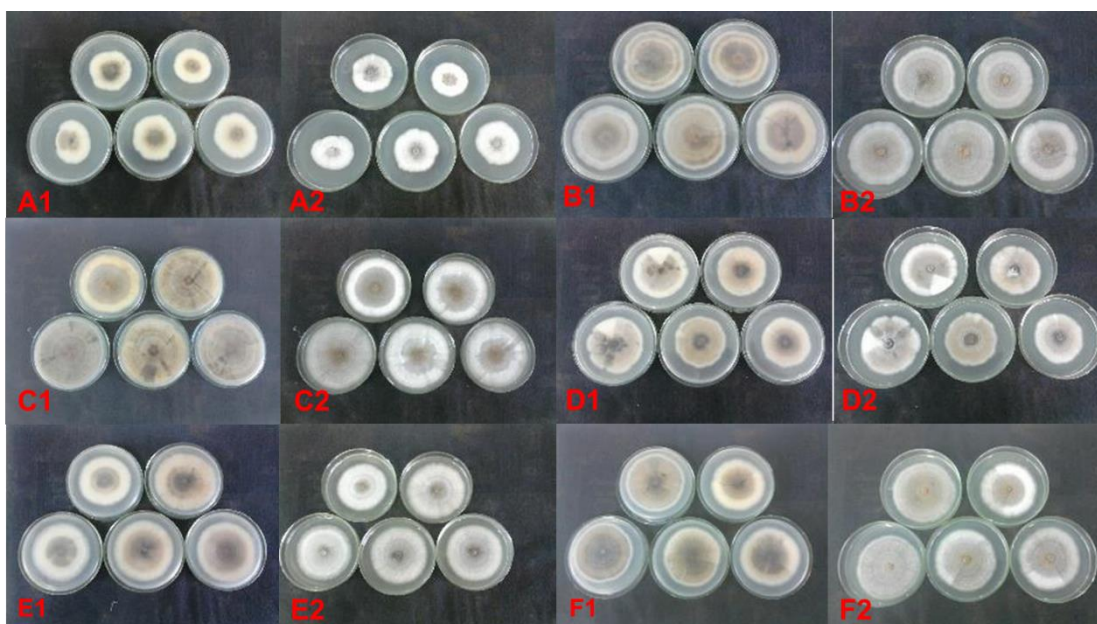


Figura 7: Colônias de *Colletotrichum* spp. As letras representam os tratamentos e os números representam o verso e o reverso das colônias. A - testemunha, B - embaúba, C - urtiga, D - pimenta longa, E - mandioca, F - nim, 1 – reverso da colônia e 2 – verso da colônia.

A principal causa de divergência entre os resultados encontrado neste trabalho e o resultado descrito por muitos pesquisadores pode estar relacionado a metodologia utilizada. Também são encontrados na literatura uma grande variabilidade de resultados obtidos com extratos vegetais, que



segundo Almeida *et al* (2009) é decorrente da falta de padronização na metodologia de obtenção dos extratos vegetais assim como a forma de esterilização e armazenamento dos mesmos.

Nesta pesquisa utilizou-se água como solvente para obtenção dos extratos, contudo algumas substâncias não são solúveis ou são de difícil dissolução em água, como, bases de alcalóides, óleos essenciais, bálsamos e resinas, mas solúveis em álcool. São solúveis em água, sais de alcalóides, heterosídeos, substâncias amargas, taninos e açúcares (Fonsêca, 2005), isto pode fazer com que os extratos aquosos tenham menos eficiência no controle de microrganismos do que os extratos alcoólicos.

O processo de esterilização também pode influenciar diretamente nos resultados, o que provavelmente ocorreu no presente estudo. Gusmão *et al* (2015) avaliando a atividade antifúngica de extrato de nim no controle “in vitro” de *Corynespora cassiicola* sob diferentes metodologias observou que os extratos submetidos a banho-maria e autoclave para esterilização apresentou menor percentual de inibição do fungo quando comparado com o extrato que não passaram por este processo. Isto mostra que existem substâncias presentes nos extratos de plantas com potencial fungicida que quando se eleva a temperatura do extrato muitas destas substâncias se perdem, como substâncias voláteis, proteínas e enzimas, transformando o extrato em substrato nutritivo para o desenvolvimento dos fungos.

As condições fisiológicas e sanitárias das plantas que deram origem aos extratos, podem ter contribuído para que nenhum dos extratos inibisse o crescimento micelial e a esporulação do *Colletotrichum* spp., pois muitas das substâncias antimicrobianas que as plantas sintetizam são produzidas em resposta a algum estresse físico, químico ou biológico, como as fitoalexinas que são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixos pesos moleculares (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000), sendo que neste experimento todas as plantas apresentavam aparentemente perfeitas condições físicas e biológicas.

## 8. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de nim, pimenta longa, urtiga, mandioca e embaúba submetidos a esterilização em autoclave, não inibiram o crescimento micelial nem a esporulação do fungo *Colletotrichum* spp.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitário**. Disponível em [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons), acesso em 18/05/2017.
- ALFENAS, A. C. MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV. 382p. 2007
- ALMEIDA, L. B. **diversidade e identificação molecular de isolados de *colletotrichum* associados ao gênero *capsicum* nas amazonas**. Dissertação. IMPA. PPGATU. Manaus, AM, 2015.
- ALMEIDA, T. F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C. **Efeito de extratos vegetais no controle de *Colletotrichum acutatum* agente causal da flor preta do morangueiro**. Summa Phytopathologica (Impresso), v. 35, p. 196-201, 2009.
- ANVISA, Agência Nacional de vigilância sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para)**. Relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília, 29 de outubro de 2013.
- AQUINO, C. F. *et al.* **Composição química e atividade *in vitro* de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, 2014. v.16, n.2, supl. I, p.329-336,
- ARAÚJO, E. R. *et al.* **Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão**. Pesquisa Agropecuária Brasileira (1977. Imprensa), v. 49, p. 88-94, 2014.
- BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- BARBOSA, R. I. *et al.* **Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. Espécies domesticadas**. Revista Acta Amazônica, Manaus, v. 32, n.2, p. 177-177, 2002.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. **Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana**. Fitopatologia Brasileira, v.29, n.5, p.555- 557, 2004
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e prepectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.145.
- BORGES, D. I. *et al.* **Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi***. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.3, p.325-331, 2013.

BRITO, N. M; NASCIMENTO, L. C. **Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro***. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.2, p.230-238, 2015.

CARVALHO, P. R. S. **Extratos vegetais: potencial elicitador de fitoalexinas e atividade antifúngica em antracnose do cajueiro**. Tese de deutorado. Jaboticabal. São Paulo. Brasil, 2010.

CASTELLANI, A. **the viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water**. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1939, v.42, p. 225-226.

COSTA, L. V. *et al.* **Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq.** Revista Acta Amazonica, vol. 38(2) 361 – 364, 2008.

DAMM, U. *et al.* ***Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts**. Online advance. Fungal Diversity. 2009.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Sistemas de Produção de Pimentas (*Capsicum spp.*)**, 2007. Disponível em < <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em 15 Jun. 2017.

FONSÊCA, S. G. C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. Fortaleza-CE, Departamento de farmácias – FFOE/UFC, 2005.

GARCIA, R. A. *et al.* **Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum***. Bioscience Journal (Online), v. 28, p. 48-57, 2012.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; BERNI, R. F. **A Antracnose da Pimenta-de-Cheiro**. Comunicado técnico 104. Manaus, AM 2014.

GUSMÃO, J. R. *et al.* **Atividade antifúngica de métodos de produção de extrato de nim no controle “*in vitro*” de *Corynespora cassiicola***. Cadernos de Agroecologia – Vol 10, Nº 3 de 201.

HERNANDEZ-TERRONES, M. G. *et al.* **Ação Alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*Panicum maximum*)**. Planta Daninha (Impresso), v. 25, p. 21-26, 2007.

ISAIAS, C. O. *et al.* **Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma spp.* contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae***. Summa Phytopathologica, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

JAMAL, C. M. *et al.* **O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós colheita da banana**. in: II Simpósio internacional Savanas Tropicais. ParlaMundi, Brasília 2008.

JOHNNY, L.; YUSUF, U. K.; NULIT, R. **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, p.4157-4165, 2011.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas.** 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA, 2005. v. 2. 663p.

LIMA, L. C. *et al.* **Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) Cv. Haden, após tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada.** Ciênc. agrotec. Lavras, v. 31, n. 2, p. 298-304, 2007.

LOBATO, A. H. S. *et al.* **Estudo “in vitro” do Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. Sobre o Crescimento Micelial de *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora capsici*.** 57º Congresso Nacional de Botânica. 13º Encontro Estadual de Botânica. Gramado, 2006.

MAIER, L. M. *et al.* **Avaliação dos fungos e bactérias patogênicas nas areias de baixo hidrodinâmica e alta ocupação humana no município do rio de Janeiro.** Augustus. Rio de Janeiro Vol.08, Nº.16. 2003.

MARCONDES, M. M. *et al.* **Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (Impresso), v. 16, p. 896-904, 2014.

MELLO, D. F. *et al.* **Compatibilidade de *Dicyma pulvinata* com defensivos agrícolas e eficiência do biocontrole do mal-das-folhas da seringueira em campo.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.2, p.179-185, fev. 2008.

NAVARRO, D. de. **Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. 37f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NEGREIROS, J. R. da S.; MIQUELONI, D. P. **Teor de dilapiol em função do tipo de biomassa aérea em populações de *Piper aduncum*.** Revista Científica. Agrárias, v. 56, n. 1, p. 73-79, 2013.

OLIVEIRA, E. S.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. **Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana.** Summa Phytopathol., Botucatu, v. 42, n. 4, p. 340-350, 2016.

PEREIRA, M. J. Z. *et al.* **Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*.** Horticultura Brasileira, v. 29 (4), p. 569-576, 2011.

PINTO, C. M. F.; MARTINS, R. C. **Agronegócio Pimenta em Minas Gerais.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. Hortic. bras., v.29, n. 2, 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M. E. S. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos.** Floresta, n.30, p.129-137, 2000.

SIGNORINI, T. *et al.* **Diversidade genética de espécies de Capsicum com base em dados de isozimas.** Horticultura Brasileira (Impresso), v. 31, p. 534-539, 2013.

SILVA, A. C. *et al.* **Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Isolado do maracujazeiro.** Ciência e Agrotecnologia, v.33, n.esp., p.1853-60, 2009.

SILVA, J. L. *et al.* **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 7, p. 80-86, 2012.

SOUSA JUNIOR, I. T. S.; SALES, N. L. P; MARTINS, E. R. **Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo.** Biotemas. Florianópolis, SC, v. 22, n.3, p.77-83, 2009.

SOUZA, D. O. *et al.* **Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya*-Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos.** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 19, p. 121-132, 2014.

SOUZA, P. T.; ROSSI, A. V. **Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinoides em pimentas capsicum a partir da reação com o complexo de co(ii) com 4-(2-piridilazo) resorcinol.** Química Nova, v. 37, No. 4, p. 631-637, 2014.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil.** Dissertação. Escola de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2007.

VASCONCELOS, C. S. *et al.* **Determinação da dissimilaridade genética entre acessos de *Capsicum chinense* com base em características de flores.** Revista Ceres, v. 59, p. 427-432-432, 2012.