

TRIAGEM DE MACROALGAS COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO NO CONTROLE *IN VITRO* DA ANTRACNOSE DO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

SCREENING OF SEAWEEEDS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN VITRO* IN CONTROL OF PAPAYA (*Carica papaya* L.) ANTHRACNOSE

Levi Pompermayer Machado^{1*}, Wilka Messner da Silva Bispo², Silvia Tamie Matsumoto³, Fabrício Oliveira Reis⁴, Reginaldo Bezerra dos Santos⁵, Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Jr.⁶

RESUMO

Macroalgas foram coletadas em ambiente marinho com o objetivo de avaliar a eficiência de extratos orgânicos no controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc.) do mamoeiro. Para tanto foram identificadas oito espécies de macroalgas marinhas, sendo quatro pertencentes ao filo Chlorophyta (*Caulerpa cupressoides* (West) C. Agardh, *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh, *Codium isthmocladum* Vickers, *Halimeda cuneata* (K. Hering) e quatro pertencentes ao filo Rhodophyta *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux, *Laurencia dendroidea* (Hudson), *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe, *Pterocladia capillacea* (Santelices & Hommersand). As algas ainda frescas foram expostas à mistura dos solventes diclorometano e metanol (4:1) para obtenção dos extratos, os quais foram posteriormente concentrados por evaporação. Os extratos foram preparados nas concentrações de 1 ppm e 2 ppm, diretamente no meio de cultura BDA e testados *in vitro*, avaliando a influência dos mesmos sobre o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Os extratos de *H. musciformis*, *L. dendroidea* e *O. secundiramea* apresentaram evidente ação sobre o crescimento vegetativo de *C. gloeosporioides*. O extrato da espécie *O. secundiramea* nas concentrações de 1 ppm e 2 ppm reduziu o IVCM em 91% e 100%, respectivamente, comparado ao controle.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, macroalgas marinhas, extratos naturais, fitopatologia, controle de doenças.

ABSTRACT

Macroalgae were collected in the marine environment in order to evaluate the efficiency of organic extracts in controlling papaya (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc.). Eight species were identified, four belonging to Chlorophyta phylum *Caulerpa cupressoides* (West) C. Agardh, *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh, *Codium isthmocladum* Vickers, *Halimeda cuneata* (K. Hering) and four belonging to Rhodophyta phylum *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux, *Laurencia dendroidea* (Hudson), Montagne, *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe, *Pterocladia capillacea* (Santelices & Hommersand). The fresh algae were exposed to a dichloromethane and methanol mix (4:1) in order to obtain the extracts, which were concentrated by evaporation. The extracts were prepared at the concentrations of 1 ppm and 2 ppm, directly in the PDA medium, and tested *in vitro*, evaluating the influence on the Micelial Growth Velocity Index (MGVI). The *H. musciformis*, *L. dendroidea* and *O. secundiramea* extracts showed marked action on the vegetative growth of *C. gloeosporioides*. The *O. secundiramea* extract at the concentrations of 1 ppm and 2 ppm reduced de MGVI in 91% and 100%, respectively, compared to the control.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, marine macroalgae, natural extracts, phytopathology, disease control.

A fim de se adaptar ao ambiente marinho e como estratégia de sobrevivência e defesa química, muitas

^{1*} Biólogo, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente – IBt/SP, Av. Miguel Estéfano, 3687 - CEP 04301-902 - Água Funda - São Paulo – SP, e-mail: levipmachado@yahoo.com.br.

² Bióloga, Doutoranda em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa;

³ Bióloga, Dra., Professora Adjunto Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo;

⁴ Eng. Agrônomo, Dr., Professor Adjunto Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão;

⁵ Químico, Dr. Professor Adjunto Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo;

⁶ Eng. Agrônomo, Dr., Professor Adjunto Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Sergipe.

(Recebido para Publicação em 07/10/2010, Aprovado em 09/07/2012)

algas produzem metabólitos secundários com relevante atividade biológica (ROCHA & DEBONSI, 2007). A exploração da atividade biológica dessas substâncias pode ser considerada uma forma potencial de controle alternativo das doenças de plantas cultivadas (ISMAN, 2000; SANTOS et. al, 2004). Tais substâncias possuem baixo índice de toxicidade e não geram resíduos tóxicos, como agrotóxicos convencionais, o que permite sua utilização como "pesticidas verdes" em lavouras (ISMAN, 2004; FERREIRA, 2005; MARQUES et al., 2002).

O Brasil possui, aproximadamente, 800 táxons de macroalgas marinhas identificadas em sua flora litorânea e o uso desse recurso natural representam grande potencial para a agricultura. Em países da Europa e nos Estados Unidos, produtos comerciais à base de algas já vêm sendo utilizados com sucesso como bioestimulantes e bioprotetores de plantas, fertilizantes e condicionadores de solo (ABREU et al., 2008).

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas em culturas de importância econômica (TAVARES & SOUZA, 2005), dentre as quais se destaca a antracnose do mamoeiro, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*. O patógeno afeta toda a parte aérea da planta, em qualquer fase do desenvolvimento, causando desfolha precoce e podendo causar a morte do hospedeiro. Quando a doença atinge o fruto, inutiliza-os para consumo e, conseqüentemente, para o comércio (SUSSEL, 2005).

Tendo em vista os resultados positivos já obtidos em ensaios testando a ação antifúngica de extratos de macroalgas (BALLESTEROS et al. 1992; PAULERT et al., 2009; ABREU et al., 2008; RIZVI & SHAMEEL, 2003), bem como a importância da cultura do mamão no estado do Espírito Santo, maior produtor e exportador nacional (MARTINS & COSTA, 2003), o presente trabalho buscou verificar o potencial de inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo *C. gloeosporioides*, promovido por extratos brutos de espécies macroalgas para possível utilização no controle alternativo da antracnose do mamoeiro.

As espécies de macroalgas foram coletadas na região de meso e infra-litoral de costões lateríticos da praia de Manguinhos (20°11'12" S 40°11'24" O), no município de Serra, Espírito Santo. A coleta foi realizada em período de baixa-mar de marés de sizígia, mantendo-se os exemplares vivos durante o transporte até laboratório de Fisiologia Vegetal, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo.

Exemplares de cada alga selecionada para o estudo, após a identificação (BARATA, 2004; FUJII et al., 2002, JOLY, 1967) foram depositadas no Herbário VIES, fiel depositário, da Universidade Federal do Espírito Santo sob os números de tombo de 18.849 a 18.856.

Após lavagem, separação e identificação do material, procedeu-se a confecção dos extratos. Para isso foi preparado um sistema de extração no qual cada espécie de alga, após ser pesada, foi acondicionada em erlenmeyer (500 ml) contendo uma mistura de diclorometano e metanol (4:1), conforme utilizado por FELÍCIO et al. (2007) e ROCHA & DEBONSI (2007). A mistura de solventes permaneceu uma semana em contato com o material vegetal para extração das substâncias. Após o fim da extração, a mistura composta por solventes e o extrato da alga, foi vertida em um funil de fracionamento para separar a fase aquosa da fase orgânica, utilizada neste estudo. Para obtenção do extrato bruto, o solvente foi removido em um evaporador rotativo (Fisatom®, modelo 802) sob vácuo a 45° C ± 2° C.

O inóculo do fungo foi obtido de lavouras de mamão, naturalmente infectadas, localizadas no município de Linhares, e foram cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

As matrizes do fungo foram conservadas em meio BDA (Batata, Dextrose e Agar) e mantidas a 28° C. A partir destas foi retirado o micélio do fungo que foi repicado em meio BDA do qual após uma semana de crescimento foi utilizado para preparação da suspensão de conídios em água destilada esterilizada na concentração 10⁵ conídios ml⁻¹, contados em câmara de Neubauer.

Para os ensaios de antifungicidade, cada extrato foi preparado nas concentrações de 1 ppm e 2 ppm, pela diluição do extrato bruto, diretamente no meio de cultura BDA. Após a solidificação do meio, foram adicionados discos de papel filtro esterilizado com 5 mm de diâmetro, nos quais foram pipetados 3µL da suspensão de conídios (REIS et al., 2009). Paralelamente, foram realizados os controles negativos, contendo apenas o meio BDA, os discos de papel e a suspensão de conídios, e o controle positivo (controle EtOH), no qual ao meio BDA foi adicionado etanol (P.A.), utilizado para solubilizar o extrato bruto.

As placas foram incubadas por seis dias em um germinador com alternância de temperatura a 28°C ± 2°C (Eletrolab®, modelo 102G). Os resultados foram obtidos por meio da medição do diâmetro do halo de crescimento da colônia fúngica, formado ao redor dos discos de papel. Os valores obtidos foram utilizados para determinar o IVCM (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial), expresso em cm.d⁻¹ (ABREU et al., 2008) de acordo com a equação 1.

$$IVCM = \frac{\sum (D - Da)}{N} \quad (1)$$

Onde, D: Diâmetro médio atual; Da: Diâmetro médio anterior; N: número de dias após a inoculação

A avaliação da atividade antifúngica foi determinada pela comparação entre os extratos e o controle, a fim de verificar a existência de valores significativos de redução do IVCM. Foi realizada adicionalmente, a comparação estatística entre as concentrações testadas do extrato de cada espécie e entre os extratos das diferentes espécies na mesma concentração. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste F e, quando verificadas diferenças significativas, as médias foram comparadas

pelo teste Tukey ($p < 0,05$), e as análises realizadas utilizando-se o programa ASSISTAT 7.5b.

No presente trabalho todos os extratos testados causaram redução no desenvolvimento micelial do fungo *C. gloeosporioides*. O IVCM e porcentagem de inibição dos testes realizados com as duas concentrações do extrato de cada macroalga testada e os controles negativos e positivos (EtOH) estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Índice de velocidade do crescimento micelial e porcentagem de inibição de *C. gloeosporioides* para diferentes extratos das macroalgas nas concentrações 1 e 2 partes por milhão (ppm). Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Algas		Concentração do extrato (ppm)			
		1		2	
		IVCM cm.dia ⁻¹	Porcentagem de inibição	IVCM cm.dia ⁻¹	Porcentagem de inibição
Chlorophyta	<i>Caulerpa cupressoides</i>	3,91 cA	47%	4,36 aA	41%
	<i>Caulerpa racemosa</i>	6,09 aA	17%	3,73 bB	49%
	<i>Codium isthmocladum</i>	5,02 bA	32%	3,19 cdB	57%
	<i>Halimeda cuneata</i>	4,25 cA	42%	3,54 bcB	52%
	Médias do Filo Chlorophyta	4,18	35,5%	3,71	49,75%
Rhodophyta	<i>Hypnea musciformis</i>	2,9 dA	60%	3,18 cdA	57%
	<i>Laurencia dendroidea</i>	3,86 cA	47%	0,12 eB	98%
	<i>Ochtodes secundiranea</i>	0,66 eA	91%	0,00 eB	100%
	<i>Pterocladia capillacea</i>	5,8 aA	21%	3,02 dB	59%
	Médias do Filo Rhodophyta	3,03	54,75%	1,58	78,5%
	Controle negativo	7,35 f	-	7,35 f	-
	Controle EtOH	7,17 f	-	7,17 f	-

Para os extratos das algas do filo Rhodophyta, na concentração de 1 ppm, o IVCM médio foi de 3,03 cm.d⁻¹, variando entre 0,66 e 5,8 cm.d⁻¹, enquanto na concentração de 2 ppm, o IVCM médio foi de 1,58 cm.d⁻¹, variando entre 0,0 e 3,18 cm.d⁻¹. Os extratos das espécies do filo Chlorophyta foram menos eficientes, apresentando IVCM médio na concentração 1 ppm de 4,18 cm.d⁻¹, variando entre 3,91 e 6,09 cm.d⁻¹, enquanto a 2 ppm a média do IVCM foi de 3,71 cm.d⁻¹, variando entre 3,19 e 4,36 cm.d⁻¹.

Os dados obtidos neste estudo corroboram os verificados por ABREU et al. (2008) que verificou o maior potencial inibitório de extratos pouco polares de

algas do filo Rhodophyta sobre o crescimento micelial do fungo do gênero *Colletotrichum*.

Dentro das macroalgas do filo Rhodophyta avaliadas as espécies *L. dendroidea* e *O. secundiramea* apresentaram extratos com maior potencial de inibição do fungo *C. gloeosporioides*, segundo CARVALHO & ROQUE (2000), POLZIN & RORRER (2003) e ANTUNES et al. (2008), este maior potencial pode ser atribuído da capacidade de sintetizar fenóis e terpenos halogenados, o que justifica a realização de estudo fitoquímico do extrato visando determinar as substância responsável pela atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, G.F., TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu v.34, p. 22-26, 2008.

ANTUNES, B. L., FLEURY, B. G., FUJII, M. et al. Sesquiterpenes of the Brazilian Marine Red Alga *Laurencia filiformis* (Rhodophyta, Ceramiales). **Natural products communications**, Estados Unidos, v.3, p. 1653-1654, 2008.

BALLESTEROS, E., MARTIN, D., URIZ, M.J. Biological activity of extracts from some mediterranean macrophytes. **Botanica Marina**, Berlim, v.35, p. 481-485, 1992.

BARATA, D. **Clorofíceas marinhas bentônicas do Estado do Espírito Santo**, São Paulo, 2004, 210 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo.

CARVALHO, L.R.; ROQUE, N.F. Fenóis Halogenados e/ou Sulfatados de Macroalgas Marinhas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n. 6, p. 757-764, 2000.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M.C.M. et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

FERREIRA, W.F. **Estudo de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, no controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da doença antracnose do mamão**, Vitória, 2005, 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo.

FUJII, M.T.; TEVEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. 2002. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) com enfoque nas espécies do Rio de Janeiro. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <www.bio.ibilce.unesp.br/sbfc/Laurencia%20curso%20RJ.pdf>. Acesso em: 10 de julho de 2009.

JOLY, A.B. **Gêneros de algas marinhas da costa atlântica latino-americana**. São Paulo: EDUSP, 1967. 461p.

ISMAN, M.B. Plant essential Oil for Pest and Disease Management. **Crop Protection**, v.19, n. 1, p. 603-608, 2000.

ISMAN, M.B. Plant essential oils as green pesticides for pest and disease management. **ACS Symposium Series**, Reino Unido, v.887, p. 41-51, 2004.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G., SOUZA, P.E. de. Efeito Fungitóxico dos Extratos de *Caryocar brasiliense* camb. sobre os Fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, p.1410-1419. 2002 (Edição Especial).

MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, 2003. 497p.

PAULERT, R., TALAMINI, V., CASSOLATO, J.E.. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berlim, v.116, p. 263-270, 2009.

POLZIN, J.P.; RORRER, L. G. Halogenated monoterpene production by microplantlets of the marine red alga *Ochtodes secundiramea* within an Airlift Photobioreactor under nutrient medium perfusion. **Biotechnology & Bioengineering**, Estados Unidos, v.82, n.4, p. 415-428, 2003.

REIS, F.O.; SANTOS, R.B.; MACHADO, L.M. Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) no controle da antracnose do mamão (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Resumos do XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. Fortaleza, Brasil. 2009. Disponível em: <<http://www.sbfv.org.br/congresso2009/trabalhos/autor/pos-colheita/-1214.pdf>>. Acesso em: 10 de julho de 2009.

RIZVI, M.A.; SHAMEEL, M. Biological activity and elementology of benthic algae from Karachi coast. **Pakistan Journal of Botany**. Karachi - Paquistão, v.35, n.5, p. 717-729, 2003.

ROCHA, O.P.; DEBONSI, R.P. Atividade fungicida de extratos da alga marinha *Centroceras clavulatum* (Ceramiales, Rhodophyta). **15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica**, USP, São Paulo. 2007. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/15Siicusp/1478.pdf>>. Acesso em: 10 de julho de 2009.

MACHADO et al. Triagem de macroalgas com potencial antifúngico no controle in vitro da antracnose do mamoeiro

SANTOS, R.B.; PALHANO, F.L.; VILCHES, T.T.B.; et al. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.95, n.1, p. 61–66, 2004.

SUSSEL, A.A.B. **Caracterização de Isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas.** Piracicaba, 2005,

68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

TAVARES, M.G; SOUZA, P.E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum loeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.) **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, v.1, p. 52-59, 2005.