

Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp

Edvirgem Rodrigues¹, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada^{1*}, José Renato Stangarlin², Maria Eugenia Silva Cruz¹ e Ana Cristina Grade Fiori-Tutida¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (Uem), Av Colombo, 5790 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Rua Pernambuco, 1777, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência

RESUMO. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a fungitoxicidade dos extratos brutos aquosos (EBA) de gengibre (*Zingiber officinalis*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) sobre o fungo *Helminthosporium* sp. Este patógeno foi identificado nas fibras do pseudocaule da bananeira, as quais são utilizadas na fabricação de artesanato local. Foram avaliados o crescimento micelial e esporulação do fungo *in vitro*, além do crescimento da colônia fúngica nas fibras tratadas com os extratos das plantas. As fibras receberam os seguintes tratamentos: preventivo (P), curativo (C) e T0, sendo que neste último, a inoculação e o tratamento com os EBAs foram realizados simultaneamente. Os resultados *in vitro* mostraram que, dos extratos testados, eucalipto foi mais eficiente na redução do crescimento micelial e produção de esporos do fungo. Com relação ao tratamento *in vivo*, verificou-se que apenas as fibras tratadas preventivamente com o EBA de eucalipto não foram afetadas por *Helminthosporium* sp.

Palavras-chave: *Zingiber officinalis*, *Corymbia citriodora*, controle alternativo, fibras de bananeira.

ABSTRACT. Evaluation of antifungal activity *in vitro* of ginger and eucalypt extracts on banana fibers infected with *Helminthosporium* sp. The present work aimed to evaluate the fungitoxicity of ginger (*Zingiber officinalis*) and eucalypt's (*Corymbia citriodora*) aqueous crude extracts (ACE) concerning the *Helminthosporium* sp fungus. This pathogen was identified in the fibers of banana pseudostem, used in local handicraft production. The fungus mycelial growth and sporulation were evaluated *in vitro*, as well as the growth of fungus colony on banana fibers treated with these plant extracts. The fibers received the following treatments: preventative, curative and T0 (the inoculation process and the treatments with the ACEs were used at the same time). The *in vitro* results showed that the eucalypt crude extract was the most efficient in mycelial growth and in reduction of spores production. As for the *in vivo* treatment, it was observed that fibers, preventatively treated with eucalypt ACE, were not affected by *Helminthosporium* sp.

Key words: *Zingiber officinalis*, *Corymbia citriodora*, alternative control, banana fibers.

Introdução

Com a crescente preocupação em se conservar a Floresta Brasileira, surgiu no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, o “Projeto Banana”, cujo objetivo é fornecer à população da área uma nova fonte de renda através da fabricação de artesanatos à base de fibras de bananeira. Entretanto um dos problemas que vem ocorrendo na produção desses artigos é a contaminação da matéria-prima por microrganismos, fator que vem comprometendo a qualidade do produto final. Por se tratar de uma área de conservação ambiental em que as comunidades são desprovidas de

recursos, as medidas de controle devem ser adequadas às condições ambientais, econômicas e sociais da região e a utilização de produtos naturais como os extratos e óleos essenciais de plantas medicinais vêm ao encontro desses requisitos.

Dada a grande riqueza química das plantas medicinais que possuem princípios ativos microbiocidas, elas se tornam fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos. As plantas medicinais contêm princípios ativos que são responsáveis por suas ações terapêuticas, desencadeando diversas

reações nos vegetais, animais e nos seres humanos (Peglow e Velloso, 2002). O gengibre (*Zingiber officinalis* (Willd.) Roscoe) é usado mundialmente como condimento e também na medicina popular. Seus rizomas possuem gingerol, zingibereno e carboidratos como os principais princípios ativos (Albuquerque, 1989) e acredita-se que eles residam em seus óleos essenciais, os quais compreendem de 1% a 3% de seu peso. De acordo com Yance (s.d.), as concentrações dos ingredientes ativos do gengibre variam com as condições de crescimento e estes produzem uma variedade de efeitos fisiológicos. O efeito do extrato bruto de *Z.officinalis*, incorporado ao meio de cultura BDA nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50%, foi estudado sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grout, *A. alternata* (Fr.) Kiessler, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W.Wils. Foi observada inibição de 100% do crescimento micelial de *C.graminicola*, *R.solani*, *S.rolfsii*, *C.graminicola* a partir das concentrações de 5%, 50%, 20% e 10% do extrato, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 1999). Também Singh *et al.* (1991) observaram que o extrato de rizomas frescos de gengibre mostrou-se eficiente no controle do oídio da ervilha.

O gênero *Corymbia* pertence à família das Myrtaceas, sendo a maioria encontrada em regiões tropicais (Ahmad *et al.*, 2002). A planta medicinal eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hooker M.), atualmente designada *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill e L.A.S. (Jhonson), possui, na sua composição química, compostos secundários como o citrionelol (aproximadamente 85%), geraniol, isopulegol, α e β pineno, cineol, guaiol, estragol, g-elemento, nopineno, canfeno, mirceno e b-cimeno (Costa, 1986). Os óleos essenciais de *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake, *E. citriodora* e *E. camaldulensis* Dehn, segundo Salgado *et al.* (2003), apresentaram diferentes potenciais fungitóxicos sobre os fungos *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Botrytis cinerea* Pers. e *Bipolaris sorokiniana* Sacc., sendo o *E. urophylla* o óleo com maior ação fungitóxica, cuja ação foi atribuída à presença do composto globulol, não detectado nos demais óleos.

O aumento dos níveis de agrotóxicos na produção de alimentos, o alto custo do controle químico, o aumento da resistência dos fitopatógenos, o impacto sobre o ambiente causado pelos produtos químicos e a procura por alimentos sem resíduos de agrotóxicos têm levado o homem à necessidade de obter alternativas de controle de doenças de plantas

(Reuveni *et al.*, 1997; Nakasone *et al.*, 1999). Dentre esses métodos alternativos, o uso de subprodutos de plantas medicinais pode ser uma alternativa viável, seja do ponto de vista econômico, seja do ponto de vista ambiental.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos extratos brutos aquosos de *Z.officinalis* e *C.citriodora* na inibição do crescimento micelial e na esporulação de *Helminthosporium* sp. *in vitro* e nas fibras do pseudocaule da bananeira.

Material e métodos

Material Vegetal

A matéria-prima (fibra da bananeira) foi obtida de artigos fabricados que se mostravam infectados por microrganismos e foram cedidos pelo responsável técnico da área de comercialização dos produtos da comunidade do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo.

Isolamento do fungo

O fungo foi isolado de manchas visualizadas nos artigos de artesanatos. Para tanto, utilizou-se o método direto, retirando-se uma pequena quantidade de esporos e transferindo-os para placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-agar (BDA). As placas foram incubadas a 28°C no escuro e a colônia fúngica isolada foi identificada como *Helminthosporium* sp. O isolado foi repicado para novo meio de cultura BDA e utilizado para os testes com os extratos brutos aquosos (EBA) das plantas medicinais.

Crescimento micelial e esporulação de *Helminthosporium* sp

Folhas de *C.citriodora* (200 g) e rizomas frescos (200 g) de *Z.officinalis* foram triturados em 1000 mL de água destilada por 3 minutos, em liquidificador. Os homogenatos foram filtrados em gaze e os extratos obtidos (EBA) foram incorporados em BDA nas concentrações de 1%, 5%, 10%, 20% e 40% (p/v), sendo, em seguida, esterilizados por autoclavagem e distribuídos em placa de Petri. Após a solidificação do meio, um disco (8 mm de diâmetro) de micélio com 10 dias de cultivo foi repicado para o centro das placas, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidos a 28°C no escuro. No tratamento controle, foram utilizadas placas de Petri, contendo apenas meio BDA. A avaliação foi realizada através da medição diária do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), 24 horas após a instalação do experimento e prosseguiu até o

momento em que as colônias fúngicas no tratamento controle cobriram 2/3 da superfície do meio de cultura. Após a testemunha ter atingido 2/3 da superfície da placa de Petri, foi realizada a contagem de esporos do patógeno. Para tanto, foram adicionados 5 mL de água destilada em cada placa e, em seguida, realizado um leve esfregaço. A suspensão foi filtrada em gaze e a contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições e 11 tratamentos, com esquema fatorial 2 x 5 + 1, cujos fatores foram 2 EBAs (*Z. officinalis* e *C. citriodora*), 5 concentrações (1, 5, 10, 20 e 40%), além de uma testemunha absoluta. Os fatores qualitativos (EBAs) foram comparados pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e o estudo do fator quantitativo (concentrações) foi realizado através da análise de regressão. Os tratamentos do fatorial foram comparados com a testemunha pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$).

Tratamento das fibras de bananeira com os EBAs

As fibras da bananeira foram cortadas em tiras com dimensões de 3,5 cm de largura e 15 cm de comprimento. Em seguida, foram lavadas em água corrente e separadas em bandejas, as quais foram identificadas conforme o tipo de tratamento a ser aplicado. As concentrações do EBA foram as mesmas utilizadas no tratamento *in vitro*. Foram realizados três tipos de tratamento: preventivo, curativo e concomitantemente (T0) à inoculação. No tratamento preventivo as fibras foram inicialmente pulverizadas com 10 mL de extrato da planta medicinal até o ponto de escorrimento e levadas para estufa de ar forçado com temperatura de 26°C. Após 24 horas, as fibras foram inoculadas, por pulverização, com suspensão de 5×10^5 de conídios mL⁻¹ de *Helminthosporium* sp, e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Em seguida as fibras foram levadas novamente para a estufa de ar forçado, onde permaneceram por 5 dias até ficarem completamente secas. Para o tratamento curativo, utilizaram-se os mesmos procedimentos, porém a inoculação do patógeno foi realizada antes do tratamento com o EBA. No tratamento T0, a inoculação e o tratamento com o EBA foram realizados simultaneamente. O tratamento controle consistiu dos três tipos de tratamento, utilizando-se água destilada ao invés dos EBAs. A eficiência dos tratamentos foi determinada pelo método de avaliação visual, que consistiu na presença ou ausência do fungo no material.

Resultados e discussão

Efeito dos EBAs no crescimento micelial e esporulação de *Helminthosporium* sp. *in vitro*

Analisando o efeito das diferentes concentrações dos EBAs em relação ao crescimento micelial de *Helminthosporium* sp., verificou-se que a espécie responsável pelo menor desenvolvimento do patógeno foi *C. citriodora* (Tabela 1). Foi observada diferença estatística significativa, em nível de 5%, dos EBAs, em todas as concentrações testadas, com exceção da menor concentração (1%), na qual os EBAs não se diferenciaram nem da testemunha.

Através da análise de regressão (Figura 1), verificou-se que as plantas medicinais utilizadas no experimento apresentaram comportamento diferenciado em relação ao crescimento micelial de *Helminthosporium* sp. Em relação à *Z. officinalis*, a curva ajustada foi logarítmica, sendo possível observar a redução do crescimento micelial já na concentração de 5%, com posterior redução do incremento, embora o efeito inibitório do EBA tenha sido mantido. Em relação à *C. citriodora*, a curva ajustada foi quadrática, revelando um maior efeito inibitório (0,0004 cm) quando utilizada a concentração de 32,25%, observando-se um discreto crescimento da colônia nas concentrações seguintes.

Tabela 1. Efeito do extrato bruto aquoso (EBA) de *C. citriodora* e *Z. officinalis* sobre o crescimento micelial (cm) de *Helminthosporium* sp.

EBA	Concentrações(%)					Média
	1	5	10	20	40	
<i>C.citriodora</i>	6,575 ^{ns} A	5,225 ⁽⁻⁾ A	4,100 ⁽⁻⁾ A	2,100 ⁽⁻⁾ A	1,675 ⁽⁻⁾ A	3,935 A
<i>Z.officinalis</i>	7,050 ^{ns} B	6,225 ⁽⁻⁾ B	5,175 ⁽⁻⁾ B	4,825 ⁽⁻⁾ B	4,200 ⁽⁻⁾ B	5,495 B
Testemunha	7,300					

C.V.(%) 8,97; Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade; Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett; Ns - médias não diferem da testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.



Figura 1. Crescimento micelial de *Helminthosporium* sp em diferentes concentrações do extrato bruto aquoso (EBA) de *C. citriodora* (●) e de *Z. officinalis* (▲).

Pela Tabela 2, pode-se verificar que o efeito dos EBAs na produção de esporos foi diferenciado quando ambos os extratos foram utilizados em concentrações mais altas (20% e 40%). Para o EBA de *Z. officinalis*, o aumento na concentração proporcionou valores de esporulação do fungo não diferenciáveis do controle, em nível de 5% pelo teste Dunnett. Quando se avaliou o comportamento dos EBAs nas diferentes concentrações sobre a esporulação do patógeno (Figura 2), verificou-se que, à exemplo do crescimento micelial, a curva ajustada para *Z. officinalis* foi logarítmica, evidenciando um discreto aumento na produção de esporos à medida que se aumentava a concentração do EBA. Já, para *C. citriodora*, o comportamento obtido foi linear, verificando-se decréscimos na esporulação quando foram utilizadas maiores concentrações do EBA.

Tabela 2. Efeito do extrato bruto aquoso (EBA) de *C. citriodora* e *Z. officinalis* sobre a esporulação (n.º conídios mL⁻¹) de *Helminthosporium* sp.

EBA	Concentrações (%)					Média
	1	5	10	20	40	
<i>C. citriodora</i>	0,67A ^{ns}	0,606A ⁽⁻⁾	0,576A ⁽⁻⁾	0,573A ⁽⁻⁾	0,308 B ⁽⁻⁾	0,457B
<i>Z. officinalis</i>	0,482 B ⁽⁻⁾	0,525A ⁽⁻⁾	0,618A ⁽⁻⁾	0,803 B ^{ns}	0,791 A ^{ns}	0,644 A
Testemunha	0,881					
C.V. (%)	16,6					

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade; Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett; ns – Médias não diferem da testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett; Dados transformados = log (x+2)



Figura 2. Esporulação de *Helminthosporium* sp. em diferentes concentrações dos extratos brutos aquosos (EBA) de (♦) *C. citriodora* e de (▲) *Z. officinalis*.

O efeito antimicrobiano dos extratos de plantas medicinais tem sido verificado tanto *in vitro*, como *in vivo*, e os resultados têm sido promissores contra os fitopatógenos testados. Pandey et al. (2002) avaliaram a micotoxidade de extratos de folhas sobre *Helminthosporium sativum* Pammel, King e Bakke. A

completa inibição do patógeno foi observada com o uso do extrato de *Mangifera indica* L., enquanto que inibição de 90% foi alcançada com os extratos de *Allium sativum* L, *Azadirachta indica* Juss, *Lawsonia inermis* L e *Matricaria chamomila* L.

A atividade fungicida de 8 extratos aquosos de diferentes espécies de plantas foi verificada, *in vitro*, sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora capsici* Leonian. Dos resultados obtidos, observou-se que *Thymus cilicicus* inibiu significativamente a taxa de crescimento em ambos os fungos quando comparado com o controle. O extrato de *Xanthium strumarium* L limitou somente o crescimento de *P.capsici* (Yanar et al., 2001).

Os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais também são alvo de estudo pelos pesquisadores. Dhaliwal et al. (2002) avaliaram a eficiência dos óleos essenciais de *Eucalyptus camaldulensis*, *Cymbopogon citratus* Stapf, *Mentha piperita* L., *Parthenium hysterophorus* L., *Cyperus scariosus* L., *Allium sativum*, *Cuminum cyminum* L., *Clerodendron inerme* Gaertn., *Callistemon lanceolatus* (Smith) D.C e *Anethum graveolens* L sobre o patógeno *Ucinula necator* (Schw.) Burr. A completa inibição da germinação do conídio foi observada na concentração de 100 µg/mL de *A.sativum*. As plantas tratadas com *A.sativum*, *C.scariosus*, *C.cyminum*, *C.citratus* e *E.camaldulensis*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, não apresentaram sintomas da doença.

O óleo de *E. citriodora* extraído da folha da planta foi testado para verificar a atividade antifúngica contra *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Snyder e Hansen, *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *Alternaria trititica* Prasada e Prabnu, *Rhizoctonia solani* e *A.solani*. As concentrações mínimas de inibição foram observadas nas concentrações de 0,25 e 0,50 ppm com *R.solani* e *A.solani*, respectivamente (Ramezani et al., 2002).

Fiori et al. (2000) observaram que o extrato bruto de *E.citriodora* foi mais eficiente em inibir o crescimento micelial de *Didymella bryoniae*, enquanto que os extratos de *Ageratum conyzoides* L e *Achillea millefolium* L. foram responsáveis por 52% e 46%, respectivamente na inibição da germinação de esporos do fungo. A completa inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos foi obtida quando foram utilizados os seguintes óleos essenciais: *C.citratus*, *A.conyzoides* e *E.citriodora*.

Tratamento das fibras do pseudocaule da bananeira

Em relação aos tratamentos das fibras de bananeira, o tratamento preventivo com *C. citriodora* foi o que proporcionou a melhor inibição do crescimento de colônias fúngicas a partir da concentração de 5% do EBA, obtendo-se fibras sem manchas escuras ocasionadas pela incidência do fungo e com melhor qualidade visual. Os tratamentos com *Z. officinalis* não foram eficientes para o controle do fungo nas fibras.

Conclusão

O extrato bruto aquoso de *Z. officinalis* não apresentou efeito inibitório sobre o fungo *Helminthosporium* sp. Por outro lado, *C. citriodora* apresentou atividade antifúngica sobre o patógeno, tanto *in vitro* como *in vivo*. Quando aplicado preventivamente, em concentrações acima de 5%, nas fibras de bananeira, este EBA proporcionou controle total do microrganismo.

Referências

- AHMAD, B. *et al.* Phytochemical evaluation of *Eucalyptus citriodora*. *Asian J. Plant Sci.*, Bholakpur, v. 1, n. 1, p. 5-56, 2002.
- ALBUQUERQUE, J.M. *Plantas medicinais de uso popular*. Brasília: ABEAS/MEC, 1989.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.
- DHALIWAL, H.S. *et al.* Activity of some essential oils against *Uncinula necator* causing powdery mildew of grapevine. *Indian Phytopathol.*, New Delhi, v. 55, n. 4, p. 529-531, 2002.
- FIORI, A.C.G. *et al.* Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol.*, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.
- NAKAZONE, A.K. *et al.* Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. *Summa Phytopathol.*, v. 25, n. 4, p. 331, 1999.
- PANDEY, M.K. *et al.* Mycotoxic potential of some higher plants. *Plant Dis. Res.*, St Paul, v. 17, n. 1, p. 51-56, 2002.
- PEGLOW, K; VELLOSO, C. Por que e como utilizar plantas medicinais. In: *Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável*. Porto Alegre, v. 3, 2002.
- RAMEZANI, H. *et al.* Fungicidal effect of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* and its major constituent citronellal. *New Zealand Plant Protection*, v. 55, p. 327-330, 2002.
- REUVENI, M. *et al.* A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in cucumber plants. *Eur. J. Plant Pathol.*, Dordrecht, v. 103, p. 581-587, 1997.
- RODRIGUES, E. *et al.* Potencial de *Zingiber officinale* (gengibre) no controle de fungos fitopatogênicos. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 24 (suplemento), Resumo 453, p. 321, 1999.
- SALGADO, A.P.S.P. *et al.* Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Cienc. Agrotecnol.*, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.
- SINGH, U.P. *et al.* Control of powdery mildew of pea by ginger extract. *Indian Phytopathol.*, New Delhi, v. 44, p. 55-59, 1991.
- YANAR, Y. *et al.* Fungicidal activity os some plant extracts against different plant pathogenic fungi. *Turkiye Herboloji-Dergis*, v. 4, n. 1 p. 58-63, 2001. Resumo.
- YANCE, D. *Ginger – Zingiber officinalis*. [S.l., s.d.]. Disponível em <<http://www.centrehealing.com/Resources/GingerMonograph.pdf>> Acesso em: 28 de março de 2005.

Received on April 13, 2004.

Accepted on December 15, 2005.