

## **BUSCA DE PRINCÍPIOS ATIVOS PARA O CONTROLE DE VASSOURA-DE-BRUXA (*Moniliophthora perniciosa*)**

Ariane da Costa MÁXIMO<sup>1</sup>; Maria da Paz LIMA<sup>2</sup>; Solange de Melo VERAS<sup>3</sup>; Maria Geralda de SOUZA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPPN/INPA; <sup>3</sup>Co-Orientadora FCA/UFAM;

<sup>4</sup>Colaboradora EMBRAPA

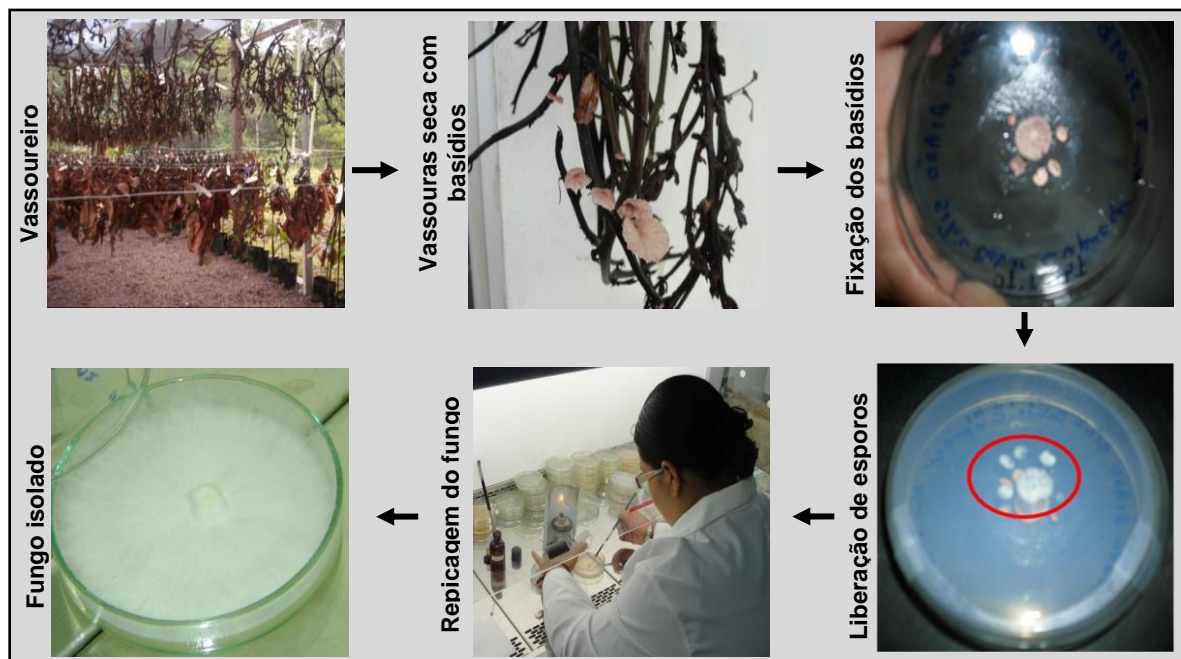
### **1. Introdução**

Desde épocas remotas a sociedade convive com as doenças de plantas que continuam sendo um grande obstáculo à produção agrícola, tanto em plantios comerciais como em pequenas plantações, gerando perdas significativas na produção. Esses fatores aumentam o custo de produção, diminuem a oferta e a qualidade dos produtos. Na região Norte, mais especificamente no estado do Amazonas, a baixa produtividade das culturas de interesse econômico está diretamente ligada a problemas fitossanitários. Entre esses, destaca-se o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Aime e Phillips-Mora 2005), agente causador da doença vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.]. Considerada a principal doença dessa cultura, é endêmica no Amazonas, estando presente em todos os plantios, podendo o patógeno levar a perdas de até 100% se medidas efetivas de controle não forem adotadas (Silva *et al.* 2007a). O controle de *M. perniciosa* bem como de outros fungos fitopatogênicos por meio de agrotóxicos pode propiciar o surgimento de patógenos resistentes além de causar intoxicação humana e animal, bem como desequilíbrio ambiental (Ghini e Kimati 2000). A literatura registra o potencial de óleos essenciais (Simões e Spitzer 2000) e de vários tipos de substâncias para o controle de fungos fitopatogênicos, como exemplificado por diferentes esqueletos de alcalóides ativos a fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Botrytis* (Oliva *et al.* 2003) e *Cladosporium* (Nissanka *et al.* 2001; Zhao *et al.* 1998). Os extratos e o óleo essencial de folhas de *Piper aduncum* foram efetivos sobre a germinação de basidiósporos e crescimento micelial de *M. perniciosa* (Bastos 1997). Considerando que a Amazônia é uma grande fonte de recursos naturais para obtenção de substâncias antifúngicas, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação de substâncias de origem vegetal frente a *Moniliophthora perniciosa*, como uma alternativa no controle da vassoura-de-bruxa.

### **2. Material e Métodos**

#### **Obtenção de *Moniliophthora perniciosa***

As vassouras secas, sem basidiocarpos, foram coletadas no campo experimental da EMBRAPA (AM-010, KM-29) e transportadas para o Laboratório de Fitopatologia. Após assepsia com solução de hipoclorito de sódio (1%) foram deslocadas para o vassoureiro e, então, submetidas a molhamento em sistema alternado (8 h molhadas e 16 h seca) até o aparecimento de basidiocarpos. Posteriormente, esses basidiocarpos foram coletados e submetidos a assepsia em solução aquosa de cloranfenicol a 1% por 1 minuto e então lavados por três vezes em água destilada. Para o isolamento do fungo, os basidiocarpos foram fixados na tampa da placa de Petri, previamente umedecida com vaselina que foi vertida sobre a própria placa contendo meio de cultura BDA. Após o desenvolvimento da colônia foi obtido o isolado do fungo (figura 1).



**Figura 1** - Isolamento de *M. perniciosa* através de vassouras secas.

#### **Manutenção das culturas fúngicas de *Moniliophthora perniciosa***

Selecionaram micélios jovens de *M. perniciosa* em crescimento nas placas de Petri, onde foram retirados fragmentos que foram transferidos para tubos contendo a solução de conservação previamente preparada (glicerol 70%, batata e dextrose em meio líquido, proporção 1:1). Os tubos foram mantidos em freezer a -80 °C. Para o uso destes micélios nos ensaios com os extrativos vegetais, estes isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e colocados em estufa à temperatura de 25 °C em fotoperíodo (12 horas sob luz e 12 horas no escuro).

#### **Seleção das substâncias para ensaios antifúngicos**

Para ensaio antifúngico frente a *M. perniciosa* selecionaram, inicialmente, substâncias de diferentes esqueletos alcalóides (AL-2) e (AL-3), amida (AM-1), cumarinas (CM-1) e (CM-2), cromona (CR-1), flavonóide (FL-1), limonóide (LI-1) e lignana (LG-1), figura 2. Essas substâncias foram previamente isoladas em espécies de Rutaceae, Meliaceae, Fabaceae, Burseraceae e Sapindaceae (tabela 1), no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN; Lab.19) da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais do INPA.

#### **Ensaio microbiológicos frente a *Moniliophthora perniciosa***

Nesta fase, foram utilizadas alíquotas de cada substância (solubilizadas em DMSO), incorporadas individualmente em 20 mL de meio BDA fundente, a fim de se obter a concentração final de 100 µg/mL. Posteriormente cada amostra foi vertida em placa de Petri e, após sua solidificação, discos miceliais de 8 mm de diâmetros retirados de bordas de colônias do fungo foram colocados no centro de cada placa. A incubação foi realizada em câmara de crescimento B.O.D. à temperatura de 25°C e ausência de luz. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e um controle (o qual não recebeu os produtos). A avaliação foi realizada pela observação da formação e medição do halo de inibição do crescimento fúngico nas placas, quando as colônias fúngicas das placas testemunhas de cada tratamento cobriram toda a superfície do meio. As medidas foram feitas no sentido ortogonal do diâmetro das colônias onde cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, e por comparação com o crescimento das colônias nas placas testemunhas. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.) para cada tratamento (substância/ concentração) foi calculada conforme expressa pela fórmula (Edginton *et al.* 1971):

$$P.I.C. = \frac{\text{crescimento testemunha} - \text{crescimento tratamento}}{\text{crescimento testemunha}} \times 100$$

### 3. Resultados e Discussão

O método de conservação proposto nesse trabalho a partir de micélios foi eficaz, pois os isolados de *M. pernicioso* depois, de conservados, apresentaram um bom crescimento micelial, cobrindo toda a superfície do meio de cultura em apenas 15 dias para serem utilizados no ensaio antifúngico com os extrativos vegetais. A vantagem deste método, além de tempo de crescimento, é a disponibilidade dos isolados permitindo a realização do ensaio antifúngico em qualquer época do ano. Ressalta-se que em determinados períodos esses fungos não são produzidos no cupuaçuzeiro.

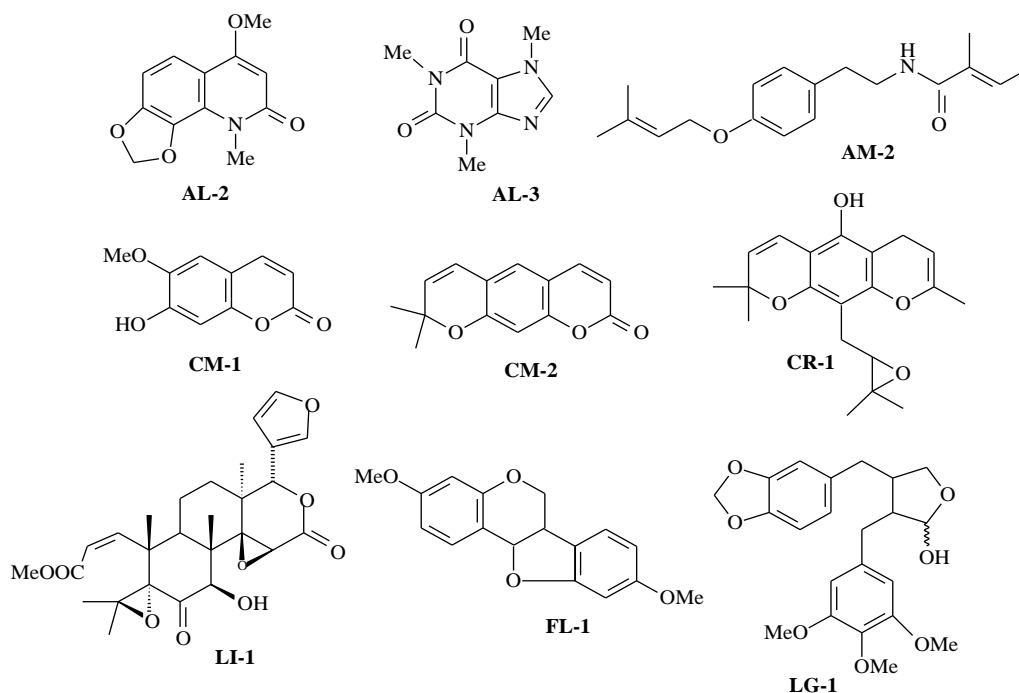
Conforme mostra a tabela 1, entre as substâncias nitrogenadas, o alcalóide AL-2 foi o que apresentou maior potencial de inibição, a amida N-[2-(4-preniloxifenil)etil]tigliamida também mostrou potencial pois na concentração 100 µg/mL inibiu 51,6% da placa de Petri. Comparando a inibição das cumarinas CM-1, CM-2 e a cromona CR-1 pode ser deduzido que o anel pirano e o núcleo coumarínico são importantes para a atividade frente ao fungo *M. pernicioso*. O pterocarpano FL-1 e a lignana LG-1 também são promissores de atividade antifúngica. A figura 3 ilustra a inibição causada pela cubebina e xantiletina.

Considerando a alta atividade detectada da casimiroina em 100 µg/mL, realizaram-se testes em concentrações baixas (1-0,5 µg /mL). Portanto em 1 µg /mL a atividade antifúngica foi encontrada entre 56,6-60,0%. Assim, concentrações intermediárias dessa substância serão testadas (entre 100-1µg/mL).

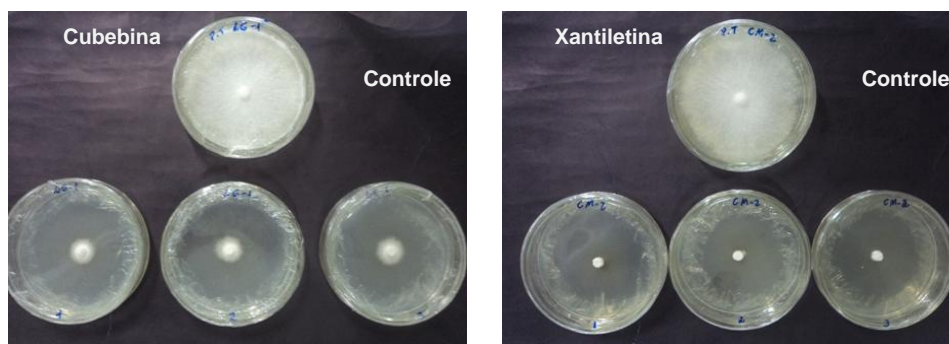
Os alcalóides do tipo quinolona e cumarinas têm sido relatados pelo potencial no combate a fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* e *Phomopsis* e nas espécies de *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (Oliva *et al.* 2003). As cumarinas também mostraram potencial para outros fungos como exemplificado pela xantiletina que apresentou potencial no desenvolvimento do fungo simbiótico (*Leucoagaricus gongylophorus*) das formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Godoy *et al.* 2005). As lignanas constituem um grupo de metabólitos com potencial antifúngico, a cubebina, por exemplo, tem ação fungicida em *Candida albicans* (Silva *et al.* 2007b), no entanto não foram encontrados relatos dessa lignana em fungos fitopatogênicos. Ressalta-se que em relação às substâncias mais ativas (casimiroina, xantiletina e cubebina) no ensaio que realizamos com *M. pernicioso*, não há relatos prévios sobre sua ação em fungos fitopatogênicos.

**Tabela 1** - Análise antifúngica *in vitro* das substâncias (100 µg/mL) sobre *M. pernicioso*

Amostras	Fonte de origem das substâncias	Inibição do crescimento micelial (%)
AL-2 (casimiroina)	<i>Spathelia excelsa</i> (Rutaceae)	100
AL-3 (cafeína)	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (Sapindaceae)	27,7
AM-1 {N-[2-(4-preniloxifenil)etil]tigliamida}	<i>Hortia longifolia</i> (Rutaceae)	51,6
CM-1 (escopoletina)	<i>Guarea humaitensis</i> (Meliaceae)	21,0
CM-2 (xantiletina)	<i>Brosimum rubescens</i> (Moraceae)	88,3
CR-1 (lorettina)	<i>S. excelsa</i> (Rutaceae)	4,5
FL-1 (homopterocarpina)	<i>Platymiscium ulei</i> (Fabaceae)	52,8
LI-1 (desacetilspathelina)	<i>S. excelsa</i> (Rutaceae)	38,3
LG-1 (cubebina)	<i>Tetragastris panamensis</i> (Bursaceae)	73,8



**Figura 2** - Substâncias submetidas a ensaios antifúngicos frente à *M. perniciosa*



**Figura 3** - Inibição causada por cubebina e xantiletina (100 µg/mL) sobre *M. perniciosa*

#### 4. Conclusão

O ensaio antifúngico realizado em *M. perniciosa* permitiu, inicialmente, a avaliação do potencial de substâncias de diferentes esqueletos na concentração de 100 µg/mL, onde o alcalóide AL-2 apresentou 100% de inibição. Nessa proposta, as substâncias mais ativas terão sua avaliação em outras concentrações. Considerando que o ensaio está completamente implementado, várias outras substâncias bem como amostras de óleos essenciais disponíveis no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) serão testadas. Espera-se com o término dos testes em todas as amostras vegetais fornecer contribuições significativas para o setor agrícola.

#### 5. Referências

Aime, M. C.; Phillips-Moura, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 1012 -1022.

Bastos, C.N. 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22:441-443.

Edginton, L.V.; Knew, K.L.; Barron, G.L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 62:42-44.

Ghini, R.; Kimati, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, São Paulo: Embrapa Meio Ambiente.

Godoy, M.F.P.; Victor, S.R.; Bellini, A.M.; Guerreiro, G.; Rocha, W.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Bacci-Jr, M.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Pagnocca, F.C. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3B): 669-672

Nissanka, A.P.K.; Karunaratne, V.; Bandara, B.M.R.; Kumar, V.; Nakanishi, T.; Nishi, M.; Inada, A.; Tillekeratne, L.M.V.; Wijesundara, D.S.A.; Gunatilaka, A.A.L. 2001. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*, 56: 857-861.

Oliva, A.; Meepagala, K.M.; Wedge, D.E.; Harries, D.; Hale, A.L.; Aliotta, G.; Duke, S.O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 890-896.

Silva, N.M.; Lopes, C.M.D.A.; Nery, D.S. 2007a. Manejo integrado da broca do fruto do cupuaçuzeiro. *Cartilha de Difusão*, INPA/UFAM/PPD/PPG-7, Manaus, 15p.

Silva, M.L.A.; Coimbra, H.S.; Pereira, A.C.; Almeida, V.A.; Lima, T.C.; Costa, E.S.; Vinhólis, A.H.C.; Royo, V.A.; Silva, R.; Filho, A.A.S.; Cunha, W.R.; Furtado, N.A.J.C.; Martins, C.H.G.; Carvalho, T.C.; Bastos, J.K. 2007b. Evaluation of Piper cubeba Extract, (-)-Cubebin and its Semi-synthetic Derivatives against Oral Pathogens. *Phytotherapy Research*, 21: 420-422.

Simões, C.M.O.; Spitzer, V. 2000. Óleos essenciais. In: Simões, C.M.O., (2 ed.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 387-416. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRS

Zhao, W.; Wolfender, J.; Hostettmann, K.; Xu, R.; Qin, G. 1998. Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry*, 47(1): 7-11.