

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS À SOJA**

LUCIANO DOS REIS VENTUROSO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2009**

EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS À SOJA

LUCIANO DOS REIS VENTUROSO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: PROF^a DR^a LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Co-Orientador: PROF. Ph.D. WALBER LUIZ GAVASSONI

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2009

**EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS À SOJA**

por

Luciano dos Reis Venturoso

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 10/02/2009

Prof^a Dr^a Lilian Maria Arruda Bacchi
Orientadora – UFGD/FCA

Prof. Dr^a. Maria do Carmo Vieira
UFGD/FCA

Prof. Dr^a. Kátia Regina F. Schwan-Estrada
UEM

A Deus, por sempre iluminar meu caminho

OFEREÇO

*Aos meus pais, Lorival e Elisabete, pela luta em fazer com que parte
deste sonho possa ter se realizado e por serem meus exemplos de vida*

Às minhas irmãs, Larissa e Camila, pelo apoio e incentivo

*A Lenita, minha companheira, pelo amor e carinho e pela incondicional ajuda e
dedicação na condução desta dissertação*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A professora Dr^a Lilian Bacchi, pela orientação, confiança e oportunidade, e pelas críticas construtivas e importantes na realização desta pesquisa e no decorrer de minha formação.

Ao professor Dr Walber Gavassoni, pelos ensinamentos, estímulo e orientação.

Aos amigos de “batalha” Anderson Bergamin e Fábio Régis, com os quais dividi algumas angustias, mas também, vivenciei muitas conquistas e realizações.

Ao pesquisador e amigo Marco Rangel, que acreditou na minha capacidade, sendo umas das primeiras pessoas a me incentivar a fazer este mestrado.

Ao Milson Serafim, o cara que tem a ciência no corpo. Pelo incentivo e por ter abrigado os “Meninos de Rondônia”, proporcionando a fundação da República Rondônia.

Ao amigo Bruno Pontim, pelas idéias, disposição e colaboração nas atividades desenvolvidas.

Aos meus amigos de pós-graduação com os quais vivenciei momentos de descontrações nas festas da pós.

As alunas de graduação, Cariny Moraes, Juslei Figueiredo, Marie Caroline, Noeli Ribeiro e Tatiana Martinelli, que colaboraram nas atividades e no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Embrapa Soja pelos isolados fúngicos.

Ao Paulo Cesar e a Fundação Vegetal, por cederem as sementes de soja.

Pelos valiosos ensinamentos recebidos dos professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aos companheiros do Laboratório de Sementes, Maria Izabel Giurizatto, Vicente Maciel e Priscila Narciso, pela colaboração na realização dos testes em sementes.

A Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Aos funcionários, Jesus Felizardo e Deomar (Nenê), pela colaboração e atenção nas atividades de campo.

A Lucia secretária do Programa de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FITOPATÓGENOS.....	8
RESUMO.....	8
1.1 INTRODUÇÃO.....	9
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
1.4 CONCLUSÕES.....	22
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES METODOLOGIAS DE ESTERILIZAÇÃO SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRATOS AQUOSOS.....	26
RESUMO.....	26
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.4 CONCLUSÕES.....	37
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO III - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE FITOPATÓGENOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	40
RESUMO.....	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.4 CONCLUSÕES.....	57
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CAPÍTULO IV - QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM EXTRATOS VEGETAIS ANTES DO ARMAZENAMENTO.....	60
RESUMO.....	60
4.1 INTRODUÇÃO.....	61
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.4 CONCLUSÕES.....	84
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS À SOJA

RESUMO: O trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de se utilizar extratos vegetais no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos e em relação ao tratamento e armazenamento de sementes de soja. Os ensaios experimentais foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados. Os experimentos para avaliar o controle *in vitro*, foram realizados inicialmente, por meio do potencial antifúngico de dez extratos vegetais, obtidos na concentração de 20%, sobre os fungos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. Posteriormente, foram utilizados extratos aquosos de alho, cravo-da-índia e canela, sob diferentes, metodologias de esterilização e concentrações, para analisar sua eficiência sobre a inibição do crescimento de fitopatógenos. Estes extratos foram utilizados ainda, no tratamento de sementes (400 ml/100 kg), mais o fungicida Carbendazin + Thiram (200 ml/100 kg) e a testemunha. As análises para avaliação do controle dos fungos associados às sementes foram realizadas em cinco períodos de armazenamento, 0, 35, 70, 105 e 140 dias. Foram observados que os meios de cultura contendo os extratos de cravo-da-índia, alho e canela apresentaram maior atividade antifúngica sobre os fitopatógenos, quando comparados aos demais extratos utilizados. O extrato aquoso de cravo-da-índia pode ser uma alternativa eficiente para estudos *in vitro*, pois o mesmo inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fungos fitopatogênicos estudados, com a vantagem de não sofrer alterações de seus princípios ativos, quando submetido a diferentes metodologias de esterilização. Ao contrário dos extratos de alho e canela, que tiveram sua eficiência influenciada pelas diferentes metodologias utilizadas. Em relação às diferentes concentrações, verificou-se que o efeito dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos foi dependente das concentrações utilizadas. O controle dos fungos associados às sementes de soja, com a utilização dos extratos vegetais, não ocorreu sobre toda a micoflora encontrada, no entanto, em relação à qualidade fisiológica tanto o produto químico como os extratos vegetais foram eficientes na manutenção da qualidade das sementes quando armazenadas.

Termos para indexação: controle alternativo, *Glycine max*, plantas medicinais.

PLANT EXTRACTS IN THE CONTROL OF THE SOYBEAN PHYTOPATHOGENIC FUNGI

ABSTRACT: It was evaluated the viability of using plant extracts in the control of phytopathogenic fungi *in vitro* and in relation to the treatment and storage of soybean seeds. The experimental trials were conducted at the Federal University of Grande Dourados. First, the antifungal potential of ten extracts of plants was evaluated, in the concentration of 20%, testing them for the fungi, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* and *Phomopsis* sp. Subsequently, we used aqueous extracts of garlic, clove and cinnamon with different methods of sterilization and concentration, to examine their efficiency on the inhibition of growth of pathogens. These extracts were also used in the treatment of seeds (400 ml/100 kg), more the fungicide Carbendazin + Thiram (200 ml/100 kg) and the control without treatment. The analysis to evaluate the control of fungi associated with seeds were carried out in five storage periods, 0, 35, 70, 105 and 140 days. Were observed that culture medium containing the extracts of clove, cinnamon and garlic showed greater antifungal activity on plant pathogens, when compared to other extracts used. The aqueous extract of clove may be an efficient alternative to *in vitro* studies, because it completely inhibited the development of all fungi studied, with the advantage of no change in its effect, when submitted to different methodologies of sterilization. However, the extracts of garlic and cinnamon, had its efficiency reduced by different sterilization methodologies. For different concentrations, it was found that the effect of plant extracts on the development of the plant pathogens was dependent on the concentrations used. There was no control of fungi associated with soybean seeds with the use of plant extracts, however, the physiological quality was maintaining by both the chemical and the plant extracts treatments during the seed storage.

Index terms: alternative control, *Glycine max*, medicinal plant.

INTRODUÇÃO GERAL

O tratamento químico é amplamente utilizado na agricultura. Os benefícios advindos dessa prática foram muitos, mas também são muitos os males que podem acarretar ao meio ambiente e ao ser humano. O uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos é resultado de uma visão equivocada do processo agrícola, que gerou como consequência, a crescente resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos sintéticos, aumentando a dependência de insumos químicos por parte de produtores (COUTINHO, 1996), que muitas vezes por conta própria aumentam as doses dos produtos, na tentativa de manter sob controle os agentes adversos e a viabilidade econômica do sistema de produção (SILVA et al., 2008).

Este fato tem impulsionado a indústria na descoberta e formulação de novos princípios ativos, formando um ciclo vicioso de alto custo econômico e ambiental, contaminação e degradação de solos e águas, redução da biodiversidade e desequilíbrios ecológicos, levando finalmente à insustentabilidade dos sistemas de produção agrícola (COUTINHO, 1996). Frente a estes problemas, a agricultura alternativa, ou agricultura sustentável, obtêm expressão política (ZADOKS, 1992) e estimula a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças.

A agricultura sustentável ou alternativa, que pode ser definida como aquela agricultura que utiliza recursos naturais racionalmente, visando a suprir as necessidades das gerações presentes e futuras, abrange a utilização de compostos químicos presentes nas plantas e que são resultantes do metabolismo primário e secundário (CRUZ et al., 2000). 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 (RODRIGUES et al., 2006). Também, esta forma de controle é interessante aos produtores rurais pela facilidade de acesso às plantas medicinais, normalmente cultivadas nas pequenas propriedades agrícolas (CUNICO et al., 2006).

Fungicidas originados de plantas são utilizados há séculos. As pesquisas envolvendo a procura de fungicidas obtidos de plantas, porém, só vêm aumentando nos últimos vinte anos. Tem se constatado na literatura, pesquisas *in vitro* demonstrando que diversos patógenos podem ser controlados com eficiência, por meio de extratos vegetais, como *Fusarium proliferatum* por extratos de alho e capim-santo (SOUZA et al., 2007), *Colletotrichum gloeosporioides* por extratos de melão de são caetano e eucalipto (CELOTO et al., 2008) e *Bipolaris sorokiniana* por extrato de cânfora (FRANZENER et al., 2003).

Plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem apresentar atividade direta, por meio de extratos brutos e óleos essenciais de plantas sobre fitopatógenos como bactérias, nematóides e fungos (FRANZENER et al., 2007; MELLO et al., 2006; SILVA et al., 2008), ou indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas aos patógenos (SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005).

O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana, poderá contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (STANGARLIN et al., 1999).

Além da atividade antifúngica *in vitro*, os pesquisadores têm investigado formas alternativas de realizar o controle de fitopatógenos no tratamento e armazenamento de sementes (CRUZ et al., 1997; PESSOA e LIMA, 1998; GONÇALVES et al., 2003; RANGEL et al., 2006). A utilização de extratos vegetais é uma forma de prover um controle sem desencadear os problemas provocados pelos fungicidas sintéticos que causam desequilíbrios ambientais nas culturas e demais populações vegetais e animais presentes no ecossistema. Cruz et al. (1999), trabalhando com sementes de soja tratadas com óleos essenciais e hidrolato de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Lavandula* sp. e *Ocimum basilicum*, verificaram controle efetivo dos fungos *Curvularia* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium semitectum*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Devido à estrutura morfológica e composição química, as sementes de soja se tornam sensíveis aos estresses ambientais, desde o início de seu desenvolvimento até a época da semeadura, resultando em efeitos negativos em sua qualidade (BORDINGNON e MANDARINO, 1994). Dentre os fatores bióticos que mais influenciam a perda de qualidade, pode-se mencionar a associação de microrganismos às sementes. Os fungos são considerados os principais agentes patogênicos, por serem mais ativos e terem maior habilidade de penetrar diretamente os tecidos vegetais (MACHADO, 1988). Desse modo, as sementes se tornam um meio eficiente de sobrevivência e disseminação de doenças para novas áreas, ou mesmo dentro de áreas tradicionais, alterando o equilíbrio entre patógenos do ecossistema, de forma particular, os do solo (HENNING et al., 1994).

A associação do inóculo dos patógenos com as sementes é responsável pela disseminação de um número expressivo de doenças de plantas cultivadas (MACHADO, 2000). Dentre estas, as doenças fúngicas são consideradas muito importantes, não somente devido ao maior número, mas pelos prejuízos causados, tanto no rendimento quanto na

qualidade das sementes (HENNING, 2004). Ito e Tanaka (1993) enfatizam ainda que além dos aspectos de transmissão, a presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como a redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento.

A manutenção da qualidade de um lote de sementes durante o período de armazenamento é outro aspecto a ser considerado dentro do processo produtivo de uma cultura, uma vez que o sucesso de implantação de uma lavoura depende, entre outros, da utilização de sementes sadias com alto padrão de qualidade (AFONSO JÚNIOR et al., 2000).

Vários fatores influenciam na conservação da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento, dentre eles destaca-se o desenvolvimento de fungos, principalmente *Aspergillus* e *Penicillium* (GONÇALVES et al., 2003), pois utilizam as sementes como substratos (CIRIO e LIMA, 2003). A associação de fungos às sementes pode ocasionar redução da germinação e do vigor, além da liberação de micotoxinas que podem causar intoxicações tanto em animais como no homem (MALOZZI e CORREA, 1998).

Diante deste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de se utilizar extratos vegetais no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos e em relação ao tratamento e armazenamento de sementes de soja.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FITOPATÓGENOS

RESUMO: A formação de uma consciência ecológica e a necessidade de se preservar o meio ambiente tem gerado a necessidade de testar produtos naturais, visando um controle alternativo de fitopatógenos. Desta forma, objetivou-se avaliar o potencial de dez extratos aquosos sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Foram conduzidos, no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados, seis ensaios experimentais em delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 10 repetições para cada ensaio. Os tratamentos constaram dos extratos bruto aquosos de alho, arruda, canela, cravo-da-índia, cavalinha, eucalipto, hortelã, jabuticaba, melão de são caetano e nim na concentração de 20%, mais a testemunha (somente BDA). Os ensaios foram realizados com os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. Os extratos foram filtrados em papel wathman nº 1, colocados em banho maria a 65°C, durante 1 hora, incorporados em meio BDA e acondicionados em placas de Petri, onde foram transferidos discos de micélio dos patógenos, de 0,3 cm de diâmetro. Foi analisado o crescimento micelial da colônia, a porcentagem de inibição e a taxa de crescimento dos fungos. Foi observado que os meios de cultura contendo os extratos de cravo-da-índia, alho e canela apresentaram maior atividade antifúngica sobre os fitopatógenos, quando comparados aos demais extratos utilizados. Destaca-se o extrato de cravo-da-índia, que inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fitopatógenos testados.

Termos para indexação: crescimento micelial, plantas medicinais e controle alternativo.

EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS ON THE DEVELOPMENT OF PLANT PATHOGENS

ABSTRACT: The formation of an ecological conscience and the need to preserve the environment has generated the need to test natural products, targeting an alternative control of plant pathogens. In this way aimed at evaluating the potential of ten aqueous extracts on the development of phytopathogenic fungi. Were conducted in the Laboratory of Phytopathology of Federal University of Grande Dourados, six experimental trials in a completely randomized design with 11 treatments and 10 replications for each assay. The treatments consisted of crude aqueous extracts of garlic, rue, cinnamon, clove, horsetail, eucalyptus, mint, jabuticaba, melon-of-são-caetano and neem in the concentration of 20%, more the witness (only PDA). The trials were carried out with the fungus *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* and *Phomopsis* sp. The extracts were filtered in paper wathman n° 1, put in the bain marie 65°C for 1 hour, incorporated in PDA medium and added in Petri dishes, where they were transferred to discs mycelium of pathogens, from 0.3 cm of diameter. Was determined the mycelial growth of the colony, the percentage of inhibition and the rate of growth of fungi. Were observed that the PDA medium containing the extracts of clove, garlic and cinnamon showed most antifungal activity on the plant pathogens, when compared to other extracts used. Highlight for the extract of clove, which inhibited the development of all pathogens tested.

Index terms: mycelial growth, medicinal plant, alternative control

1.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a exploração da atividade de compostos secundários tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos, por meio da utilização de subprodutos de plantas medicinais como extrato bruto e óleo essencial, uma vez que apresentam, em sua composição, substâncias com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (MATOS, 1997). Possuem ainda, a vantagem de serem praticamente inofensivas ao homem e ao meio ambiente, de menores custos, facilmente disponíveis aos agricultores, e em alguns casos podem inclusive superar os produtos sintéticos em sua ação antimicrobiana (STANGARLIN et al., 1999).

Devido à 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 (RODRIGUES et al., 2006). Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides (DI STASI, 1996), fenóis e saponinas (SILVA JÚNIOR e VIZZOTO, 1996).

A diversidade de substâncias ativas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais, no intuito de explorar suas propriedades fungitóxicas (FRANZENER et al., 2003). Na literatura tem-se verificado o registro da eficiência de extratos vegetais, obtidos de diversas espécies botânicas, como é o caso da arruda, melão de são caetano, eucalipto (CELOTO et al., 2008), cavalinha, hortelã (ROZWALKA et al., 2008), alho, canela (VIEGAS et al., 2005), cravo-da-índia (AMARAL e BARA, 2005), jabuticaba (RANGEL et al., 2006) e nim (CARNEIRO et al., 2008), na promoção da inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica. Considera-se ainda, que a diversidade dessas substâncias poderia possibilitar a utilização direta pelo produtor, por meio do cultivo da planta possuidora dos compostos secundários, preparo e aplicação direta do extrato nas culturas comerciais (CELOTO et al., 2008).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto e óleo essencial, obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (CUNICO et al., 2003), tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). De acordo com Lyon et al. (1995), a proteção conferida pelo tratamento com extratos vegetais é capaz de impedir infecções subseqüentes por diferentes patógenos, mostrando-se como uma estratégia no controle fitossanitário.

Extratos aquosos e óleos essenciais obtidos a partir de plantas apresentam atividade antifúngica contra uma ampla gama de fungos (WILSON et al., 1997). Wang et al. (2001) avaliaram extratos de 88 espécies de plantas, e constataram que, com 19 destas houve inibição na formação de zoósporos e no crescimento de *Phytophthora infestans in vitro*. Fiori et al. (2000) observaram que o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* e *Ageratum conyzoides* foram os mais efetivos na inibição do crescimento micelial de *Didymella bryoniae*. Trabalhando com extratos de sementes de nim, Bhutta et al. (1999) verificaram, *in vitro*, inibição do crescimento de *Alternaria alternata* e *Macrophomina phaseolina*. Em estudos de avaliação do efeito de extratos vegetais e/ou óleos essenciais de alho e capim santo, sobre o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme*, Owolade et al. (2000) mostraram que esses produtos podem inibir ou até suprimir o desenvolvimento desse microrganismo. Celoto et al. (2008) verificaram que os extratos das plantas de melão de são caetano, eucalipto e mentrasto proporcionaram maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial, ou maiores porcentagens de inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Os autores afirmam ainda, que a presença de substâncias antifúngicas em extratos de plantas é uma realidade que merece ser melhor avaliada.

A formação de uma consciência comum sobre a necessidade de se preservar o meio ambiente tem gerado a necessidade de testar produtos naturais, visando um controle alternativo de fitopatógenos. Diante do contexto, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos extratos bruto aquosos de alho, arruda, canela, cravo-da-índia, cavalinha, eucalipto, hortelã, jabuticaba, melão de são caetano e nim sobre o desenvolvimento micelial dos fungos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* e *Cercospora kikuchii*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de novembro de 2007 a abril de 2008. Os extratos vegetais foram preparados no próprio laboratório, a partir de plantas coletadas junto ao Horto de Plantas Medicinais da UFGD e de produtores locais.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 10 repetições, para cada ensaio. Os extratos foram obtidos a partir de bulbos de alho (*Allium sativum*), casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), botão floral de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), folhas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), casca do fruto de jabuticaba (*Myrcia cauliflora*), sementes de nim (*Azadirachta indica*), e parte aérea de arruda (*Ruta graveolens*), cavalinha (*Equisetum* sp.), hortelã (*Mentha piperita*), melão de são caetano (*Momordica charantia*), mais a testemunha, que constou apenas do meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA). Utilizou-se para cada ensaio experimental um fitopatógeno, sendo esses, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp.

Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram isolados a partir de sementes de soja, no Laboratório de Fitopatologia da UFGD, e os demais fungos foram fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Soja - Embrapa Soja.

Para obtenção dos extratos vegetais, foram coletadas 20 g do material vegetal e trituradas em liquidificador com 100 ml de água destilada. A solução foi filtrada em papel wathman nº 1, recolhida em erlenmeyer devidamente identificado e colocada em banho maria a 65°C por um período de 1 hora. Em seguida os extratos aquosos foram homogeneizados ao meio BDA fundente, de modo a obter uma concentração de 20%, e vertidos em placas de Petri. Posteriormente à solidificação do BDA, foram transferidos no centro das placas, discos de 0,3 cm de diâmetro do micélio dos fitopatógenos. Os isolados fúngicos de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. foram retirados a partir de culturas puras com 7 dias de idade em meio BDA.

As placas de Petri foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Na testemunha havia apenas o meio BDA. As leituras foram realizadas a cada três dias, perdurando até o momento em que as colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999).

Para avaliação do crescimento micelial das colônias fúngicas foram realizadas medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco

repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada uma média. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos fitopatógenos foi obtida por meio da fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha. A taxa de crescimento dos fitopatógenos foi mensurada conforme Benício et al. (2003), onde os dados foram plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) os dias de incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial da colônia e (b) a taxa de crescimento micelial, determinada pelo coeficiente de regressão.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, submetidos a análise de variância com auxílio do SISVAR, e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de variância indicou diferenças na atividade antifúngica dos extratos vegetais perante os fitopatógenos utilizados no estudo.

Com relação ao crescimento micelial dos fitopatógenos, foi constatada atividade antifúngica dos extratos vegetais desde o terceiro, até o décimo segundo dia de incubação. *Aspergillus* sp., desenvolvendo-se em meio de cultura com adição do extrato de cravo-da-índia, apresentou menor crescimento micelial comparado aos demais extratos em todos os dias de incubação, exceto no terceiro dia, onde assemelhou-se ao extrato de alho (Figura 1).

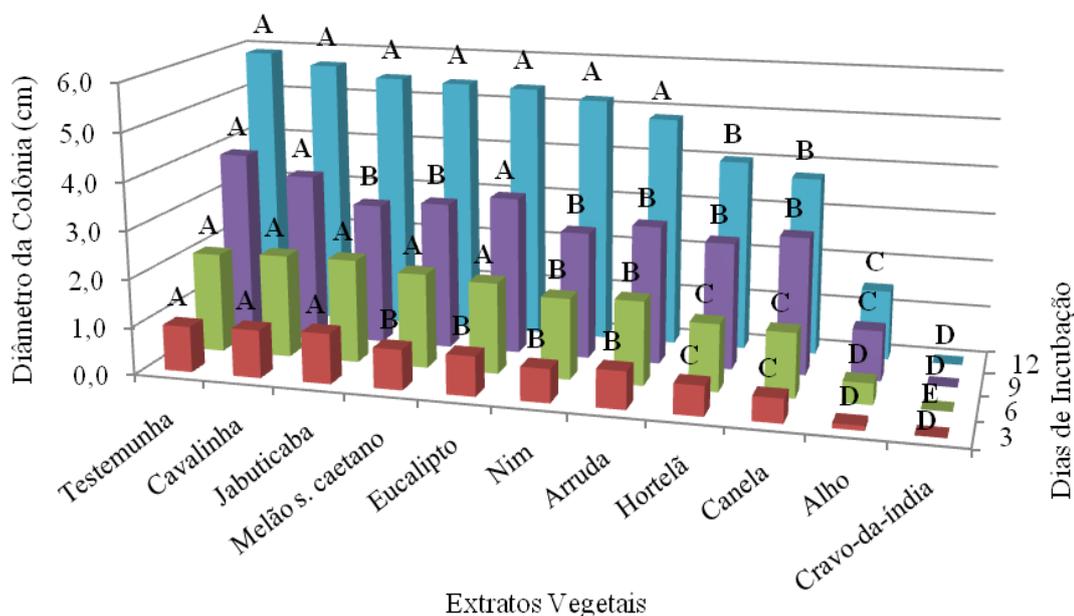


FIGURA 1. Crescimento micelial de *Aspergillus* sp. submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

No décimo segundo dia de incubação foi verificada superioridade do extrato de cravo-da-índia, não permitindo o crescimento do patógeno. Também em estudos com extrato de cravo-da-índia, sobre o desenvolvimento de patógenos *in vitro*, Belém (1997) verificou que o produto inibiu a germinação de esporos e o crescimento micelial tanto de *Aspergillus flavus* como de *Aspergillus niger*.

Viegas et al. (2005), analisando a toxicidade de óleos essenciais, verificaram maior inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* com o emprego dos óleos de bulbilho de alho e principalmente, de casca de canela. No estudo, o extrato de alho reduziu significativamente o crescimento micelial de *Aspergillus* sp., entretanto o extrato realizado a

partir de canela, juntamente com o extrato de hortelã apresentaram atividade antifúngica intermediária. Em relação aos demais extratos foram observados menor crescimento que a testemunha, sendo, no entanto, todos semelhantes entre si. Wilson et al. (1997) evidenciaram propriedades antifúngicas no extrato de hortelã, demonstrando potencial no controle de *Botrytis cinerea*.

Os extratos aquosos de cravo-da-índia, alho e canela demonstraram em todas as avaliações, significativa atividade antifúngica sobre o crescimento micelial de *Penicillium* sp., sendo superiores aos demais extratos. Mesmo havendo crescimento do patógeno com a utilização do extrato de alho e canela a partir do nono dia de incubação, não houve diferença em relação ao extrato de cravo-da-índia (Figura 2). Resultados semelhantes foram constatados por Belém (1997), que não observou crescimento micelial de *Penicillium* spp., isolado de sementes de feijão, quando este foi submetido ao extrato de cravo-da-índia.

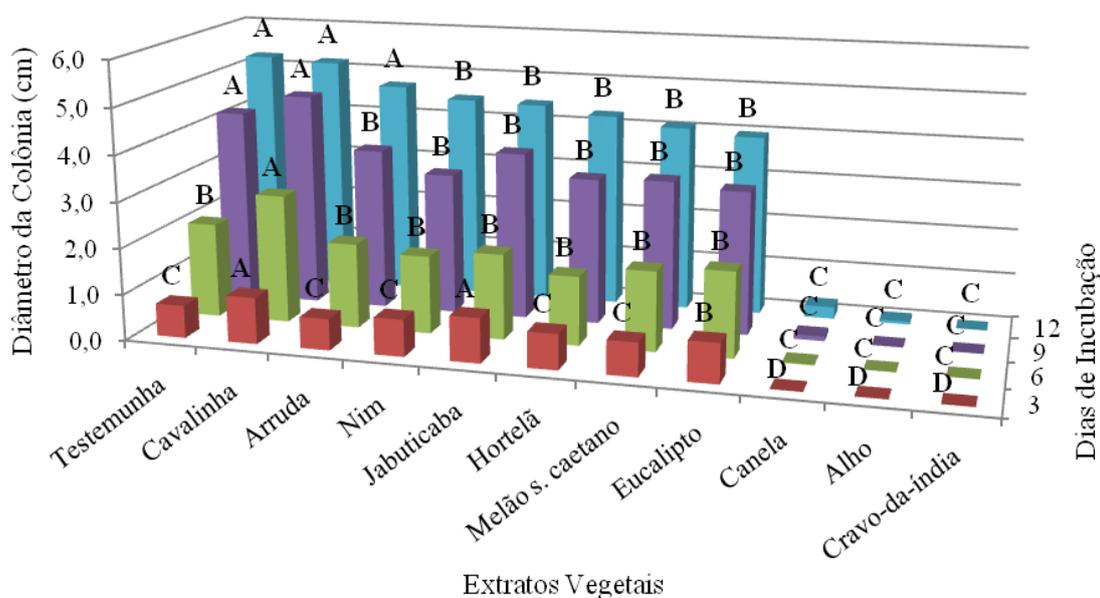


FIGURA 2. Crescimento micelial de *Penicillium* sp. submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Pode ser notado, aos três dias de incubação, maior crescimento de *Penicillium* sp. nos tratamentos com cavalinha e jabuticaba. O meio de cultura contendo extrato de cavalinha proporcionou maior crescimento do fungo até o sexto dia de incubação, pressupondo que possa existir substâncias que estimulem e/ou favoreçam inicialmente o crescimento do patógeno. Entretanto, aos doze dias de incubação os extratos de cavalinha e arruda não diferiram do tratamento controle. Os extratos de eucalipto, melão de são caetano, hortelã,

jabuticaba e nim apresentaram pequena, porém significativa redução no desenvolvimento micelial do fungo.

Colletotrichum sp. apresentou desenvolvimento mais lento, estendendo as análises de crescimento micelial até os quinze dias de incubação. Constatou-se ao final das avaliações, com base no diâmetro da colônia fúngica, que todos os extratos vegetais testados no estudo apresentaram atividade antifúngica, em maior ou menor intensidade (Figura 3).

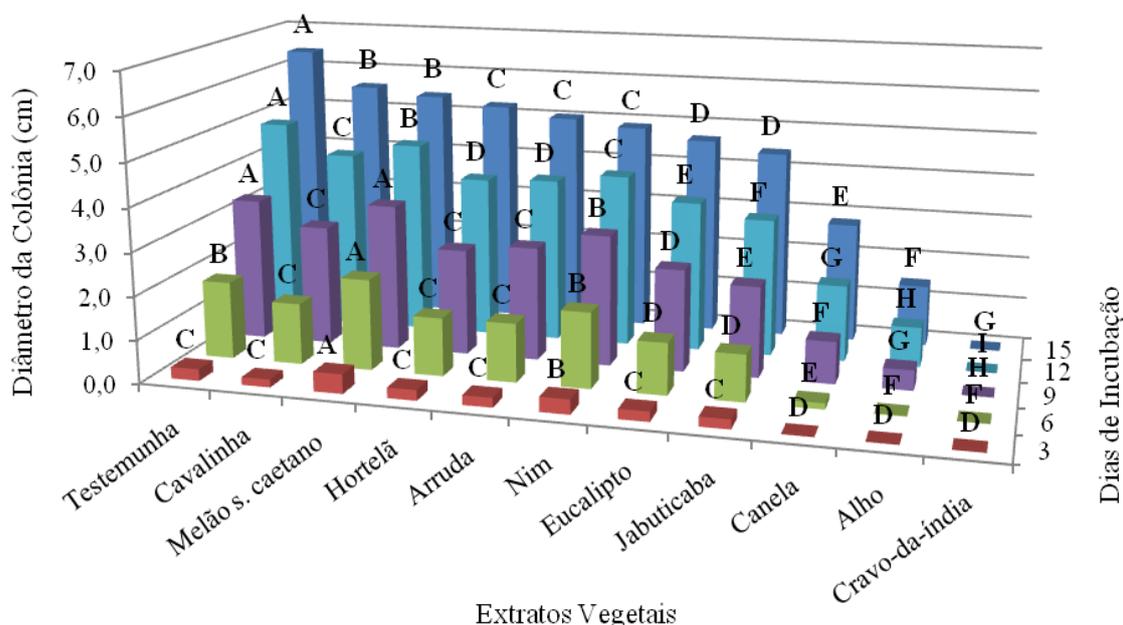


FIGURA 3. Crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Não foi verificado crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. aos quinze dias de incubação, quando este foi submetido ao extrato aquoso de cravo-da-índia. Trabalhando com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, Rozwalka et al. (2008) notaram que não houve crescimento micelial do fungo com a utilização do extrato aquoso de cravo na concentração de 10%.

O extrato de alho reduziu significativamente o crescimento micelial em relação aos demais tratamentos, enquanto que o meio de cultura contendo extrato de canela apresentou atividade antifúngica intermediária. Ribeiro e Bedendo (1999), avaliando o efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, verificaram que o extrato de alho apresentou propriedades fungitóxicas, inibindo o crescimento micelial do patógeno.

No ensaio realizado com *Fusarium solani* foi verificado em todos os dias de incubação maior crescimento do patógeno quando submetido ao extrato de nim, resultando em um crescimento micelial significativamente superior a testemunha. Este fato pode ter ocorrido devido à presença de subprodutos nas sementes da planta que estimularam o crescimento do fungo (Figura 4). Este favorecimento no crescimento de fitopatógenos também é relatado por Amaral e Bara (2005). Os autores constataram com a utilização da planta *Albizzia lebbek*, que *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii* tiveram seu crescimento micelial estimulado, pressupondo assim, a existência de alguma substância ativadora deste crescimento no extrato proveniente desta planta.

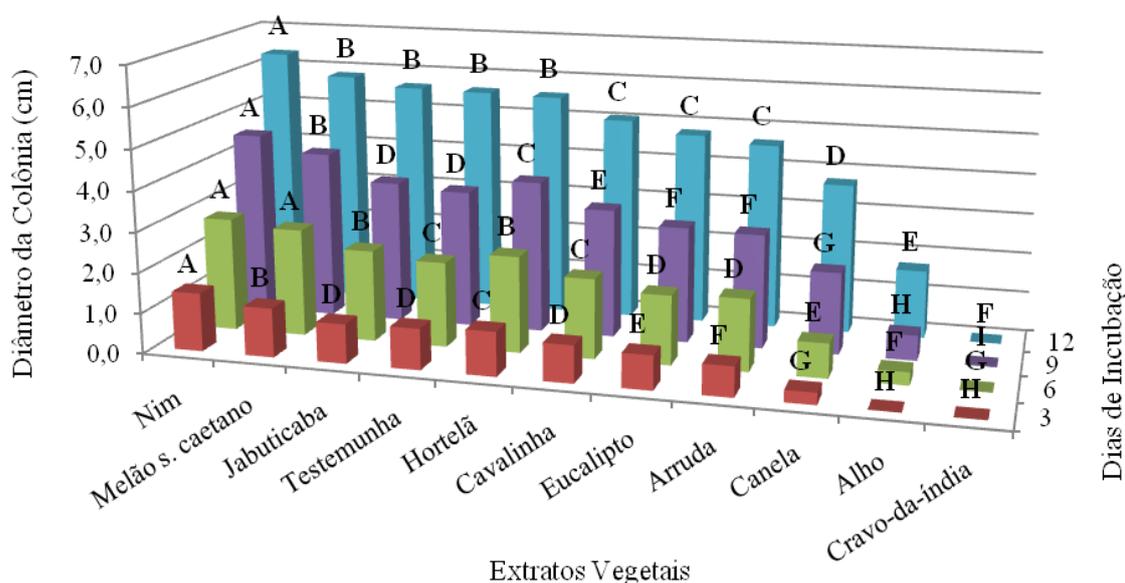


FIGURA 4. Crescimento micelial de *Fusarium solani* submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Não se verificou crescimento micelial de *F. solani* no terceiro dia de incubação, com a utilização dos extratos de alho e cravo-da-índia, sendo ambos superiores aos demais tratamentos. No entanto, apenas o extrato de cravo apresentou atividade fungistática em relação ao patógeno, ao final das avaliações. O extrato aquoso de alho permitiu ao fungo, pequeno crescimento micelial, sendo observado maior atividade antifúngica comparado aos demais extratos.

Pode ser verificada ainda, a presença de compostos com atividade antifúngica na utilização dos extratos de canela, arruda, eucalipto e cavalinha, sendo o primeiro superior aos demais. Para Fiori et al. (2000), os extratos de *Eucalyptus citriodora* e *Ageratum conyzoides* foram os mais eficientes em relação ao crescimento e esporulação de *Didymella bryoniae*. Já

Stangarlin et al. (1999) verificaram menor crescimento micelial de *Sclerotium rolfii* em presença do extrato aquoso de arruda e manjeriço.

Do mesmo modo que *Colletotrichum* sp., o fungo *Cercospora kikuchii* apresentou crescimento micelial lento no decorrer dos dias de incubação (Figura 5). Notou-se menor crescimento micelial de *C. kikuchii*, com a adição ao meio de cultura, dos extratos aquosos de cravo-da-índia, alho e canela. O extrato de cravo-da-índia suprimiu o crescimento do fungo, apresentando diferença significativa quando comparado aos demais extratos vegetais testados. Com a utilização do extrato de alho foi constatado crescimento da ordem de 0,72 cm, provocando diferenças em relação ao extrato de canela, onde o micélio fúngico alcançou 1,98 cm.

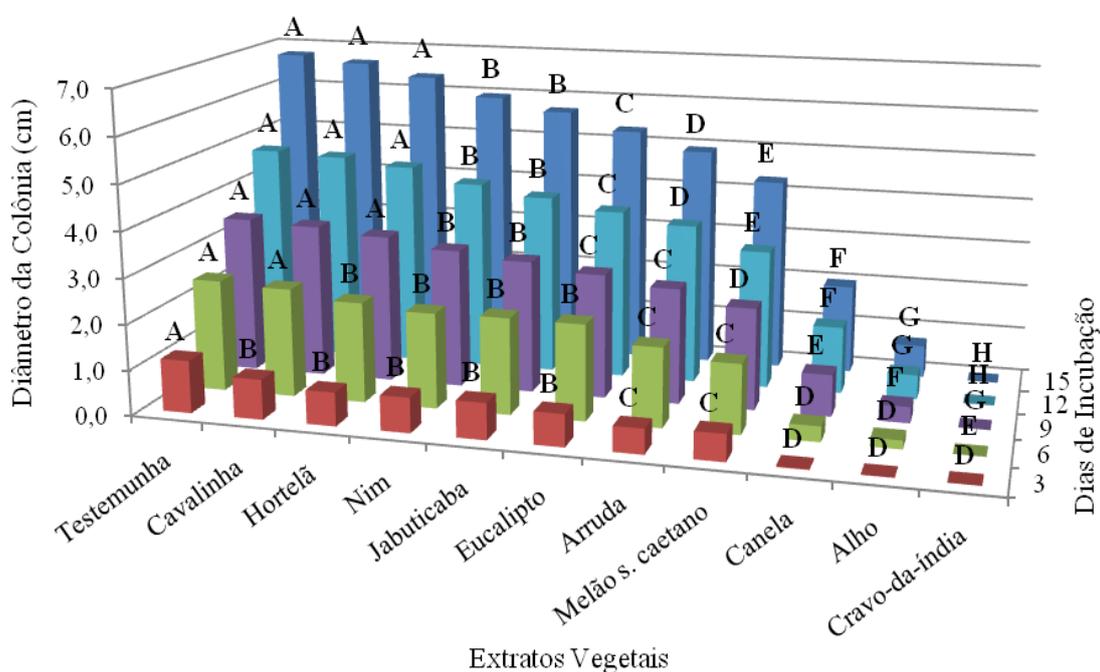


FIGURA 5. Crescimento micelial de *Cercospora kikuchii* submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Pode ser observado na Figura 6, que *Phomopsis* sp. apresentou um rápido crescimento micelial, finalizando as avaliações do bioensaio ao sexto dia de incubação. No terceiro dia de incubação pode ser constatado que todos os extratos vegetais apresentavam atividade antifúngica em relação à *Phomopsis* sp., não sendo observado crescimento do fungo com a utilização dos extratos de canela, alho e cravo-da-índia. Entretanto, ao final das análises não foram verificadas diferenças no desempenho dos extratos de jabuticaba, cavalinha, eucalipto e hortelã em relação ao tratamento controle.

Com a utilização do extrato aquoso de nim não foi observada efetiva atividade antifúngica sobre o patógeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Anandaraj e Leela (1996), em trabalhos com *Phytophthora capsici*. Govindachari et al. (1998) afirmam que o efeito do nim é variável e dependente do patógeno alvo. Os autores verificaram que a azadiractina, principal constituinte químico encontrado nas sementes, não interferiu no crescimento de *Drechslera oryzae*, *Fusarium oxysporum* e *Alternaria tenuis*. Já Bhutta et al. (1999), verificaram que o extrato de nim a 0,5 e 1% inibiu *in vitro* o crescimento de *Alternaria alternata* e *Macrophomina phaseolina*.

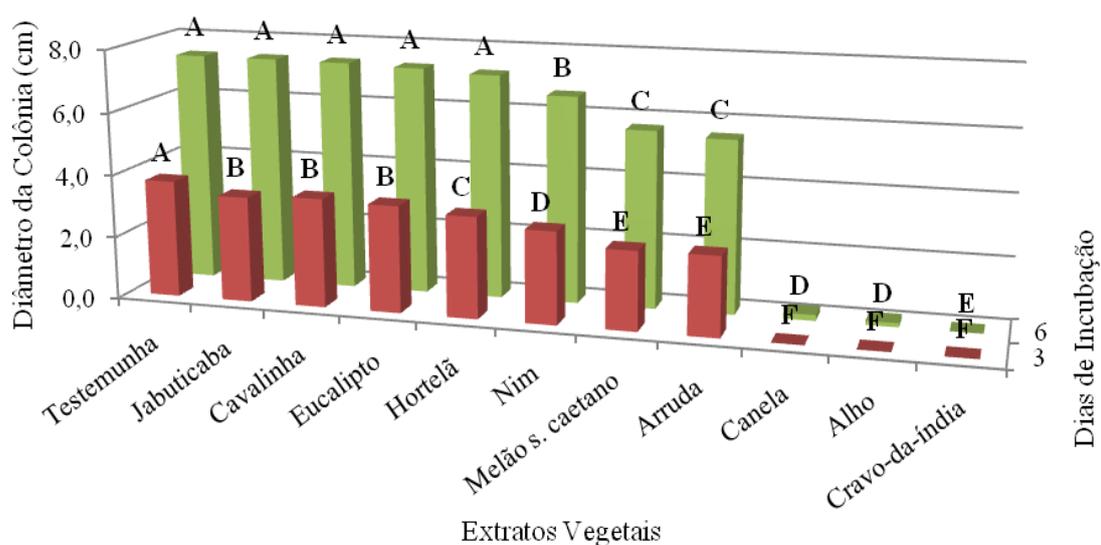


FIGURA 6. Crescimento micelial de *Phomopsis* sp. submetido a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5%.

Os extratos de melão de são caetano e arruda proporcionaram crescimento micelial intermediário ao patógeno. O menor desenvolvimento de *Phomopsis* sp. foi alcançado com o uso de cravo-da-índia, seguido dos extratos de alho e canela.

Com base no crescimento micelial dos fitopatógenos testados no estudo, foram evidenciadas em várias leituras, alterações na proporção do crescimento das colônias fúngicas com o decorrer do período de incubação, provocando em dados momentos maior ou menor crescimento do fungo. Pode-se citar como exemplo o extrato de jabuticaba com *Aspergillus* sp., o extrato de cavalinha com *Penicillium* sp., e o extrato de melão de são caetano com o fungo *Colletotrichum* sp. Este fato pode estar associado à presença de compostos que possuem tanto atividades antifúngicas, como também compostos que estimulam o crescimento dos patógenos. A quantidade e a longevidade destes compostos, assim como a

relação existente entre estes, podem resultar em determinados momentos, em maior ou menor inibição dos fitopatógenos. Resultados semelhantes são relatados por Krämer et al. (1984) e Rozwalka et al. (2008).

Não foi observado, com a utilização do extrato aquoso de cravo-da-índia, crescimento micelial de nenhum dos fitopatógenos estudados. No intuito de verificar se o extrato havia apresentado ação fungicida sobre os fungos, foram retirados os discos de micélio do meio de cultura contendo o cravo-da-índia e adicionados em BDA puro, sendo observado a partir do quinto e sexto dia de incubação que os fungos voltavam a crescer, evidenciando desta forma que o extrato de cravo apresentou atividade fungistática. No entanto, Amaral e Bara (2005) trataram sementes de arroz, feijão, soja e milho, acometidas de doenças fúngicas, com óleo de cravo-da-índia nas concentrações de 0,1 a 0,5%, e constataram, quando as sementes foram reincubadas em meio de cultura puro, que os patógenos não retornaram seu crescimento, evidenciando ação fungicida do óleo da planta.

Em relação à característica porcentagem de inibição do crescimento dos fitopatógenos, foi verificada inibição superior a 50% do crescimento micelial de todos os fungos quando se utilizou os extratos de cravo-da-índia e alho. O extrato de canela proporcionou inibição superior a 50% sobre *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Phomopsis* sp., evidenciando alta atividade antifúngica destes extratos aquosos (Quadro 1). Nota-se que o extrato realizado a partir de cravo-da-índia proporcionou em todos os bioensaios, 100% de inibição do crescimento micelial. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Roswalka et al. (2008), que constataram 100% de inibição do crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, quando estes foram submetidos ao extrato aquoso de cravo-da-índia.

Bilgrami et al. (1992) avaliaram a inibição do crescimento de *A. flavus*, e verificaram que a maior inibição no crescimento do fungo foi obtida quando se utilizou o extrato de alho (61,9%), obtendo resultados superiores quando comparado ao eugenol, composto este presente no cravo-da-índia.

Com exceção aos extratos de cravo, alho e canela, os demais extratos, apesar de evidenciarem atividade antifúngica, não apresentaram resultados satisfatórios. Pode-se citar o uso do extrato de melão de são de caetano, alcançando 36,6% de inibição para *C. kikuchii* e estimulando em 4,3% o crescimento de *F. solani*. Celoto et al. (2008) verificaram que dos 20 extratos avaliados somente aqueles provenientes de espirradeira, eucalipto e melão de são caetano obtiveram porcentagem de inibição superior a 50% no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*.

QUADRO 1. Inibição do crescimento (%) micelial de fitopatógenos submetidos a diferentes tratamentos com extratos vegetais. Dourados, MS, 2008.

Extratos Aquosos	Fungos Fitopatogênicos					
	<i>Aspergillus</i>	<i>C.kikuchii</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>F.solani</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phomopsis</i>
Cravo	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Alho	75,2 a	89,4 a	77,7 b	69,9 b	98,9 a	98,2 a
Canela	36,5 b	70,8 b	56,3 c	33,5 c	95,1 a	97,4 a
Hortelã	31,9 b	6,0 g	18,3 f	0,8 f	18,9 b	2,9 d
Arruda	17,9 c	27,5 d	21,5 e	17,5 d	10,5 c	25,3 b
Nim	12,2 c	12,1 f	24,0 e	-13,6g*	14,8 c	10,4 c
Eucalipto	9,2 c	21,7 e	27,5 d	14,6 d	24,5 b	1,4 e
Melão SC	8,3 c	36,6 c	15,4 f	- 4,3 g*	22,3 b	23,2 b
Jaboticaba	7,5 c	16,1 f	31,1 d	- 0,4 f*	15,6 b	0,1 e
Cavalinha	3,8 c	2,1 h	13,0 f	9,7 e	1,3 d	0,5 e
Testemunha	0,0 d	0,0 i	0,0 g	0,0 f	0,0 d	0,0 e
CV (%)	33,25	11,95	11,81	21,81	29,57	12,83

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Estímulo do crescimento micelial do patógeno.

O extrato aquoso de eucalipto utilizado nesta pesquisa foi realizado a partir de folhas da espécie *E. citriodora*, o que pode ter ocasionado baixa atividade antifúngica do extrato, pois Salgado et al. (2003), que testaram o potencial fungitóxico de *E. urophylla*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis*, verificaram maior ação fungitóxica de *E. urophylla*, atribuindo a este fato, a presença do composto globulol, inexistente nos demais.

Pode ser observado por meio da taxa de crescimento micelial, que *Phomopsis* sp. realmente é um patógeno de crescimento rápido, sendo que os demais fungos apresentaram no tratamento controle taxas de crescimento similares (Quadro 2). Destaca-se a ação dos extratos que permitiram aos patógenos taxa de crescimento igual ou inferior a 0,1 cm/dia, como constatado para o extrato de alho frente aos fungos *C. kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Phomopsis* sp., o extrato de canela com relação aos dois últimos e cravo-da-índia frente a todos patógenos testados.

QUADRO 2. Taxa de crescimento micelial (cm/dia) de fungos fitopatogênicos submetidos a diferentes extratos aquosos. Dourados, MS, 2008.

Extratos Aquosos	Fungos Fitopatogênicos					
	<i>Aspergillus</i>	<i>C.kikuchii</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>F.solani</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phomopsis</i>
Testemunha	0,49 a	0,45 a	0,43 a	0,47 b	0,44 a	1,23 a
Cavalinha	0,47 a	0,44 a	0,37 b	0,42 c	0,43 a	1,23 a
Jabuticaba	0,46 a	0,38 b	0,29 d	0,47 b	0,37 b	1,23 a
Eucalipto	0,45 a	0,35 c	0,31 d	0,40 c	0,33 b	1,21 a
Melão SC	0,45 a	0,29 e	0,36 b	0,49 b	0,34 b	0,95 c
Nim	0,43 a	0,40 b	0,32 c	0,53 a	0,38 b	1,11 b
Arruda	0,40 a	0,33 d	0,34 c	0,39 c	0,39 a	0,92 c
Hortelã	0,34 b	0,43 a	0,35 c	0,46 b	0,36 b	1,20 a
Canela	0,31 b	0,13 f	0,19 e	0,31 d	0,02 c	0,03 d
Alho	0,12 c	0,05 g	0,10 f	0,14 e	0,01 c	0,02 d
Cravo	0,00 d	0,00 h	0,00 g	0,00 f	0,00 c	0,00 d
CV (%)	2,53	0,92	1,30	1,20	2,16	1,27

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A efetividade da ação antifúngica sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos *in vitro*, evidenciou que os compostos presentes nas plantas utilizadas no estudo, na forma de extratos aquosos, apresentam-se como potenciais no controle alternativo dos fungos fitopatogênicos. Além dos resultados promissores verificados com os extratos de alho, canela e cravo-da-índia sobre todos os fitopatógenos, pode-se destacar também a atividade antifúngica de outros extratos frente a fungos específicos, como o extrato de hortelã sobre *Aspergillus* sp., os extratos de jabuticaba e eucalipto frente a *Colletotrichum* sp. e o extrato de melão de são caetano frente a *Cercospora kikuchii*.

1.4 CONCLUSÕES

O extrato de cravo-da-índia inibe completamente o desenvolvimento de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani*, *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp., sendo uma alternativa eficiente no controle *in vitro* dos fitopatógenos.

Os extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia apresentam alta atividade antifúngica sobre os fitopatógenos da soja.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.2, n.2, p.5-8, 2005. Suplemento.

ANANDARAJ, M.; LEELA, N. K. Toxic effect of some plant extracts on *Phytophthora capsici*, the root rot pathogen of black pepper. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.49, n.2, p. 181-184, 1996.

BELÉM, L. F. **Efeitos de fungicidas químicos e de produtos vegetais no desenvolvimento “in vitro” de fungos que afetam sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1997, 66p.

BENICIO, V.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F. M.; BENICIO, M. J.; FELISMINO, D. C. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.180-183, 2003.

BHUTTA, A. R.; BHATTI, M. H. R.; IFTIKHAR, A. Effect of seed diffusates on growth on seed-borne fungi of sunflower. **Helia**, Novi Sad, v.22, n.31, p.143-149, 1999.

BILGRAMI, K. S.; SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.96, p.171-175, 1992.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; GOMES, J. C. Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle da mancha angular do feijoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.3, p.6-10, 2008.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; GRICOLETTI JUNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste *in vivo*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.4, n.2, p.77-82, 2003.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista, 1996. p.109-127.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, p.483-487, 2000.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.

GOVINDACHARI, T. R.; SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHY, B.; MASILAMANI, S. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, New York, v.26, n.2, p.1-8, 1998.

KRÄMER, R. P.; HINDORF, H.; JAH H. C.; KALLAGE, J.; ZILLIKEN, F. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced derivatives. **Phytochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.2203-2205, 1984.

LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants against infection. **Plant Pathology**, Bangor, v.44, p.407-427, 1995.

MATOS, F. J. A. **As plantas da farmácia viva**. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, 1997. v.1, 57p.

OWOLADE, O. F.; AMUSA, A. N.; OSIKANLU, Y. O. Q. Efficacy of certain indigenous plant extracts against seed-borne infection of *Fusarium moniliforme* on maize (*Zea mays* L.) in south western Nigeria. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.28, p.323-327, 2000.

RANGEL, M. A. S.; GABRIEL, M.; SMIDERLE, O. J. Avaliação de substâncias alternativas para proteção de grãos de soja contra fungos. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS. **Anais...** Belém-PA, 2006.

RIBEIRO, L. F.; BEBENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999. Suplemento.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.123-127, 2006.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, C. M.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.2, p.249-254, 2003.

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

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTTO, V. J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.9, n.1, p.5-8, 1996.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.11, p.16-21, 1999.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.915-919, 2005.

WANG, S.; WANG, X.; LIU, J.; CAO, K. Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, Hebei, v.24, p.101-107, 2001.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Charleston, v.81, n.2, p.204-210, 1997.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES METODOLOGIAS DE ESTERILIZAÇÃO SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRATOS AQUOSOS

RESUMO: Foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados três experimentos com o objetivo de avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia, submetidos a diferentes processos de desinfestação e/ou esterilização sobre o desenvolvimento de *Fusarium solani*. O delineamento experimental utilizado para cada ensaio foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 8 repetições. Utilizaram-se os extratos aquosos na concentração de 20%, submetidos às metodologias de filtração (FI), banho maria a 65°C (BM), autoclavagem a 100°C (AT1), autoclavagem a 120°C (AT2) e a testemunha (somente BDA). Posteriormente os extratos foram incorporados em meio BDA, acondicionados em placas de Petri, onde foram transferidos discos de micélio de *F. solani* medindo 0,3 cm de diâmetro. Após, as placas foram incubadas a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Os tratamentos foram analisados em relação ao crescimento micelial da colônia, a porcentagem de inibição e a taxa de crescimento de *F. solani*. Foi observado em todos os ensaios maior crescimento do fungo na testemunha, evidenciando o potencial antifúngico dos extratos. Foi observada influência da metodologia de esterilização sobre a eficiência dos extratos de alho e canela. Para o alho a FI proporcionou os melhores resultados, enquanto que para o extrato de canela não houve diferenças entre as metodologias FI, BM e TI. As diferentes metodologias utilizadas não interferiram na eficiência do extrato aquoso de cravo-da-índia.

Termos para indexação: *Fusarium solani*, plantas medicinais e controle alternativo.

INFLUENCE OF DIFFERENT STERILIZATION METHODS ON THE EFFICIENCY OF AQUEOUS EXTRACT

ABSTRACT: Were conducted in the Laboratory of Phytopathology of Federal University of Grande Dourados, three experiments with aim of evaluate *in vitro* the antifungal activity of aqueous extracts of garlic, cinnamon and clove, submitted to different process of disinfection and/or sterilization on the development of *Fusarium solani*. The experimental design for each trial was completely randomized, with 5 treatments and 8 replicates. Using the aqueous extracts at a concentration of 20%, submitted to methods of filtering (FI), bain marie at 65°C (BM), autoclaving at 100°C (AT1), autoclaving at 120°C (AT2) and the treatment control (only PDA). Subsequently the extracts were incorporated in PDA medium, added in Petri dishes, where discs of mycelium *F. solani* from 0.3 cm of diameter were transferred. After the plates were incubated at 25°C with photoperiod of 12 hours. The treatments were analyzed in relation to mycelial growth of the colony, the percentage of inhibition and growth rate of *F. solani*. Was observed in all trials increased growth of the fungus in the treatment control, demonstrating the antifungal potential of extracts. It was observed influence of sterilization method on the efficiency of extracts of garlic and cinnamon. For the garlic the FI provided the best results, whereas for the extract of cinnamon no differences between the methodologies FI, BM and TI. The different methods used did not interfere in the efficiency of the aqueous extract of clove.

Index terms: *Fusarium solani*, medicinal plant, alternative control

2.1 INTRODUÇÃO

O controle das doenças na agricultura tem se intensificado, sendo realizado basicamente através do emprego de produtos sintéticos. Quando estes produtos são utilizados de maneira racional, podem-se obter resultados satisfatórios. Entretanto, sua adoção indiscriminada tem ocasionado problemas de contaminação humana e ambiental, e tem provocado a seleção de patógenos resistentes a esses produtos químicos (GHINI e KIMATI, 2000). A busca de substitutos para estes produtos encontra nas plantas uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor (SOUZA et al., 2007).

Na natureza, há uma grande quantidade de plantas que se apresentam resistentes a diferentes patógenos, e essa resistência pode estar relacionada à existência de propriedades fungicidas naturalmente produzidas por elas (LEMOS et al., 1990). Existe uma grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais que foram isolados e identificados em relação a sua estrutura química, porém, ainda não foram estudadas quanto às suas atividades biológicas. O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora e/ou antimicrobiana poderá contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doenças de plantas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que óleos essenciais e extratos aquosos obtidos de algumas espécies vegetais têm se mostrado eficientes no controle de doenças de plantas, tanto por sua ação fungitóxica direta, como indiretamente, por meio da indução de resistência às culturas tratadas (STANGARLIN et al., 1999). Como exemplos tem-se o controle da mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana*) em trigo usando extrato aquoso de *Artemisia camphorata* (FRANZENER et al., 2003), do oídio (*Oidium lycopersici*) do tomateiro pelo óleo emulsionável de *Azadirachta indica* (CARNEIRO, 2003), da requeima (*Phytophthora infestans*) da batata pelo extrato de *Equisetum* sp. (KE-QIANG e BRUGGEN, 2001), da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em pepino pelo extrato de *Eucalyptus citriodora* (BONALDO et al., 2004).

Os eficientes resultados constatados com a utilização de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos têm enquadrado esta prática como promissora dentre os controles alternativos utilizados. Porém, para que os extratos vegetais possam agir de forma mais eficiente é necessário conhecer o modo de ação dos seus princípios ativos. Rodrigues et al. (2006), trabalhando com a planta *Ocimum gratissimum*, verificaram que o extrato bruto

aquoso quando autoclavado induziu maior inibição do crescimento micelial em todas as concentrações utilizadas comparado ao extrato bruto esterilizado por filtração, e afirmaram que o princípio ativo da planta não seria termosensível. Os autores destacam ainda que na concentração de 50%, o extrato bruto autoclavado proporcionou inibição de 100% do crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*. Já Ribeiro e Bedendo (1999) verificaram que o extrato de alho esterilizado através de filtração em filtro bacteriológico apresentou atividade antifúngica, contrariamente ao extrato autoclavado que perdeu esta característica durante a esterilização, evidenciando que o princípio ativo envolvido apresenta termosensibilidade.

A exposição de extratos vegetais a altas temperaturas têm indicado que a esterilização por meio de autoclavagem a 120°C seria a metodologia que tem proporcionado maiores alterações nos compostos secundários das plantas. Franzener et al. (2003) verificaram que o efeito antifúngico direto do extrato aquoso de cânfora sobre a germinação de esporos foi grandemente afetado quando o extrato foi autoclavado, pois o mesmo não inibiu a germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana*, indicando, possivelmente, a presença de um composto fungitóxico termolábil. Celoto et al. (2008) observaram que os extratos submetidos à autoclavagem, independentemente de serem aquosos ou hidroetanólicos, apresentaram menor atividade antifúngica, indicando que as condições de autoclavagem alteram a substância antifúngica dos mesmos.

A diversidade de substâncias ativas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo extratos vegetais, tendo em vista o controle *in vitro* de fitopatógenos. Entretanto, existe a necessidade da pesquisa detectar essas substâncias e também a melhor metodologia na obtenção dos extratos, de modo a otimizar o efeito dessas propriedades.

Na literatura existem muitos trabalhos que avaliam o uso de extratos vegetais obtidos por meio de filtração e autoclavagem a 120°C, no entanto, quando se considera os aspectos térmicos há grande amplitude nessas metodologias, tornando-se de suma importância analisar com mais detalhes o efeito destas metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica dos extratos vegetais. Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* a eficiência dos extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia, submetidos a diferentes processos de desinfestação e/ou esterilização sobre o desenvolvimento de *Fusarium solani*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de março a junho de 2008.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 8 repetições, para cada ensaio. Os tratamentos constaram das metodologias de esterilização: filtragem (FI) em papel wathman nº 1, banho maria a 65°C, por um período de 1 hora (BM), autoclavagem a 100°C (AT1) e autoclavagem a 120°C (AT2), ambos durante 20 minutos, e a testemunha, onde utilizou-se somente o meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA).

As plantas medicinais foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFGD e em produtores locais, no mês de março. Para obtenção dos extratos aquosos, foram coletados 20 g do material vegetal, bulbos de alho (*Allium sativum*), casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e botão floral de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), e triturados em liquidificador com 100 ml de água destilada. Para cada extrato aquoso, foi conduzido um ensaio experimental.

Posteriormente à sua obtenção, os extratos aquosos foram submetidos às metodologias de esterilização. Em seguida foram incorporados em meio BDA fundente, de modo a obter uma concentração de 20%, e acondicionados em placas de Petri. No tratamento testemunha havia apenas o meio BDA. Uma hora após ser vertido o meio de cultura, foram transferidos no centro das placas, discos de micélio de *Fusarium solani* medindo 0,3 cm de diâmetro, a partir de colônias puras com 7 dias de idade. O isolado fúngico foi obtido junto à Embrapa Soja.

As placas de Petri foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Analisaram-se as variáveis, crescimento micelial, porcentagem de inibição do crescimento e taxa de crescimento micelial.

Para avaliação do crescimento micelial das colônias fúngicas foram realizadas medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada uma média. As leituras foram realizadas a cada quatro dias, perdurando até o momento em que as colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999). A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos fitopatógenos foi obtida por meio da fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada extrato em relação a testemunha. A taxa de crescimento dos

fitopatógenos foi mensurada conforme Benício et al. (2003), onde os dados foram plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) o dia final da incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial da colônia e (b) a taxa de crescimento micelial, determinada pelo coeficiente de regressão.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado em todos os dias de incubação maior crescimento de *Fusarium solani* no tratamento controle, evidenciando o potencial antifúngico do extrato de alho. O crescimento micelial do patógeno foi influenciado pela metodologia de esterilização a que o extrato foi submetido, logo na primeira leitura, verificando atividade antifúngica significativamente superior do extrato de alho FI e BM (Figura 1).

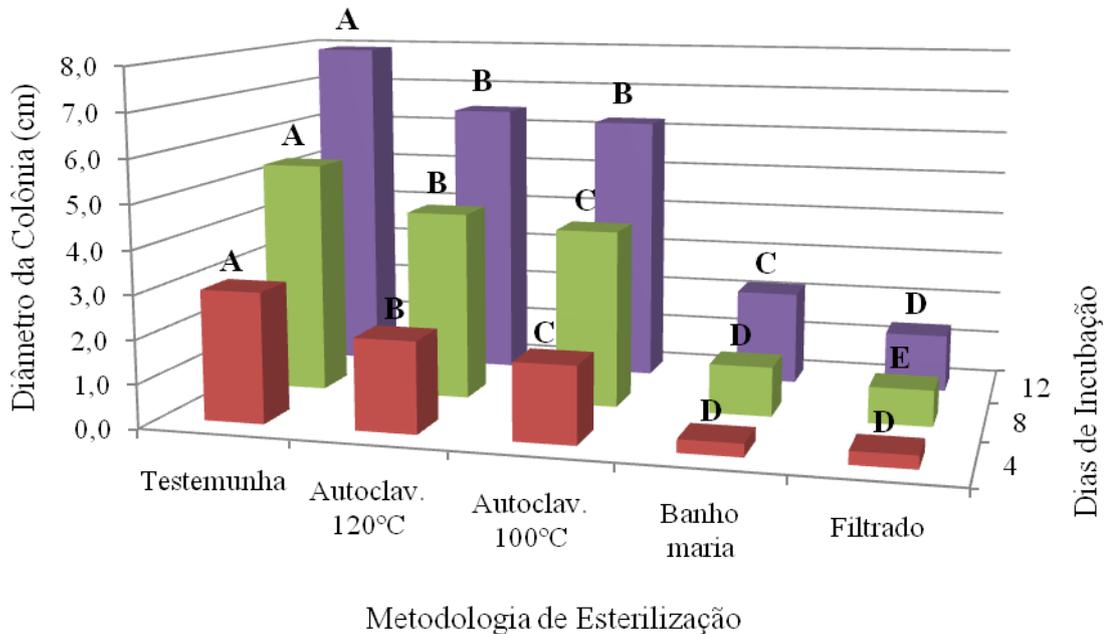


FIGURA 1. Crescimento micelial de *Fusarium solani*, submetido ao extrato aquoso de alho realizado a partir de diferentes metodologias de esterilização. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No decorrer do período de incubação dos tratamentos, foi constatado a partir do oitavo dia, que o extrato aquoso de alho submetido à metodologia FI, proporcionou o menor crescimento de *F. solani*, seguido pelos tratamentos BM, AT1 e AT2. Fato que vem a evidenciar menor influência da filtragem sobre os princípios antifúngicos do extrato. O tratamento BM apresentou menor crescimento comparado às metodologias AT1 e AT2, porém, quando comparado com o extrato FI, resultou em maior crescimento do patógeno a partir da segunda leitura.

Resultados semelhantes foram relatados por Ribeiro e Bedendo (1999), que avaliando o efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, observaram que o extrato de alho perde sua atividade antifúngica, antes constatada com o

extrato filtrado, quando esterilizado por meio de autoclavagem. Concluíram os autores que o princípio ativo da planta seria termosensível. Os resultados obtidos por Roswalka et al. (2008), que avaliaram o efeito fungitóxico de vinte plantas, evidenciaram a existência de compostos biologicamente ativos nestas plantas, entretanto, foi verificado que os extratos quando submetidos à decocção proporcionaram a *Glomerella cingulata* maior crescimento micelial. Bonaldo et al. (2004), em seus resultados, verificaram comportamento diferenciado em relação àqueles constatados no ensaio com extrato aquoso de alho, pois os autores observaram que o extrato de *Eucalyptus citriodora* quando autoclavado proporcionou maior atividade antifúngica, inibindo em 90% a germinação de esporos, quando comparado ao extrato filtrado, no qual foi relatada máxima inibição de 75%.

A possibilidade de existirem compostos secundários de plantas que se apresentem termosensíveis é reforçada por Franzener et al. (2003). Os autores avaliaram a atividade antifúngica do extrato de cânfora, e constataram que o extrato autoclavado não inibiu a germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana*.

No ensaio realizado com extrato aquoso de canela foi observado crescimento micelial de *Fusarium solani* em todos os tratamentos estudados, porém com diferenças em relação ao diâmetro das colônias, verificado em função das metodologias de esterilização a que os extratos foram submetidos (Figura 2).

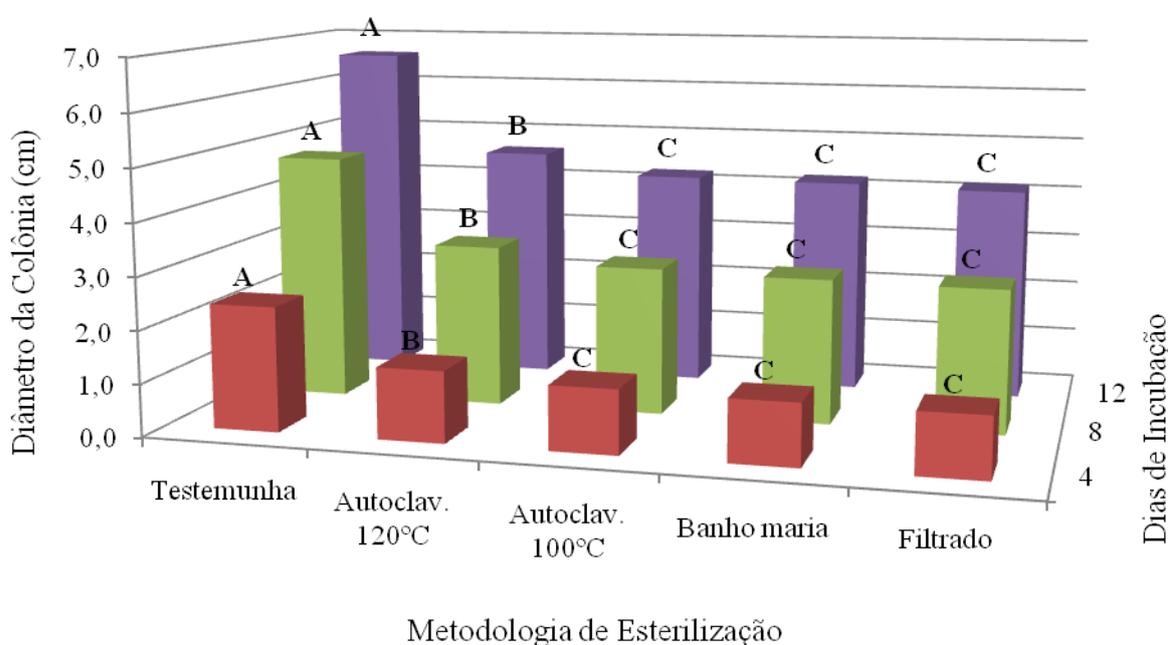


FIGURA 2. Crescimento micelial de *Fusarium solani*, submetido ao extrato aquoso de canela realizado a partir de diferentes metodologias de esterilização. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se na Figura 2, em todas as leituras realizadas durante o período de incubação, o mesmo comportamento no crescimento micelial de *F. solani* frente às metodologias de esterilização a que o extrato de canela foi submetido. Foi observado maior crescimento micelial do fungo no tratamento controle, sendo verificado dentre as metodologias de esterilização do extrato aquoso, menor atividade antifúngica quando autoclavado a 120°C, em relação às demais metodologias utilizadas. O extrato aquoso quando FI, BM e AT1 resultaram em menor crescimento do patógeno, 4,13, 4,19 e 4,21 cm, respectivamente, apresentando valores semelhantes entre si.

As metodologias de esterilização utilizadas no ensaio com extrato aquoso de cravo-da-índia não influenciaram a atividade antifúngica do mesmo, como foi observado nos ensaios com os extratos de alho e canela (Figura 3). Com a utilização do extrato aquoso de cravo-da-índia não foi observado crescimento micelial de *F. solani*, perante as metodologias testadas, no período de incubação estudado. Observa-se, que apenas no tratamento testemunha o fungo apresentou crescimento, evidenciando maior atividade antifúngica e maior estabilidade dos princípios ativos do cravo, em relação às demais plantas estudadas.

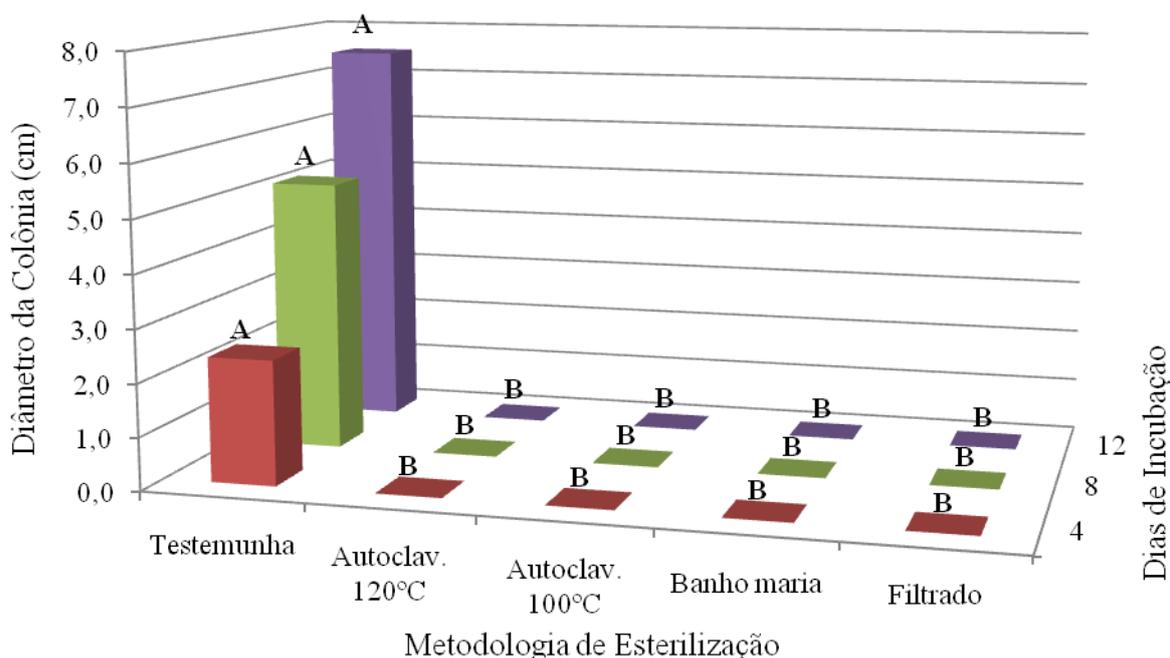


FIGURA 3. Crescimento micelial de *Fusarium solani*, submetido ao extrato aquoso de cravo-da-índia realizado a partir de diferentes metodologias de esterilização. Dourados - MS, 2008. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Rodrigues et al. (2006), em seu trabalho com a planta *Ocimum gratissimum*, além de não observarem efeitos negativos da autoclavagem, verificaram ainda, que o extrato bruto quando submetido a esta metodologia de esterilização foi mais eficiente na redução do crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*, comparado ao extrato bruto esterilizado por meio de filtragem. Segundo os autores o aumento nas concentrações do extrato bruto aquoso, aliado à temperatura de autoclavagem (121°C), podem ter ativado ou transformado algum composto do metabolismo secundário da planta, otimizando sua ação fungicida e/ou fungitóxica.

O extrato de cravo-da-índia proporcionou total inibição no crescimento de *F. solani*, em todas as metodologias a que o mesmo foi submetido (Quadro 1). Evidenciando que o extrato desta planta pode ser submetido aos diferentes métodos, sem que o mesmo perca seu potencial fungistático no controle *in vitro* do patógeno.

QUADRO 1. Inibição do crescimento (%) micelial de *F. solani* submetido a extratos vegetais realizado por diferentes metodologias de esterilização. Dourados, MS, 2008.

Metodologias de Esterilização	Extratos Vegetais		
	Alho	Canela	Cravo-da-índia
Filtragem	86,5 a	37,5 a	100,0 a
Banho maria	75,4 b	36,5 a	100,0 a
Autoclavagem a 100°C	22,1 c	36,3 a	100,0 a
Autoclavagem a 120°C	19,3 d	30,3 b	100,0 a
Testemunha	0,0 e	0,0 c	0,0 b
CV (%)	3,66	3,30	0,00

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As menores porcentagens de inibição foram observadas com a utilização dos extratos aquosos de alho e canela submetidos à esterilização por meio de autoclavagem a 120°C, verificando inibição de 19,3 e 30,3%, respectivamente. Analisando as porcentagens obtidas pelos extratos aquosos quando se adotou a metodologia FI, pode-se afirmar que os princípios ativos encontrados no alho apresentam menor estabilidade frente às variações de temperaturas, que envolvem a obtenção do extrato.

Com a utilização do extrato aquoso de alho foi verificada uma relação inversamente proporcional, onde conforme se aumentava a temperatura nas metodologias de

esterilização, menores porcentagens de inibição do crescimento de *F. solani* eram obtidas. Observou-se um incremento na inibição do fungo de mais de 67%, com a utilização do extrato FI em comparação ao extrato AT2.

O extrato aquoso de canela apresentou pequena variação na porcentagem de inibição de *F. solani*, não sendo constatadas diferenças significativas entre as metodologias FI, BM e AT1. Porém, quando se adotou a metodologia AT2 notou-se que a atividade antifúngica do extrato passa a apresentar ligeira influência, ocasionando inibição inferior às demais metodologias.

Avaliando a atividade antifúngica de extratos vegetais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, Celoto et al. (2008) verificaram com a utilização da metodologia de esterilização por meio de autoclavagem, que dos vinte extratos aquosos testados, apenas cinco deles (bucha, espirradeira, eucalipto, mentrasto e unha-de-vaca), proporcionaram porcentagem de inibição significativamente superiores aos extratos filtrados. Estes resultados salientam a importância de se conhecer a metodologia que proporcione aos compostos secundários das plantas maiores fungitoxidade, contribuindo na busca por técnicas que possam ser testadas no controle de doenças *in vivo*.

A taxa de crescimento micelial de *F. solani* apresentou diferenças significativas, decorrentes das diferentes metodologias de esterilização utilizadas na obtenção dos extratos aquosos de alho e canela. Não foi verificado crescimento do fungo na presença do extrato aquoso de cravo-da-índia (Quadro 2).

QUADRO 2. Taxa de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) de *Fusarium solani* submetido ao tratamento com extratos vegetais realizado por diferentes metodologias de esterilização. Dourados, MS, 2008.

Metodologias de Esterilização	Extratos Aquosos		
	Alho	Canela	Cravo-da-índia
Testemunha	0,64 a	0,55 a	0,62 a
Autoclavagem a 120°C	0,51 b	0,38 b	0,00 b
Autoclavagem a 100°C	0,50 b	0,35 c	0,00 b
Banho maria	0,16 c	0,35 c	0,00 b
Filtragem	0,09 d	0,34 c	0,00 b
CV (%)	0,93	0,46	0,09

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A variabilidade observada na taxa de crescimento de *F. solani* dentro de cada extrato aquoso utilizado, em função da metodologia de esterilização, reflete com clareza a importância da pesquisa no que se refere a encontrar alternativas práticas, que possam aumentar a eficácia dos extratos vegetais no controle de fitopatógenos.

A maior variação relatada na taxa de crescimento micelial em função das metodologias de esterilização foi observada com o uso do extrato aquoso de alho, onde o fungo de 0,64 cm ao dia, no tratamento controle, passou a apresentar um crescimento de apenas 0,09 cm/dia quando o extrato foi filtrado, sendo considerada uma baixa taxa de crescimento.

A taxa de crescimento micelial de *F. solani* verificada quando o mesmo foi submetido ao extrato aquoso de canela, independente da metodologia de esterilização adotada, não representou uma elevada redução em relação ao tratamento controle. Entretanto, vale salientar que de acordo com Ming (1994) a utilização de uma planta medicinal é tão complexa quanto a sua própria composição, pois, do cultivo à comercialização, alterações consideráveis podem ocorrer, comprometendo a qualidade e a quantidade dos princípios ativos. Di Stasi (1996) afirma ainda que a concentração de princípios ativos não se apresenta uniforme no decorrer do ciclo da planta, podendo apresentar variações conforme as condições de cultivo, a colheita e o processamento do material vegetal.

2.4 CONCLUSÕES

Independente da metodologia de esterilização utilizada o extrato aquoso de cravo-da-índia suprime completamente o desenvolvimento de *Fusarium solani*.

A atividade antifúngica do extrato aquoso de alho é influenciada negativamente pelo aumento da temperatura das metodologias de esterilização, evidenciando que o princípio ativo desta planta apresenta termosensibilidade.

As propriedades antifúngicas do extrato aquoso de canela apresentam-se termosensíveis quando esterilizado por autoclavagem a 120°C.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENICIO, V.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F. M.; BENICIO, M. J.; FELISMINO, D. C. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.180-183, 2003.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.128-134, 2004.
- CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.3, p.262-265, 2003.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista, 1996. 215p.
- FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
- KE-QIANG, C.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, Hebei, v.24, p.108-116, 2001.
- LEMONS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; Mc CHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytotherapy Research**, Chichester, v.4, n.2, p.82-84, 1990.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.1, p.2-9, 1994.
- RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999. Suplemento.
- RODRIGUES, E. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.2, p.213-220, 2006.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

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

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.11, p.16-21, 1999.

CAPÍTULO III

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FITOPATÓGENOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS

RESUMO: Com o objetivo de avaliar *in vitro* o efeito de diferentes concentrações de extratos vegetais sobre o crescimento de *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp., foram conduzidos quatro bioensaios experimentais, no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 6, com 8 repetições para cada bioensaio. Foram utilizados extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia, nas concentrações de 0; 0,5; 1; 5; 10 e 20%. Para obtenção dos extratos foram coletadas 30 g do material vegetal e trituradas em 120 ml de água destilada. Os extratos foram filtrados em papel wathman nº 1 e incorporados em meio BDA, de modo a obter as concentrações desejadas. Posteriormente, a solução foi vertida em placas de Petri, onde foram transferidos discos de micélio do patógeno, de 0,3 cm de diâmetro. Após, as placas foram incubadas a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Foi analisado o crescimento micelial da colônia fúngica e a porcentagem de inibição do crescimento micelial. Os resultados revelaram que o efeito dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos foi dependente das concentrações utilizadas. Constatou-se maior atividade antifúngica conforme se aumentava a concentração dos extratos aquosos. Foi verificado, com o uso do extrato de cravo-da-índia, maior efeito sobre os fitopatógenos.

Termos para indexação: controle alternativo, propriedades antifúngicas e extrato de canela.

INHIBITION OF GROWTH *IN VITRO* OF PHYTOPATHOGENS UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF EXTRACT OF MEDICINAL PLANTS

ABSTRACT: In order to evaluate *in vitro* the effect of different concentrations of plant extracts on growth of *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp. and *Phomopsis* sp., were conducted four bioassays experiments, in the Laboratory of Phytopathology of Federal University of Grande Dourados. Was adopted a completely randomized design in factorial arrangement 3 x 6, with 8 replicates for each bioassay. Were used aqueous extracts of garlic, cinnamon and clove, in concentrations of 0, 0.5, 1, 5, 10 and 20%. To obtain the extracts were collected 30 g of plant material and shredded in 120 ml of distilled water. The extracts were filtered in paper wathman 1 and incorporated into PDA medium to obtain the desired concentrations. Subsequently, the solution was poured in Petri dishes, which were transferred from discs of the pathogen mycelium, 0.3 cm in diameter. After the plates were incubated at 25°C with photoperiod of 12 hours. Was analyzed the growth of mycelial fungal colony and the percentage of inhibition of mycelial growth. The results showed that the effect of plant extracts on the development of the plant was dependent on the concentrations used. It was higher antifungal activity increased as the concentration of aqueous extracts. The extract from clove, provided the most effect on the plant pathogens.

Index terms: alternative control, antifungal activity, cinnamon extract.

3.1 INTRODUÇÃO

O método mais utilizado para a proteção de plantas contra seus patógenos é o uso de resistência genética (LYON et al., 1995). Porém, nem todas as plantas são resistentes aos patógenos, e nem todo material resistente é adaptado às diferentes regiões. Dessa forma, o uso de agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais freqüente na agricultura (MOTOYAMA et al., 2003). Esta prática de proteção de plantas contra fitopatógenos apresenta-se como uma alternativa bastante atraente pela sua simplicidade e resultados satisfatórios em curto prazo. Entretanto, os aspectos positivos desse sistema são suprimidos com o passar do tempo e uma sucessão de desvantagens pode ocorrer como o acúmulo de substâncias nocivas no solo e água, com conseqüente contaminação do ambiente e do próprio homem, a ocorrência de microrganismos resistentes, e o desequilíbrio ambiental pela falta de seletividade dos produtos utilizados (TALAMINI e STADNIK, 2004).

Nesse enfoque, uma nova política agrícola através da agricultura alternativa tem sido desenvolvida, voltada à minimização desses impactos no ambiente e ao homem por meio do controle alternativo de doenças de plantas, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991) e o uso de produtos alternativos ao controle químico, como extratos e óleos vegetais, sejam por sua ação fungitóxica direta, ou indiretamente por meio da ativação de mecanismos de defesa nas culturas tratadas.

Uma espécie de planta largamente utilizada e estudada, com resultados promissores é o alho (*Allium sativum*). A planta contém duas substâncias, aliinase e aliína, armazenadas separadamente, e quando suas membranas são rompidas formam a alicina, responsável pela defesa da planta. Seus efeitos tóxicos inativam os microrganismos (HEINZMANN, 2001). De acordo com Ranasinghe et al. (2002), o cravo-da-índia e a canela também apresentam propriedades fungitóxicas. Os autores afirmam que o eugenol presente no cravo-da-índia pode ser o componente tóxico, tanto no extrato aquoso quanto no óleo essencial. Já a casca de canela, tem como principal constituinte antimicrobiano o cinamaldeído.

Tem-se constatado com freqüência a ocorrência de diferenças na inibição do desenvolvimento dos fitopatógenos frente às diferentes concentrações testadas. De modo geral, verifica-se uma tendência de que quanto maior a concentração de extrato vegetal no meio de cultura, maior o efeito deste extrato no sentido de inibir o crescimento micelial dos fungos. Motoyama et al. (2003), em trabalhos com extratos cítricos, observaram inibição do crescimento micelial de *Fusarium semitectum* a partir da concentração de 100 ppm,

entretanto, a máxima inibição foi verificada com a utilização da maior concentração, 5.000 ppm (48,18%). Barros et al. (1995), em experimentos com os fungos dos gêneros *Curvularia* e *Alternaria*, verificaram maior inibição do desenvolvimento das colônias fúngicas, com a utilização do extrato de alho na concentração de 10.000 ppm, quando comparado à concentração de 1.000 ppm.

Em outras ocasiões, experimentos têm demonstrado que com a utilização de alguns extratos vegetais podem-se obter resultados satisfatórios na inibição de patógenos, mesmo nas menores concentrações. Rodrigues et al. (2006), avaliando o potencial da planta *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana*, verificaram que tanto o extrato esterilizado por meio de filtração, como o autoclavado, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 50% e 10, 15, 20 e 50%, respectivamente, proporcionaram semelhantes porcentagens de inibição do crescimento micelial do patógeno.

Tendo em vista a propriedade inibitória de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito de diferentes concentrações dos extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia sobre o crescimento de *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de julho a novembro de 2008.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 6, com 8 repetições para cada bioensaio. Foram utilizados os extratos aquosos de alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), nas concentrações de 0; 0,5; 1; 5; 10 e 20%. Para realização de cada bioensaio foram utilizados os respectivos fungos: *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp., fornecidos pela Embrapa Soja.

As plantas medicinais foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFGD e em produtores locais, no mês de julho. Os extratos aquosos foram obtidos por meio da coleta de 30 g do material vegetal, neste caso, bulbos de alho, casca de canela e botão floral de cravo-da-índia, e triturados em liquidificador com 120 ml de água destilada. Os extratos foram utilizados no mesmo dia de sua realização.

A solução obtida após a trituração foi filtrada em papel wathman nº 1 e recolhida em erlenmeyer devidamente identificado. O meio de cultura utilizado nos bioensaios experimentais foi Batata-Dextrose-Agar (BDA) fundente, homogeneizando-se, após a filtragem, a quantidade do extrato aquoso de modo a se obter o meio de cultura com as diferentes concentrações dos produtos a serem avaliados.

O meio homogeneizado foi vertido em placas de Petri, e depois de sua solidificação, efetuou-se a repicagem de um disco micelial de 0,3 cm de diâmetro dos fitopatógenos, retirados de colônias puras com sete dias de idade, no centro da superfície do meio de cultura com os respectivos tratamentos. Posteriormente, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. As leituras foram realizadas a cada três dias, perdurando até o momento que as colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999).

Para avaliação dos tratamentos foram analisados o crescimento micelial e a porcentagem de inibição do crescimento. Para obtenção do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados, as placas foram riscadas em sentido perpendicular, no intuito de mensurar o crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada uma média por placa.

A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da colônia fúngica foi mensurada por meio da fórmula: $PIC = [(diâmetro\ da\ testemunha - diâmetro\ do\ tratamento) / diâmetro\ da\ testemunha] \times 100$, para cada extrato em relação a testemunha.

Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, e submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR. Verificando-se interação significativa entre os fatores, procederam-se os necessários desdobramentos, sendo realizada, para os extratos vegetais, comparação entre as médias por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade, e para as concentrações análise de regressão.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância revelaram interação significativa entre os fatores, extratos vegetais x concentrações, sendo observado que o efeito dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos foi dependente das concentrações utilizadas.

Nota-se na Figura 1, que o extrato aquoso de cravo-da-índia apresentou uma redução no diâmetro da colônia de *Colletotrichum* sp. logo a partir da menor concentração. Por meio da função pode-se verificar com a utilização de concentrações superiores a 7,4%, a total supressão do crescimento micelial do fungo.

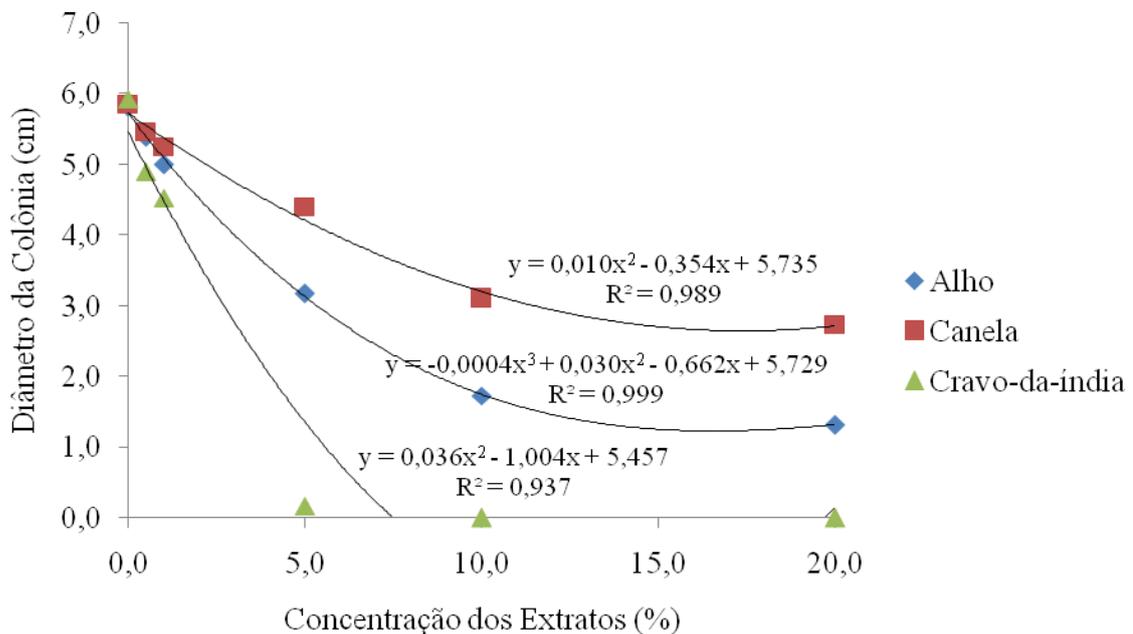


FIGURA 1. Crescimento micelial (cm) de *Colletotrichum* sp. sob influência de diferentes concentrações de extratos aquosos. Dourados, MS, 2008.

O efeito no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. submetido ao meio de cultura com adição dos extratos aquosos de alho e canela apresentaram respostas semelhantes com o aumento das concentrações utilizadas, verificando-se menor diâmetro da colônia fúngica nas maiores concentrações. Constatase, no entanto, uma redução mais expressiva no crescimento do patógeno quando submetido ao tratamento com extrato de alho. Cunico et al. (2006), avaliando a atividade antifúngica de extratos de *Ottonia martiana*, verificaram que os extratos provenientes de caule e de folhas frescas nas concentrações de 12,5, 25 e 50% não resultaram em menor crescimento de *Colletotrichum acutatum*, entretanto, quando obteve-se os extratos a partir de raízes verificou-se menor crescimento do fungo, nas maiores concentrações.

O extrato aquoso de canela promoveu uma redução linear sobre o diâmetro da colônia de *Cercospora kikuchii*, com o aumento das concentrações utilizadas (Figura 2). Os extratos aquosos de alho e cravo-da-índia apresentaram comportamento semelhante quanto à redução do crescimento micelial do patógeno. Ambos os extratos reduziram de forma mais efetiva o crescimento de *C. kikuchii*, em relação ao extrato proveniente da casca de canela. Por meio do modelo de regressão encontrado para os extratos, estima-se que concentrações superiores a 7,5% para o extrato de cravo-da-índia e 9,7% para o extrato de alho, possibilitariam efetivo controle sobre o crescimento micelial do patógeno.

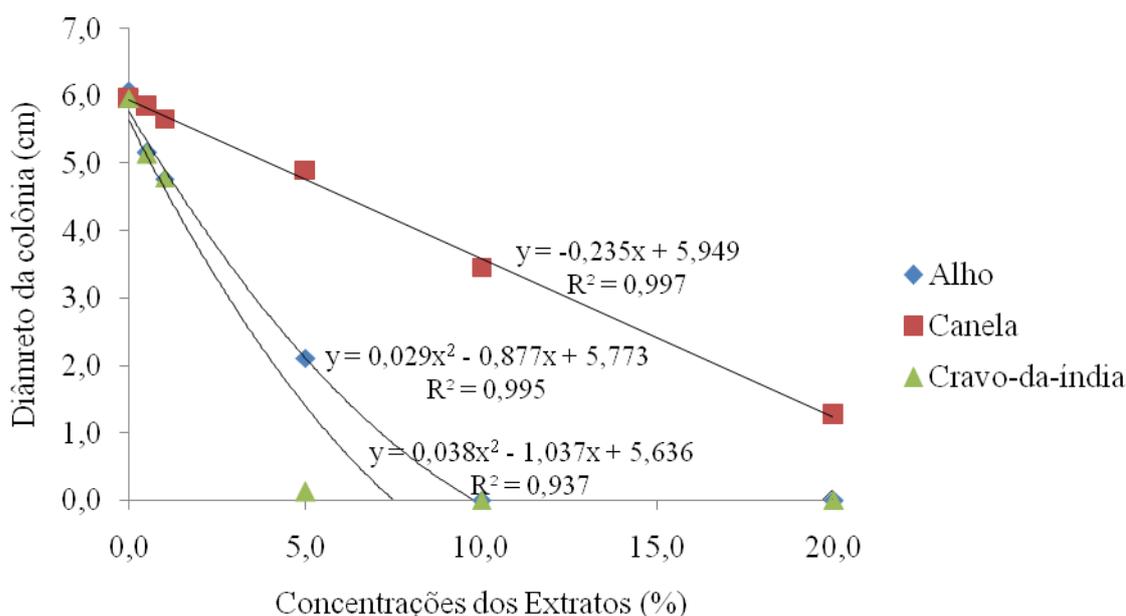


FIGURA 2. Crescimento micelial (cm) de *Cercospora kikuchii* sob influência de diferentes concentrações de extratos aquosos. Dourados, MS, 2008.

Além da atividade antifúngica demonstrada pelos extratos aquosos, foram observadas alterações na coloração das colônias fúngicas, pois estas se apresentaram rosadas em meio BDA, e assumiram coloração branca com o aumento das concentrações dos extratos incorporados ao meio de cultura. Comportamento semelhante foi relatado por Franzener et al. (2003), que verificaram alterações morfológicas nas colônias de *Bipolaris sorokiniana*, sobretudo na cor, pois se apresentaram escuras, quase pretas, em BDA, e assumiram coloração esbranquiçada com o aumento das concentrações do extrato aquoso de cânfora.

Verifica-se por meio da análise de regressão, que *Fusarium solani* apresentou comportamento diferenciado em relação ao crescimento micelial, frente às concentrações dos extratos aquosos (Figura 3).

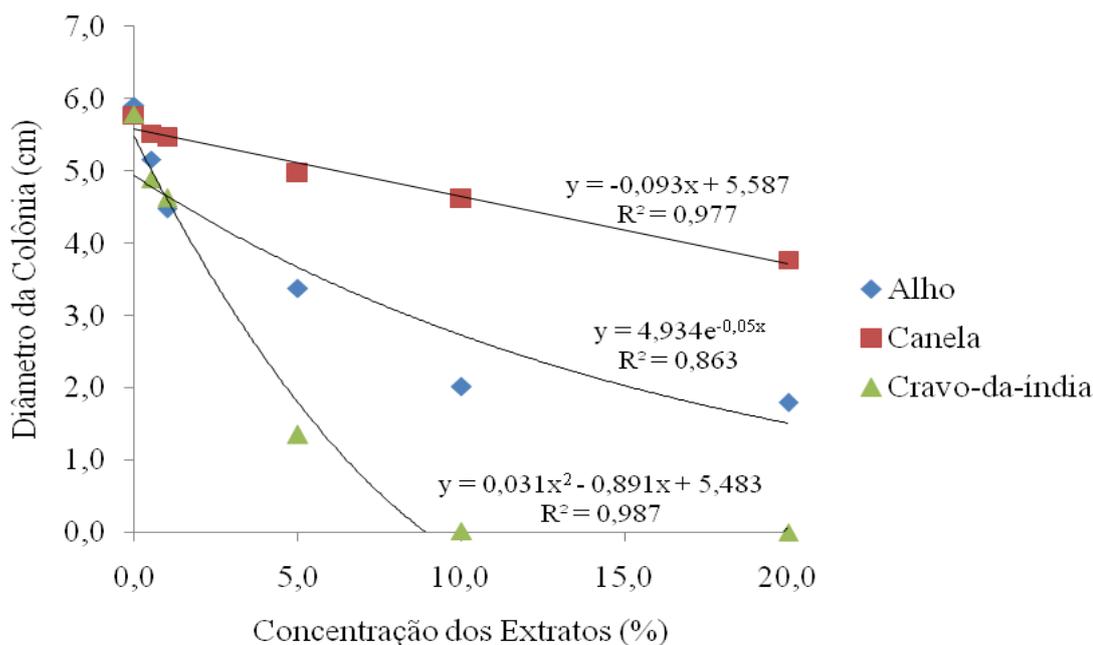


FIGURA 3. Crescimento micelial (cm) de *Fusarium solani* sob influência de diferentes concentrações de extratos aquosos. Dourados, MS, 2008.

Houve acentuada redução no diâmetro da colônia de *F. solani*, quando o mesmo foi adicionado ao meio de cultura contendo o extrato aquoso de cravo-da-índia. Verifica-se efeito crescente na atividade antifúngica do extrato com o aumento das concentrações, até 8,9%, não sendo constatado crescimento do patógeno a partir desta concentração. Para o extrato aquoso de canela, foi verificada uma relação inversamente proporcional, relatando-se um menor crescimento micelial de *F. solani*, com a maior concentração do extrato. A tendência de se obter melhores resultados no controle de patógenos nas maiores concentrações também foi observada por Lima et al. (1996). Entretanto, Cunico et al. (2006) não verificaram diferenças sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, utilizando extratos de *Ottonia martiana* nas concentrações de 12,5, 25 e 50%, sejam aqueles obtidos a partir de raízes, caules ou folhas frescas.

Quanto ao extrato aquoso de alho, foi observado inicialmente, um acentuado declínio no tamanho da colônia fúngica, com tendência posterior de estabilização, mesmo com a utilização das maiores concentrações. Souza et al. (2007) observaram atividade antifúngica do extrato de alho em todas as concentrações avaliadas, sobre o crescimento de *Fusarium proliferatum*, porém, assim como constatado neste estudo, a maior eficiência foi verificada na maior concentração analisada.

Assim como relatado para *F. solani*, pode-se observar uma redução exponencial no crescimento micelial de *Phomopsis* sp. quando submetido ao extrato aquoso de alho

(Figura 4). Pode ser observado, mesmo com a tendência de estabilização sobre o crescimento do patógeno, que o menor crescimento da colônia fúngica foi encontrado na maior concentração.

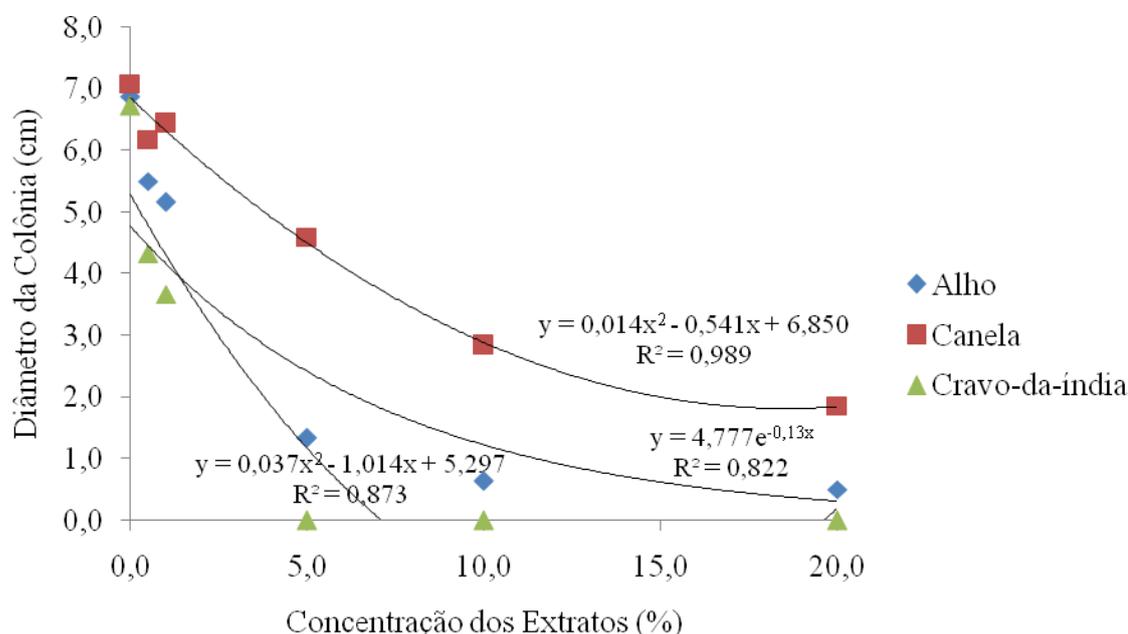


FIGURA 4. Crescimento micelial (cm) de *Phomopsis* sp. sob influência de diferentes concentrações de extratos aquosos. Dourados, MS, 2008.

Quando se utilizou os extratos de canela e cravo-da-índia, verificou-se que o modelo quadrático foi o que melhor se adequou ao crescimento de *Phomopsis* sp. No entanto, nota-se que o extrato aquoso de cravo-da-índia apresentou-se mais efetivo, não sendo verificado, a partir da concentração de 7%, crescimento micelial do patógeno. A partir do modelo encontrado para o extrato de canela, pode-se inferir que o menor crescimento micelial do fungo, seria obtido com concentração de 19,3%.

No Quadro 1 são apresentados os resultados do desdobramento para os extratos aquosos, dentro de cada concentração utilizada, para o crescimento micelial dos fitopatógenos estudados. Foi observado maior crescimento micelial dos fungos *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp., em todas as concentrações testadas e de *Colletotrichum* sp. a partir da concentração de 5%, quando submetidos ao tratamento com extrato aquoso de canela, evidenciando o menor potencial desta planta no controle dos fitopatógenos. Analisando os resultados originados com a utilização do extrato aquoso de canela, nota-se um efeito dose dependente, ou seja, menor diâmetro das colônias fúngicas nas maiores concentrações testadas.

QUADRO 1. Média do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. sob influência de extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

Extratos Aquosos	Concentrações (%)					
	0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	20,0
<i>Colletotrichum</i> sp.						
Alho	5,81 a	5,39 ab	5,00 ab	3,18 b	1,73 b	1,32 b
Canela	5,86 a	5,47 a	5,26 a	4,41 a	3,10 a	2,74 a
Cravo-da-índia	5,93 a	4,90 b	4,53 b	0,17 c	0,00 c	0,00 c
CV (%)	4,36					
<i>Cercospora kikuchii</i>						
Alho	6,08 a	5,06 b	4,77 b	2,11 b	0,00 b	0,00 b
Canela	5,96 a	5,84 a	5,66 a	4,98 a	3,46 a	1,27 a
Cravo-da-índia	5,97 a	5,14 b	4,79 b	0,13 c	0,00 b	0,00 b
CV (%)	5,54					
<i>Fusarium solani</i>						
Alho	5,91 a	5,16 b	4,47 b	3,37 b	2,01 b	1,79 b
Canela	5,77 a	5,52 a	5,46 a	4,97 a	4,61 a	3,77 a
Cravo-da-índia	5,79 a	4,89 b	4,63 b	1,35 c	0,00 c	0,00 c
CV (%)	6,65					
<i>Phomopsis</i> sp.						
Alho	6,88 a	5,50 b	5,16 b	1,34 b	0,64 b	0,50 b
Canela	7,09 a	6,18 a	6,44 a	4,81 a	2,84 a	1,86 a
Cravo-da-índia	6,73 a	4,23 c	3,67 c	0,00 c	0,00 c	0,00 b
CV (%)	5,31					

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O extrato aquoso de cravo-da-índia promoveu significativas reduções no crescimento dos fungos. Constata-se para *Colletotrichum* sp. e *Fusarium solani* resultados significativamente superiores, a partir da concentração de 5%, do extrato de cravo quando comparado aos demais extratos aquosos. Em relação ao crescimento de *Phomopsis* sp., verificou-se superioridade do cravo-da-índia em todas as concentrações utilizadas, com exceção da concentração de 20%, onde o mesmo não diferiu do extrato de alho. No

crescimento micelial de *C. kikuchii* foram observados, apenas na concentração de 5%, melhores resultados do extrato de cravo-da-índia. Com exceção ao crescimento de *C. kikuchii*, a utilização do extrato de alho resultou em atividade antifúngica intermediária sobre o crescimento dos fitopatógenos.

Foi constatada atividade fungistática com a utilização do extrato aquoso de cravo-da-índia, nas concentrações de 5, 10 e 20% sobre *Phomopsis* sp., e apenas nas maiores concentrações sobre *Colletotrichum* sp. e *Fusarium solani*. Em relação à *C. kikuchii*, esta atividade foi verificada para os extratos de alho e cravo-da-índia, utilizando-se as concentrações de 10 e 20%.

O extrato aquoso de alho nas concentrações de 10 e 20% apresentaram resultados promissores no controle de *Phomopsis* sp., pois, além de não permitirem crescimento do patógeno superior a 1 cm, 0,64 e 0,50 cm, respectivamente, foi constatado visualmente nestas concentrações, o crescimento de um micélio pouco denso na colônia fúngica em relação ao tratamento controle. O mesmo comportamento foi observado para o extrato de canela, quando utilizado nas mesmas concentrações e para o extrato de cravo-da-índia, nas concentrações de 0,5 e 1%. A colônia fúngica apresentava-se com poucas hifas e aparentemente debilitada em comparação ao tratamento controle. Sanchez-Mirt et al. (1993) relataram alterações na membrana citoplasmática dos fungos *Cladosporium carrionii* e *Fonsecaea pedrosoi*, após o tratamento com ajoene, um dissulfureto insaturado presente no alho. Bianchi et al. (1997) afirmam ainda que essas alterações também podem ser provenientes da modificação na atividade enzimática envolvida na membrana e na formação da parede celular, originando um desenvolvimento anormal do patógeno.

Analisando o efeito das diferentes concentrações dos extratos aquosos em relação à porcentagem de inibição de *Colletotrichum* sp., verificou-se que o cravo-da-índia foi o responsável pela maior inibição sobre o desenvolvimento do patógeno (Figura 5). Foi observada, por meio da equação, total inibição do crescimento do fungo a partir da utilização da concentração 7,6%. Destaque também para a concentração de 5%, que proporcionou alta porcentagem de inibição (76,7%), sendo verificados valores maiores que os obtidos, com os extratos de alho e canela, mesmo nas maiores concentrações. Resultados semelhantes foram relatados por Rozwalka et al. (2008), que verificaram 100% de inibição do crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, com o uso do extrato aquoso de cravo-da-índia na concentração de 10%. Os autores afirmaram ainda que em experimento prévio, o extrato aquoso na concentração de 1% apresentou-se igualmente eficiente.

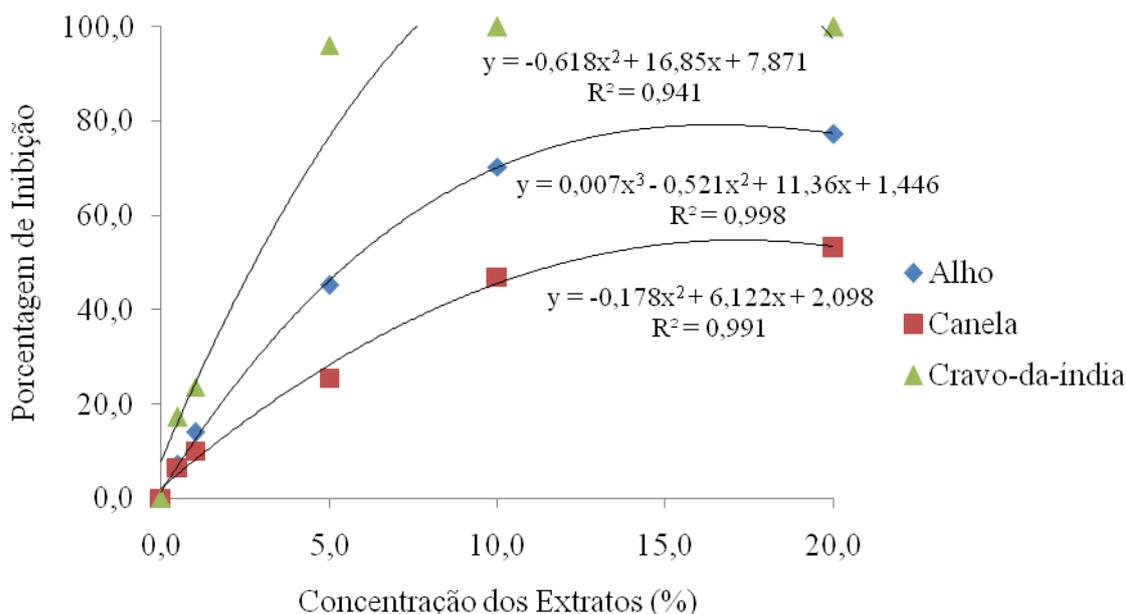


FIGURA 5. Inibição do crescimento micelial (%) de *Colletotrichum* sp. submetido a extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

Observa-se pelos resultados que o fungo foi sensível ao tratamento com extrato aquoso de canela, porém, verifica-se menor porcentagem de inibição, quando comparado aos demais extratos. A maior atividade antifúngica do extrato foi mensurada na concentração de 17,2%, resultando em uma inibição de 54,7%.

Em relação ao extrato aquoso de alho, o modelo que melhor se ajustou foi o cúbico, sendo possível observar um acentuado aumento na porcentagem de inibição até a concentração de 10% (69,9%), embora, o maior efeito inibitório do extrato tenha sido verificado com a maior concentração (76,2%). Ribeiro e Bedendo (1999) verificaram que dentre quatro extratos vegetais testados, aquele proveniente de alho resultou em efeitos mais drásticos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, reduzindo em 67,6% o crescimento do patógeno em relação à testemunha. Bianchi et al. (1997), verificaram inibições de 42% sobre o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum* na concentração de 10%, valores menores que os encontrados neste estudo, porém os autores observaram, por meio de microscopia eletrônica, colapso das hifas do patógeno quando tratadas com o extrato de alho.

Foram consideradas como altas porcentagens de inibição, àqueles tratamentos que proporcionaram inibições superiores a 50% sobre o crescimento dos patógenos. A utilização dos extratos aquosos de cravo-da-índia e alho resultou em altas porcentagens de inibição sobre o crescimento de *Cercospora kikuchii*, a partir das concentrações de 2,9% e 3,5%, respectivamente. Porém, com a maior adição dos extratos aquosos ao meio de cultura, 7,5% e

9,8% para os extratos de cravo e alho respectivamente, pode ser observado que ambos os extratos inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo (Figura 6).

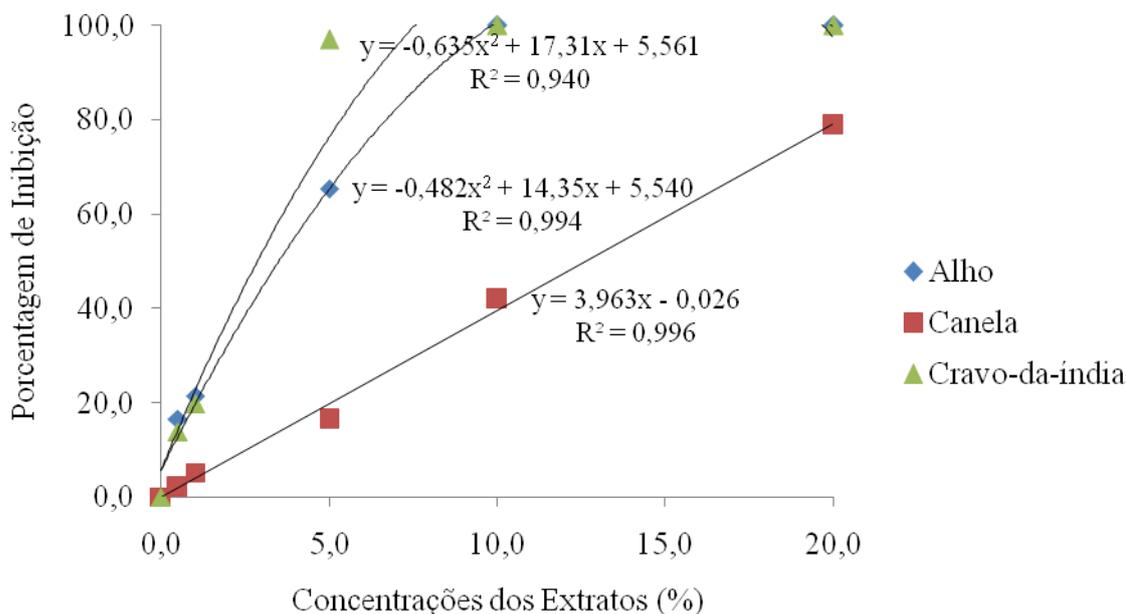


FIGURA 6. Inibição do crescimento micelial (%) de *Cercospora kikuchii* submetido a extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

Incremento linear na porcentagem de inibição de *C. kikuchii* foi verificado com a utilização do extrato proveniente da casca de canela, proporcionando, com a concentração de 12,6% inibição superior a 50%. Entretanto, a maior porcentagem de inibição foi constatada para a concentração de 20% (79,2%).

O extrato aquoso de cravo-da-índia a partir da concentração de 8,9% proporcionou 100% de inibição do crescimento de *F. solani*. Observa-se, como ocorreu para *Colletotrichum* sp., maior porcentagem de inibição do extrato aquoso de cravo na concentração de 5%, quando comparado as maiores concentrações testadas para os extratos de alho e canela (Figura 7).

Sobre a porcentagem de inibição do crescimento de *F. solani*, observou-se uma alta inibição, por parte do extrato de alho, nas maiores concentrações testadas, atingindo 69% de inibição com o uso da concentração de 17,5%. Logo a partir das menores concentrações pode ser observado que o extrato de alho demonstrou atividade antifúngica sobre o patógeno, ao contrário do relatado por Motoyama et al. (2003), que observaram nas menores concentrações do extrato cítrico (1 e 10 ppm), estímulo no crescimento de *F. semitectum*. Em relação ao extrato aquoso de canela, foi observado incremento linear na porcentagem de

inibição com o aumento das concentrações utilizadas. No entanto, o extrato não proporcionou elevada inibição sobre o patógeno.

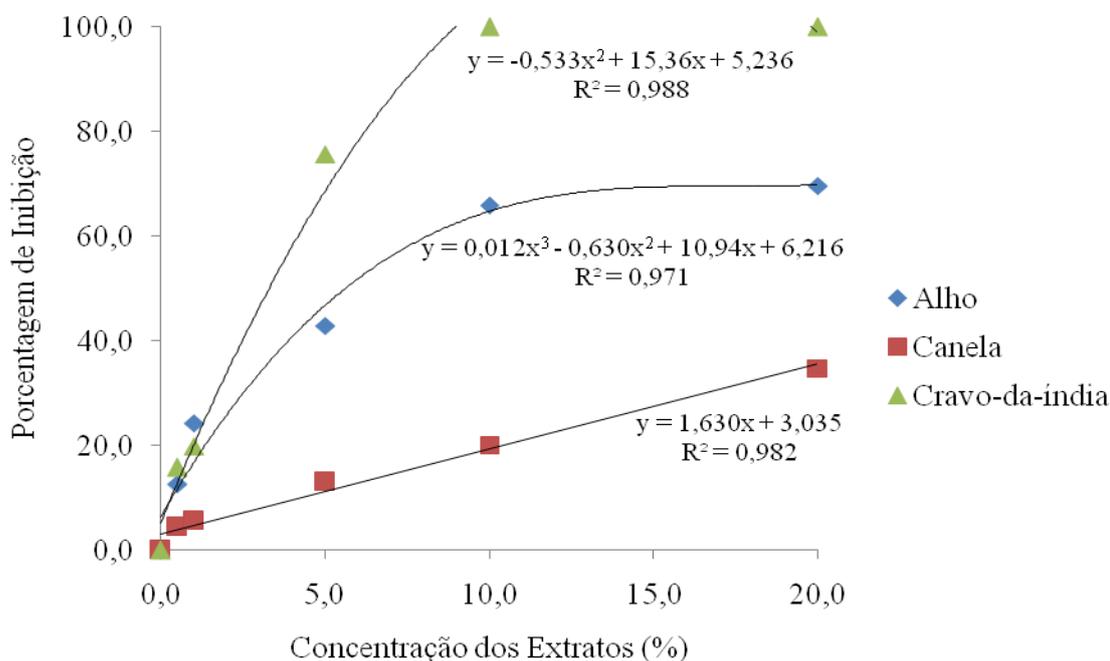


FIGURA 7. Inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium solani* submetido a extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

Foi observado, por meio da análise de porcentagem de inibição do crescimento de *Phomopsis* sp., bom desempenho dos extratos aquosos testados, observando-se inibição superior a 50%, nas concentrações de 2%, 3,2% e 8%, para os extratos de cravo-da-índia, alho e canela, respectivamente (Figura 8).

Por meio da análise de regressão, verificou-se que os extratos aquosos utilizados nesta pesquisa apresentaram comportamento similar em relação ao crescimento micelial de *Phomopsis* sp. O modelo quadrático foi o que melhor se ajustou frente à inibição ocasionada pelos extratos aquosos, sendo possível determinar, que a maior inibição (74,5%) encontrada para o extrato de canela, foi alcançada com a concentração de 19,3%. Foi constatado ainda, com a utilização dos extratos aquosos de cravo-da-índia e alho, inibição de 100% do crescimento do patógeno a partir das concentrações de 7,1% e 9,8%, respectivamente.

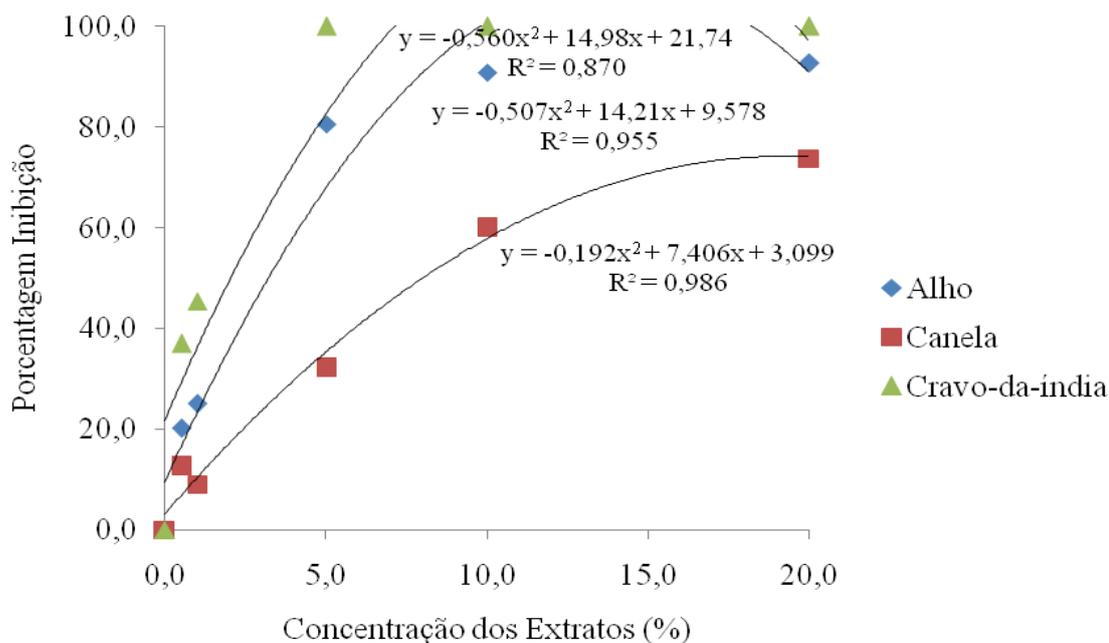


FIGURA 8. Inibição do crescimento micelial (%) de *Phomopsis* sp. submetido à extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

O resultado desdobrado da porcentagem de inibição para os extratos aquosos dentro de cada concentração, está demonstrado no Quadro 2. Com exceção de *Cercospora kikuchii*, o extrato de cravo-da-índia proporcionou as maiores inibições sobre os fitopatógenos.

De modo geral, observam-se menores porcentagens de inibição com o uso do extrato de canela. O extrato promoveu inibição superior a 50%, apenas na concentração de 20% sobre o crescimento de *Colletotrichum* sp. Para *Fusarium solani* não se verificou altas inibições, mesmo nas maiores concentrações. Em relação a estes patógenos, o uso do extrato de alho nas concentrações de 10 e 20% originou elevadas inibições, porém, a utilização do extrato aquoso de cravo-da-índia a partir da concentração de 5%, promoveu significativas porcentagens de inibição, sendo observado nas maiores concentrações, 100% de inibição sobre o crescimento dos patógenos.

Os extratos vegetais proporcionaram, a partir da concentração de 5%, altas porcentagens de inibição sobre *Phomopsis* sp., exceto o extrato de canela. Observa-se incremento na porcentagem de inibição até a maior concentração com a utilização do extrato de alho. Verificaram-se altas inibições, 80,6, 90,8 e 92,7%, sobre o crescimento do fungo, na presença das concentrações de 5, 10 e 20%, respectivamente. Embora seja relatada alta atividade antifúngica deste extrato, as maiores porcentagens de inibição foram constatadas

com o extrato de cravo-da-índia, alcançando 100% de inibição nas três maiores concentrações, evidenciando desta forma, maior atividade antifúngica deste extrato.

QUADRO 2. Média da porcentagem de inibição de *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. sob influência de extratos aquosos em diferentes concentrações. Dourados, MS, 2008.

Extratos Aquosos	Concentrações (%)					
	0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	20,0
<i>Colletotrichum</i> sp.						
Alho	0,0 a	7,3 b	14,0 b	45,3 b	70,4 b	77,3 b
Canela	0,0 a	6,6 b	10,1 b	24,6 c	47,0 c	53,2 c
Cravo-da-índia	0,0 a	17,3 a	23,6 a	97,1 a	100,0 a	100,0 a
CV (%)	13,79					
<i>Cercospora kikuchii</i>						
Alho	0,0 a	16,6 a	21,5 a	65,4 b	100,0 a	100,0 a
Canela	0,0 a	2,0 b	5,2 b	16,5 c	42,0 b	78,8 b
Cravo-da-índia	0,0 a	13,9 a	19,8 a	97,9 a	100,0 a	100,0 a
CV (%)	9,84					
<i>Fusarium solani</i>						
Alho	0,0 a	12,6 ab	24,3 a	42,9 b	65,9 b	69,7 b
Canela	0,0 a	4,4 b	5,5 b	14,0 c	20,1 c	34,8 c
Cravo-da-índia	0,0 a	15,8 a	19,8 a	76,7 a	100,0 a	100,0 a
CV (%)	9,78					
<i>Phomopsis</i> sp.						
Alho	0,0 a	20,1 b	25,1 b	80,6 b	90,8 b	92,7 b
Canela	0,0 a	12,6 c	9,0 c	32,2 c	59,9 c	73,8 c
Cravo-da-índia	0,0 a	37,0 a	45,4 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
CV (%)	9,43					

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A maior inibição ocasionada pelo extrato de canela foi observada sobre *Cercospora kikuchii*, 78,8% na concentração de 20%. O patógeno teve seu crescimento influenciado negativamente, quando submetido aos meios de cultura contendo os extratos de

alho e cravo-da-índia a partir das concentrações de 5%. Vale salientar que os extratos promoveram total inibição do fungo quando se utilizaram as concentrações de 10 e 20%, sendo relatados, resultados superiores para o cravo-da-índia, apenas na presença do extrato a 5%.

Verifica-se, de modo geral, uma tendência de que quanto maior a concentração, maior o efeito do extrato no sentido de inibir o crescimento micelial do fungo. Os resultados obtidos estão de acordo com as avaliações de outros autores, em estudos com fungos fitopatogênicos, nas quais se verificaram ocorrer maior inibição do crescimento micelial com o emprego das maiores concentrações dos extratos vegetais (FRANZENER et al., 2003; SOUZA et al., 2007). Todos os fungos foram sensíveis a menor concentração utilizada, no entanto, reduções significativas sobre o diâmetro das colônias fúngicas foram constatadas apenas quando se empregou as maiores concentrações.

3.4 CONCLUSÕES

Constata-se maior atividade antifúngica dos extratos vegetais nas maiores concentrações testadas.

O extrato de cravo-da-índia apresenta maior eficácia no controle dos fitopatógenos testados, e proporciona supressão sobre o crescimento de *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani* e de *Phomopsis* sp. a partir das concentrações de 7,6%, 7,5%, 8,9% e 7,1%, respectivamente.

O extrato aquoso de alho apresenta total inibição apenas de *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp. a partir da concentração de 9,8%.

Os fungos fitopatogênicos não foram totalmente inibidos com o uso do extrato aquoso de canela, independente da concentração utilizada.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, S. T. ; OLIVEIRA, N. T. ; MAIA, L. C. Efeito de extrato de bulbo de alho, (*Allium sativum* L.) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria* spp. e *Curvularia* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.2, n.2, p.60-62, 1995.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. 388p. Documentos, 15.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AULERIO, A.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease**, Charleston, v.81, n.11, p.1241-1246, 1997.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.7, p.15-24, 2006.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.

HEINZMANN, B. M. Compostos com enxofre. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p.633-650.

LIMA, G. S. A.; LIMA, N. M. F.; LOPEZ, A. M. Q. Efeito de extratos aquosos de bulbos de alho (*Allium sativum*) sobre a germinação e o crescimento micelial de *Botryodiplodia theobromae* Pat. *in vitro*. **Ciência Agrícola**, Maceió, v.4, p.1-9, 1996.

LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants against infection. **Plant Pathology**, Bangor, v.44, p.407-427, 1995.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.491-496, 2003.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeilanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et LM. Perry against crown rot anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v.35, p.208-211, 2002.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloesporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999. Suplemento.

RODRIGUES, E. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle

de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.2, p.213-220, 2006.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SANCHEZ-MIRT, A.; GIL, F.; APIZ-CASTRO, R. Efecto inhibithorio y alteraciones ultraestructurales producidas por ajoeno sobre el crecimiento in vitro de los hongos dematiaceos: *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, v.10, n.3, p.74-78, 1993.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.11, p.16-21, 1999.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p.45-62.

CAPÍTULO IV

QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM EXTRATOS VEGETAIS ANTES DO ARMAZENAMENTO

RESUMO: O trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja submetidas ao tratamento com extratos vegetais antes do armazenamento. O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e Sementes da Universidade Federal da Grande Dourados. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5 x 5 com 4 repetições. O tratamento de sementes foi realizado com extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia na concentração de 20% (400 ml/100 kg), Carbendazin + Thiram (200 ml/100 kg) e a testemunha. O segundo fator foram os períodos de armazenamento, 0, 35, 70, 105 e 140 dias. As sementes foram tratadas, por meio da mistura manual, acondicionadas em embalagem de papel kraft, contendo 1,5 kg, as quais foram mantidas a uma temperatura de 22°C (\pm 2°C) por um período de 140 dias. As avaliações para determinar a qualidade fisiológica e sanitária ocorreram, no momento do tratamento de sementes e posteriormente a cada 35 dias de armazenamento, por meio da sanidade de sementes, germinação padrão e desenvolvimento de plântulas. Realizou-se ainda, análise de vigor de sementes, por meio de emergência a campo e índice de velocidade de emergência, no primeiro e último período de armazenamento. Foram observados, por meio do teste de sanidade, que os fungos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* sp. e *Phomopsis* sp. tendem a diminuir sua incidência durante o armazenamento, enquanto *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. aumentam. Os tratamentos com os extratos aquosos reduziram a incidência dos patógenos nas sementes em relação à testemunha, porém o melhor controle foi verificado com a utilização do fungicida. Em relação à qualidade fisiológica, verificou-se que os extratos vegetais apresentaram resultados semelhantes ao fungicida no decorrer do armazenamento.

Termos para indexação: controle alternativo, germinação, *Glycine max*.

PHYSIOLOGIC AND SANITARY QUALITY OF SOYBEAN SEEDS TREATY WITH PLANT EXTRACTS BEFORE STORAGE

ABSTRACT: The work aimed to evaluate the physiological and sanitary quality of soybean seeds submitted to treatment with plant extracts before storage. The experiment was conducted in the laboratories of Phytopathology and Seeds the Federal University of Grande Dourados. Was used the completely randomized design in factorial arrangement 5 x 5 with 4 replications. The seed treatment was carried out with aqueous extracts of garlic, cinnamon and clove at a concentration of 20% (400 ml/100 kg), Carbendazin + Thiram (200 ml/100 kg) and control. The second factor was the storage periods, 0, 35, 70, 105 and 140 days. The seeds were treated by means of manual mixing, added in a package of kraft paper containing 1.5 kg, which were kept at a temperature of 22°C (\pm 2°C) for a period of 140 days. Evaluations to determine the physiological and sanitary quality occurred at the time of seed treatment and afterwards every 35 days of storage, through the health of seed, germination pattern and seedling development. Carried out still, analysis of vigor seed, through the emergency field and index speed of emergence, in the first and last period of storage. Were observed through the test of sanity, that the fungus *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* sp. and *Phomopsis* sp. tend to decrease its incidence during storage, whereas *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. increases. The treatments with the aqueous extracts reduced the incidence of pathogens in seeds in relation to the witness, but the best control was observed with the use of fungicide. Regarding the physiological quality, it was found that the plant extracts showed similar results to the fungicide during storage.

Index terms: alternative control, germination, *Glycine max*.

4.1 INTRODUÇÃO

Entre as diversas espécies agrícolas produzidas no mundo, a soja ocupa posição de destaque, no tocante à alimentação humana e animal, por se tratar de uma importante fonte de proteínas e de óleo vegetal (AFONSO JÚNIOR et al., 2000).

O sucesso de uma lavoura, entre outros fatores, está condicionado à utilização de sementes de alta qualidade. A semente é um dos principais insumos da produção agrícola, devendo merecer maior atenção quanto à qualidade fisiológica e sanitária, pois além de sua importância no estabelecimento da lavoura (HAMAWAKI et al., 2002), pode também constituir-se em fator de risco, sendo veículo de disseminação e sobrevivência de muitos patógenos (GOULART, 2001).

No período de desenvolvimento e maturação, a soja pode ser atacada por diversos patógenos, entre estes se destacam *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii*, que têm potencial para causar prejuízos na qualidade das sementes (KROHN e MALAVASI, 2004). Goulart et al. (1999) enfatizam que esses fungos diminuem sua incidência quando as sementes são armazenadas, entretanto, fungos como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., tendem a aumentar, contribuindo para a deterioração das sementes. O processo de deterioração e a conseqüente redução da qualidade em sementes de soja é resultado da complexa interação de alterações físicas, fisiológicas e sanitárias, podendo ser favorecida ou retardada conforme as condições de armazenamento (AFONSO JÚNIOR et al., 2000).

Dentre as alternativas na conservação de sementes durante o armazenamento, a medida mais comum de controle de fungos associados a estas, é a diminuição do teor de água. Devido às limitações, sobretudo no período com maior concentração de colheitas, o tratamento com o uso de fungicidas antes do armazenamento, certamente poderia dar maior segurança ao processo como um todo e melhorar o desempenho das sementes, através do controle dos patógenos associados às mesmas. De acordo com Machado (2000) o tratamento de sementes no sentido mais abrangente envolve a aplicação de diversos processos e substâncias às sementes, de modo a preservar ou melhorar seu desempenho, controlar patógenos potencialmente transmissíveis, proteger contra fungos do solo e fazer com que a densidade desejada de plantio seja alcançada.

Cuidados devem ser tomados no sentido de evitar riscos diretos ou indiretos à saúde humana, devido à toxicidade proporcionada pelos produtos sintéticos. Neste contexto, a utilização de produtos naturais extraídos de vegetais poderá, eventualmente, constituir-se

como uma alternativa para o controle de patógenos associados a sementes, com a vantagem de redução de gastos e ausência de impacto ambiental causado pelos agroquímicos (COUTINHO et al., 1999).

A exploração da atividade de compostos secundários é uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir a proteção tradicional em sementes, através da utilização de subprodutos de plantas medicinais como extrato bruto e óleo essencial (MATOS, 1997). Essas substâncias, classificadas como compostos secundários originam-se em grande maioria de acetato ou aminoácidos da via bioquímica, no entanto pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, podendo ser ácidos fenólicos, cumarina, terpenóides, alcalóides, flavonóides, etileno (CASTRO et al., 1983), quinonas e saponinas, que em quantidades apreciáveis podem além de repelir insetos, prevenir a ocorrência de doenças em plantas (SILVA JÚNIOR e VIZZOTO, 1996).

Diante de um cenário mundial preocupado quanto à segurança alimentar, e tendo a cultura da soja destaque como alimento para humanos e animais, por sua riqueza em óleos e proteínas, deve-se focar estudos mais relevantes quanto aos produtos a serem utilizados tanto no tratamento como no armazenamento destes grãos. Nesse contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja submetidas ao tratamento antes do armazenamento.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório de Sementes da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, no período de maio a outubro de 2008. Foram adquiridas junto a Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados – MS, sementes de soja da cultivar BRS 240, colhidas na safra 07/08. No intuito de verificar a qualidade inicial das sementes, foi mensurado o teor de umidade com medidor DOLE 400, e avaliadas a porcentagem de germinação e a incidência fúngica na obtenção das mesmas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5, com 4 repetições. O primeiro fator constou dos produtos utilizados no tratamento de sementes, extratos aquosos de alho, canela e cravo-da-índia (400 ml/100 kg), a testemunha, onde foi adicionada água destilada na mesma proporção à utilizada para os extratos aquosos e o fungicida Carbendazin + Thiram (200 ml/100 kg). O segundo fator foram os períodos de armazenamento, 0, 35, 70, 105 e 140 dias.

Os extratos aquosos foram obtidos por meio da coleta de 20g do material vegetal, bulbos de alho (*Allium sativum*), casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e botão floral de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Posteriormente foram triturados em liquidificador com 100 ml de água destilada. A solução obtida foi filtrada em papel wathman nº 1 e recolhida em erlenmeyer devidamente identificado. Os extratos foram utilizados no mesmo dia de sua obtenção.

As sementes foram colocadas em sacos de papel kraft e levadas para estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 40°C, no intuito de ajustar o teor de umidade para 12%, na qual foram armazenadas. Após corrigir o teor de umidade, as sementes foram submetidas aos tratamentos, por meio da mistura manual em sacos plásticos, a fim de facilitar a homogeneização. Posteriormente a secagem na sombra, as sementes foram acondicionadas em embalagem de papel kraft, contendo 1,5 kg, as quais foram mantidas a uma temperatura de 22°C (\pm 2°C) por um período de 140 dias.

As avaliações para determinar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes ocorreram por ocasião do tratamento de sementes e posteriormente a cada 35 dias de armazenamento, por meio da sanidade de sementes, germinação padrão e desenvolvimento de plântulas. Foram realizadas ainda, análise de vigor de sementes, por meio da emergência a campo e índice de velocidade de emergência, no primeiro e último período de armazenamento (0 e 140 dias). Determinou-se o teor de umidade das sementes, antes dos testes para avaliação da qualidade sanitária e fisiológica, no intuito de acompanhar as condições de armazenagem.

Os testes de sanidade de sementes foram realizados conforme metodologia do “blotter test” (NEERGAARD, 1979). Quatrocentas sementes foram distribuídas em 20 gerboxes. Cada gerbox continha três folhas de papel filtro, pré-umedecidas em solução do herbicida 2,4-D a 0,01%. Posteriormente, foram incubadas à temperatura de 22°C, durante sete dias, com fotoperíodo de 12 horas. A identificação dos fungos ocorreu com auxílio de microscópio.

O teste de germinação padrão foi realizado conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 1992). Foram utilizadas 200 sementes, distribuídas em quatro repetições de 50 sementes, e colocadas em substrato de papel “germitest” umedecido com 2,5 vezes o peso do papel seco e mantidas em câmara de germinação regulada à temperatura constante de 25°C. A contagem foi realizada no sétimo dia após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

A análise de desenvolvimento das plântulas foi realizada após o teste de germinação padrão, separando-se 20 plântulas por tratamento. Dividiam-se as plântulas, em parte aérea e raízes, e media-se o comprimento das mesmas, com auxílio de régua graduada. Posteriormente, as plântulas foram colocadas em sacos de papel kraft, e levadas para estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 45°C até a obtenção de peso constante, para quantificar a massa seca de plântulas. Os resultados foram expressos em g.plântula⁻¹.

O vigor foi mensurado por meio da semeadura das sementes em bandejas, medindo 37 cm de largura por 52 de comprimento, preenchidas com 10 dm³ de solo peneirado, do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico. Foram semeadas 400 sementes por tratamento, a uma profundidade de 3 cm. Considerou-se como semente emergida, aquela que demonstrou sua aptidão em produzir uma planta normal sob condições de campo após o décimo dia da semeadura (BRASIL, 1992). Para o índice de velocidade de emergência foram efetuadas contagens diárias a partir da primeira semente emergida até sua estabilização, e calculada pela fórmula proposta por Maguire (1962).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR, para àqueles provenientes da sanidade de sementes procedeu-se a transformação arcsen da $\sqrt{x}/100$. Verificando-se interação significativa entre os fatores, procederam-se os necessários desdobramentos, realizando-se para os produtos utilizados no tratamento de sementes, comparação entre as médias por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade, e para os períodos de armazenamento foi realizada análise de regressão, sendo escolhido o modelo de maior grau significativo.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes apresentavam inicialmente, teor de umidade de 15% e 97% germinação. As sementes foram armazenadas com 12% de umidade, sendo constatado ao longo do armazenamento um decréscimo no teor de umidade em torno de 0,75% por período de avaliação. Cardoso et al. (2004) verificaram redução de 0,6% por mês de armazenamento, para sementes de soja armazenadas no sistema a frio.

Na micoflora fúngica inicial, foram observados com maior frequência os fungos *Fusarium* spp. (100%), *Botrytis* spp. (88,7%), *Cercospora kikuchii* (50,3%), *Alternaria* spp. (31,2%), *Colletotrichum* spp. (13%), *Aspergillus* spp. (11,3%), *Penicillium* spp. (7,8%) e *Phomopsis* spp. (7%).

O resultado da análise de variância indicou interação significativa entre os fatores, produtos x período de armazenamento, para toda a micoflora associada às sementes, sendo observado que os extratos vegetais reduziram a micoflora fúngica incidente sobre as sementes quando comparado ao tratamento controle, porém o fungicida proporcionou controle mais efetivo.

O tratamento de sementes com fungicida e com os extratos vegetais foram eficientes na redução de *Aspergillus* spp., com exceção do extrato de alho no momento do tratamento que não diferiu da testemunha. Os extratos aquosos proporcionam eficiente controle quando inibem em valores superiores a 50% a incidência dos fitopatógenos. Pode ser observada, por ocasião do tratamento de sementes, uma redução de 63,8% e 52,4% na porcentagem de incidência de *Aspergillus* spp. com a utilização dos extratos de canela e cravo-da-índia, respectivamente (Quadro 1). Gonçalves et al. (2003) observaram melhores resultados tratando sementes de feijão com o extrato de cravo-da-índia, pois, não foi verificado o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*. Outros trabalhos também têm demonstrado eficiência na redução da infestação por fungos do gênero *Aspergillus*, como o emprego de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* em sementes de amendoim (BANSAL e SOBTI, 1990), e com o citral isolado de *Cymbopogon citratus* em sementes de trigo e de arroz (MISHRA e DUBEY, 1994).

Foi verificado aos 35, 70 e 105 dias de armazenamento que os extratos vegetais apresentaram maior controle sobre o patógeno quando comparado à testemunha, porém os resultados foram inferiores ao fungicida, que proporcionou 100% de controle do fungo até os 70 dias de armazenamento.

QUADRO 1. Porcentagem de incidência de *Aspergillus* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	10,5 a	10,8 a	12,0 a	34,8 a	76,0 b
Ext. Alho	7,0 ab	4,5 b	3,3 bc	26,8 b	89,0 a
Ext. Canela	3,8 c	2,0 c	2,0 c	23,0 c	73,2 b
Ext. Cravo-da-índia	5,0 bc	3,0 bc	4,8 b	15,0 d	56,5 c
Fungicida	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,8 e	1,5 d
CV (%)	10,94				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 140 dias de armazenamento constatou-se maior incidência de *Aspergillus* spp. nas sementes tratadas com extrato de alho, diferindo dos demais tratamentos. Dentre os extratos, ao final das avaliações, apenas o obtido de cravo-da-índia resultou em menor incidência em relação a testemunha. Quando tratou sementes de algodão com extrato de aroeira, Souza et al. (2003), não verificaram redução na incidência de *Aspergillus* spp.

Foi verificado a partir dos 70 dias, aumento na incidência de *Aspergillus* spp. com o decorrer do armazenamento (Figura 1).

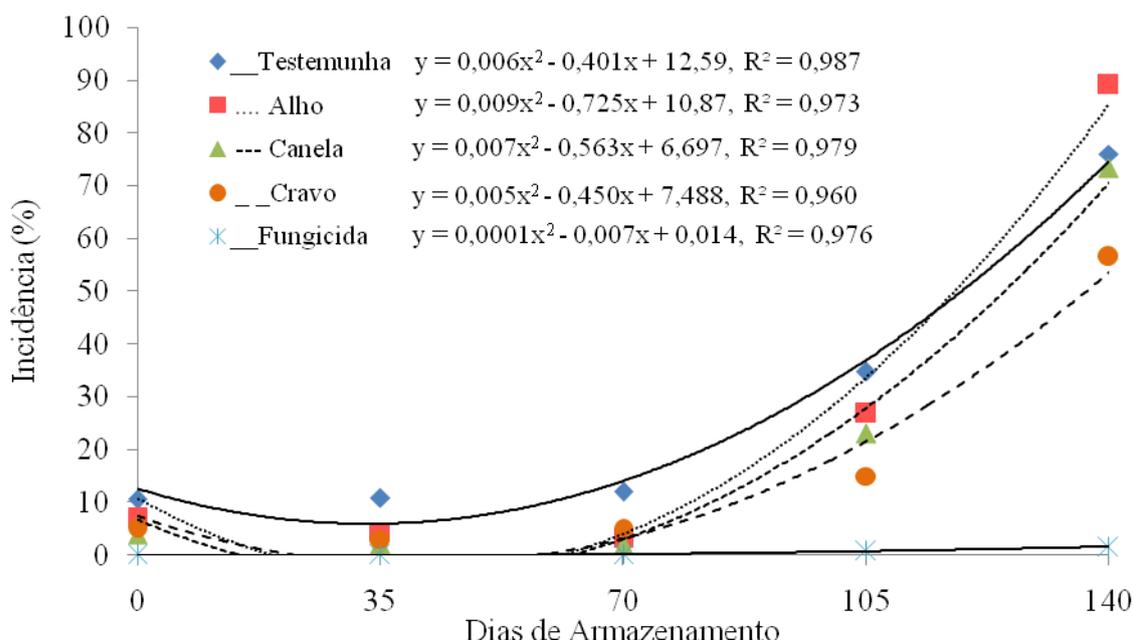


FIGURA 1. Incidência de *Aspergillus* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

O crescimento mais acentuado foi constatado na testemunha e nos extratos de alho e canela, observando-se incidências superiores a 70% nos respectivos tratamentos. Resultados semelhantes foram relatados por Cardoso et al. (2004) que verificaram aumento na incidência de *Aspergillus* spp. durante o armazenamento, principalmente nas sementes sem tratamento químico. Bizzetto e Homechin (1999) verificaram ainda que o aumento deste patógeno ao longo dos meses não sofreu influência quando o mesmo foi submetido às temperaturas de 18 e 22°C. No entanto, Pereira et al. (2007) observaram um aumento no percentual de *Aspergillus* somente até o terceiro mês de armazenamento, com posterior tendência de redução.

Constatou-se até aos 70 dias de armazenamento, quando se utilizou os extratos de alho, canela e cravo-da-índia, uma redução na incidência do patógeno. Ao contrário do observado na testemunha, que apresentou valores crescentes desde o período inicial de armazenamento. No tratamento com fungicida não se verificou a presença de *Aspergillus* spp. até os 70 dias, posteriormente, com o decorrer do armazenamento, foi observado pequeno, porém crescente, aumento na incidência deste. Coutinho et al. (1999) estudando o efeito de extratos e fungicidas sobre a micoflora de sementes de feijão, relataram menores porcentagens de incidência de *Aspergillus flavus*, quando as sementes foram tratadas com extrato de aroeira, cajueiro e pela mistura dos dois extratos, comparado à testemunha. Os autores verificaram ainda que o fungicida captan misturado aos extratos de aroeira e cajueiro, apresenta menor porcentagem de sementes com fungos do que quando o produto foi aplicado isoladamente.

A incidência de *Penicillium* spp. não foi influenciada pelos extratos vegetais logo após o tratamento de sementes (Quadro 2). Com a utilização do fungicida foi constatado comportamento semelhante à *Aspergillus* spp., onde o produto não permite o desenvolvimento dos patógenos até os 70 dias de armazenamento, sendo, entretanto, verificado nas últimas avaliações o aparecimento dos fungos.

Foi verificado aumento na porcentagem do fungo aos 35 dias de armazenamento no tratamento controle, diferindo deste modo, dos extratos vegetais. Ao final das análises, os extratos de cravo-da-índia e canela apresentaram menor incidência do fungo em relação à testemunha e ao extrato de alho. Em sementes tratadas com o extrato de cravo-da-índia, Gonçalves et al. (2003) não verificaram desenvolvimento de *Penicillium* spp. e *Macrophomina phaseolina*. Os autores constataram ainda, que sementes tratadas com Captan misturado ao óleo de dendê, apresentaram menor ocorrência de fungo em relação às sementes tratadas apenas com o produto químico.

QUADRO 2. Porcentagem de incidência de *Penicillium* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	6,3 a	18,0 a	17,5 a	20,5 a	52,0 a
Ext. Alho	5,0 a	8,8 b	13,3 ab	15,0 b	51,3 a
Ext. Canela	7,5 a	11,8 b	16,0 a	15,3 b	43,8 b
Ext. Cravo-da-índia	4,5 a	8,3 b	9,3 b	15,3 b	40,3 b
Fungicida	0,0 b	0,0 c	0,0 c	0,3 c	0,5 c
CV (%)	10,07				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode ser observado na Figura 2, do mesmo modo que para *Aspergillus* spp., que *Penicillium* spp. também apresentou um crescente aumento à medida que prolongava-se o período de armazenamento. Este resultados estão de acordo com Silva et al. (2003) e Cardoso et al. (2004). Segundo Dhingra (1985) além do teor de umidade e temperatura de armazenagem, o grau de infecção inicial é um fator que determina diretamente a viabilidade dos fungos de armazenamento (*Aspergillus* e *Penicillium*) nas sementes. Uma vez que estes se encontram estabelecidos num lote de sementes, seu crescimento continuará mesmo com o uso de temperaturas e umidade inferiores às necessárias para que haja invasão destes em sementes sadias.

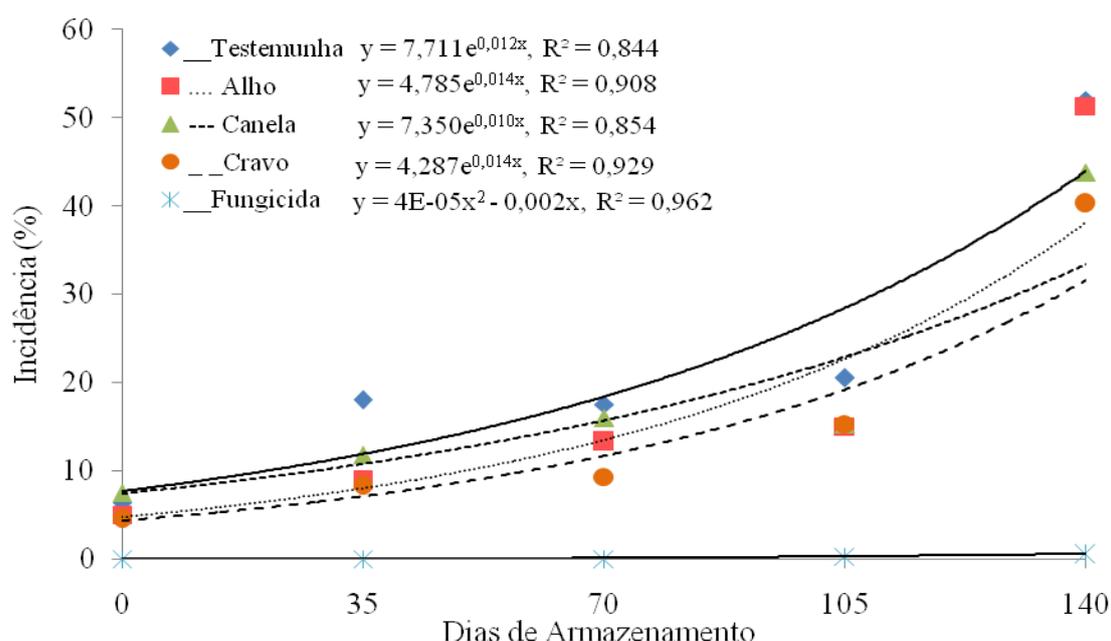


FIGURA 2. Incidência de *Penicillium* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

O melhor modelo que se ajustou, tanto no tratamento controle como para os extratos vegetais, foi o exponencial, podendo ser notado pequeno incremento na incidência do patógeno até os 105 dias, porém aos 140 dias de armazenamento foram registradas porcentagens superiores a 40%.

Dentre os patógenos encontrados nas sementes de soja, foi verificado que o fungo *Alternaria* spp. sofreu a maior redução com o ajuste do teor de umidade. Constatou-se incidência inicial de 31,2% do fungo nas sementes quando a umidade era de 15%, passando para 3% com 12% de umidade.

No Quadro 3 verifica-se que mesmo havendo menores valores na porcentagem de *Alternaria* spp. nas sementes tratadas com os extratos vegetais, diferenças significativas foram constatadas apenas para o tratamento fungicida. Aos 35 dias de armazenamento os extratos reduziram a incidência do patógeno em relação à testemunha, sendo o extrato de alho semelhante ao fungicida. Entretanto, aos 70 dias de armazenamento, houve aumento na incidência fúngica nos tratamentos com extratos vegetais. Comportamento semelhante foi observado por Coutinho et al. (1999). Os autores constataram que os extratos chegaram a apresentar controle de fungos, porém, possivelmente sofreram alterações que influenciaram sua persistência nas sementes, comprometendo a sua eficiência.

QUADRO 3. Porcentagem de incidência de *Alternaria* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	3,0 a	2,8 a	1,5 a	0,3 a	0,5 a
Ext. Alho	1,5 a	0,5 bc	1,5 a	0,3 a	0,0 a
Ext. Canela	2,0 a	0,8 b	1,3 a	0,3 a	0,0 a
Ext. Cravo-da-índia	1,3 a	0,8 b	1,3 a	0,5 a	0,0 a
Fungicida	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 a	0,0 a
CV (%)	54,85				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O fungicida eliminou o fungo *Alternaria* spp. das sementes de soja, não sendo possível ajustar o tratamento a nenhum modelo matemático (Figura 3). Foi observado um declínio linear do patógeno conforme houve aumento no tempo de armazenamento, para o tratamento testemunha e os extratos vegetais. Entretanto, com o uso dos extratos vegetais não

foi verificada a presença de *Alternaria* spp. nas sementes, aos 140 dias de armazenamento, porém, não foi notado diferença significativa entre os tratamentos. Silva et al. (2003) em trabalhos com sementes de paineira, observaram incidências praticamente constantes de *Alternaria* sp. durante 120 dias de armazenamento.

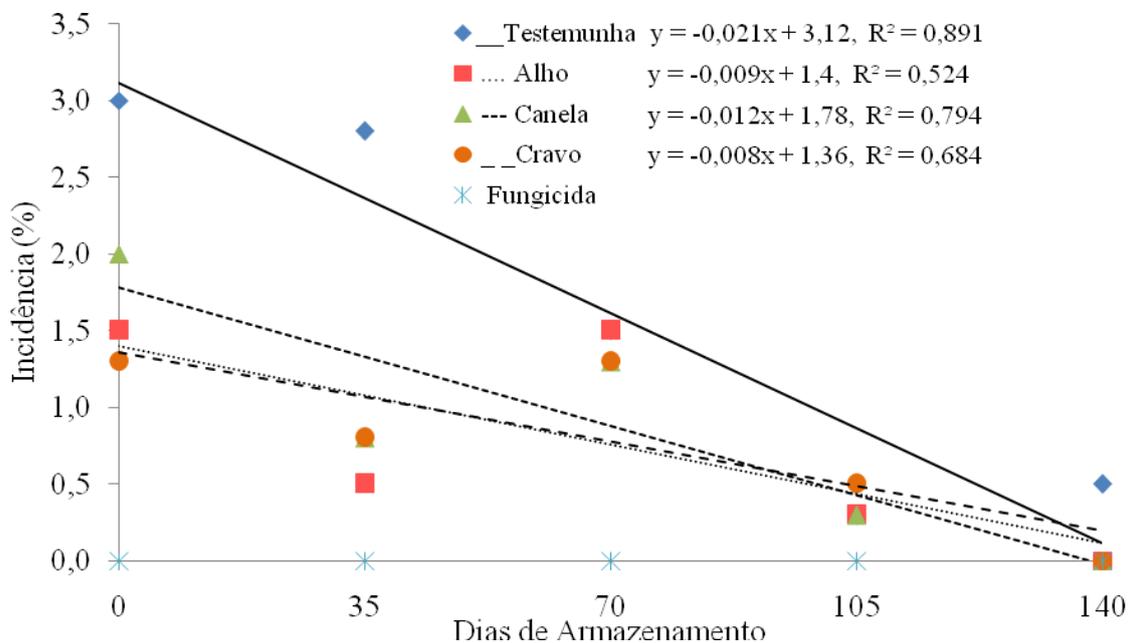


FIGURA 3. Incidência de *Alternaria* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

A porcentagem de incidência de *Botrytis* spp. também foi afetada pelo ajuste no teor de umidade de 15% para 12%, verificando-se incidências de 88,7% e 65,8%, respectivamente. O tratamento com fungicida proporcionou elevada redução sobre a incidência do patógeno, que aliado ao decréscimo no teor de umidade por ocasião do armazenamento, resultou na eliminação do patógeno a partir dos 70 dias de armazenamento (Quadro 4).

A utilização do extrato de cravo-da-índia resultou em menores incidências do patógeno, comparado à testemunha, durante todo o período de armazenamento. O extrato de alho, com exceção aos 105 dias, também proporcionou a redução do inóculo. Apesar das constantes variações observadas nas sementes tratadas com o extrato de canela, ao término das avaliações, o tratamento também apresentou maior controle em relação ao tratamento controle.

QUADRO 4. Porcentagem de incidência de *Botrytis* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	65,8 a	53,5 a	33,0 a	25,3 a	21,0 a
Ext. Alho	50,8 b	27,8 c	18,0 b	22,3 ab	12,5 b
Ext. Canela	61,0 a	43,8 b	25,8 ab	23,0 ab	10,8 b
Ext. Cravo-da-índia	47,8 b	34,8 bc	23,3 b	15,5 b	11,0 b
Fungicida	0,8 c	0,8 d	0,0 c	0,0 c	0,0 c
CV (%)	10,49				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi verificado que *Botrytis* spp. perde sua viabilidade durante o armazenamento, porém, ao final das avaliações ainda foi observada incidência de 21% no tratamento controle. Os tratamentos com extratos de canela e cravo-da-índia e a testemunha proporcionaram redução quadrática quanto à porcentagem de incidência do patógeno, no entanto, a redução do inóculo inicial ocasionada com a utilização dos extratos resultou, ao final do período de armazenamento, em menor incidência do patógeno. O modelo exponencial foi o que melhor representou o comportamento do fungo frente ao extrato de alho. Este efeito ocorreu devido ao maior controle do extrato de alho aos 35 e 70 dias de armazenamento, no entanto, nas demais avaliações, a pronunciada influência não se manteve (Figura 4).

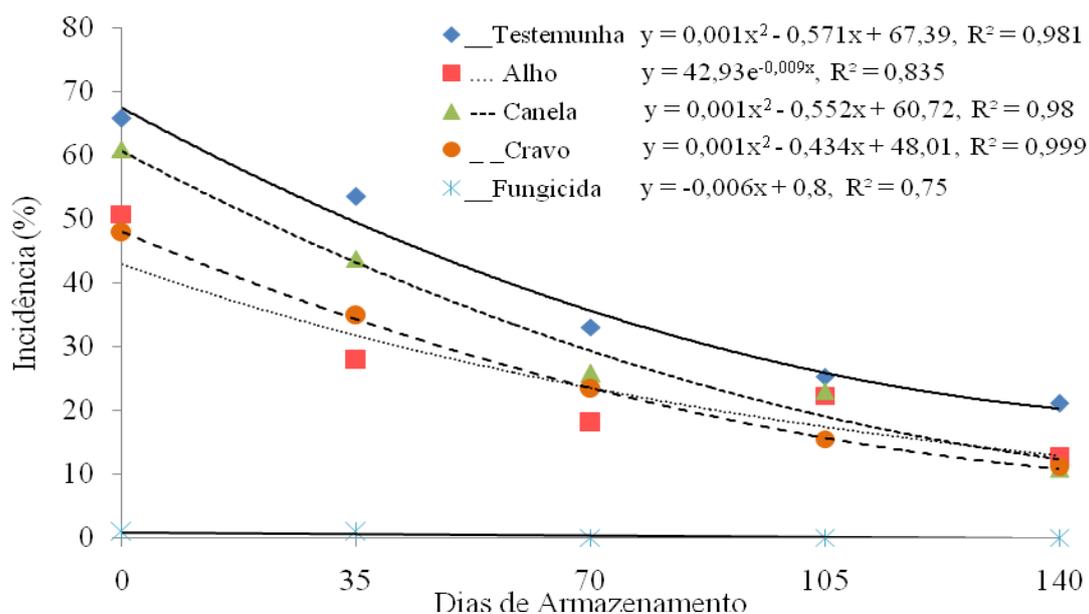


FIGURA 4. Incidência de *Botrytis* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

Com a utilização do fungicida, verificou-se incidência de 0,8% de *Cercospora kikuchii* logo após o tratamento de sementes. Nos demais períodos de armazenamento não foi constatada a presença do patógeno (Quadro 5). Todos os extratos vegetais empregados reduziram a porcentagem de incidência do fungo quando comparado à testemunha. Destaca-se o tratamento com extrato de alho, que demonstrou maior controle sobre o patógeno comparado aos demais extratos. Este comportamento se repetiu na segunda avaliação.

QUADRO 5. Porcentagem de incidência de *Cercospora kikuchii*, por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	49,5 a	40,8 a	23,5 a	2,5 a	0,0 a
Ext. Alho	32,0 c	24,3 c	13,5 b	0,3 b	0,0 a
Ext. Canela	39,0 b	31,0 b	16,8 b	1,0 a	0,0 a
Ext. Cravo-da-índia	41,5 b	31,0 b	18,0 ab	1,3 a	0,0 a
Fungicida	0,8 d	0,0 d	0,0 c	0,0 b	0,0 a
CV (%)	11,76				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 105 dias de armazenamento não foram detectadas diferenças entre o tratamento de sementes com fungicida e o extrato de alho, porém ambos proporcionaram melhores resultados que o tratamento controle e os extratos de canela e cravo-da-índia. Não foi constatada a presença do patógeno no último período de avaliação em nenhum tratamento adotado.

Foi observado um decréscimo na incidência de *Cercospora kikuchii* à medida que se aumentava o período de armazenamento (Figura 5). Pereira et al. (2007) verificaram acentuada redução de *C. kikuchii* até o terceiro mês de armazenamento, não observando a presença do patógeno aos seis e nove meses de armazenamento. Todavia, Zorato e Henning (2001) observaram que esse fitopatógeno perdeu apenas parte da viabilidade durante o período de armazenamento.

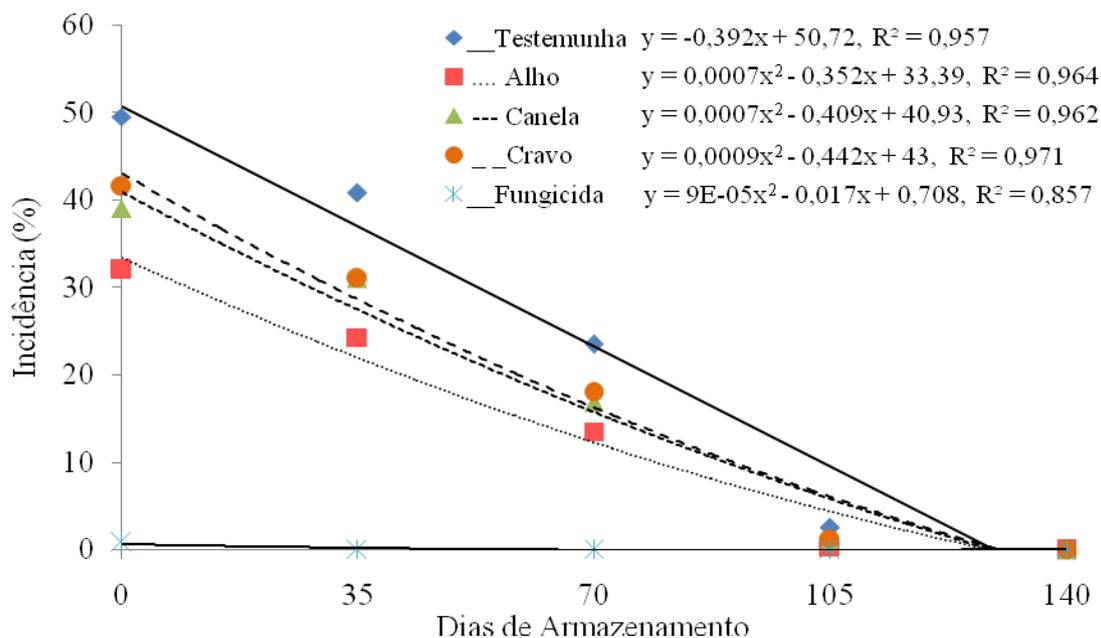


FIGURA 5. Incidência de *Cercospora kikuchii* em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

No tratamento controle foi verificada uma relação linear inversamente proporcional, onde com o aumento no período de armazenagem das sementes, houve uma redução na incidência de *C. kikuchii*. Os extratos vegetais proporcionaram uma redução mais acentuada sobre o patógeno que a testemunha, nas primeiras avaliações, ajustando-se deste modo um modelo de equação quadrática.

Em relação à *Colletotrichum* spp. foi observado que o fungicida e os extratos vegetais apresentaram eficiente controle sobre o patógeno quando comparado a testemunha (Quadro 6).

Os extratos de alho, canela e cravo-da-índia proporcionaram incidências de 4,0, 5,5 e 2,3% na primeira avaliação, respectivamente. A utilização destes extratos, entretanto, não possibilitou resultados semelhantes ao fungicida, porém, registram-se reduções na incidência do patógeno nas sementes de soja em torno de 57,7% com o uso de extrato de canela, 69,2% para o extrato de alho e 82,3% quando se utilizou o extrato de cravo-da-índia.

Aos 35 dias de armazenamento nota-se que o extrato de cravo-da-índia obteve resultados semelhantes ao fungicida, na incidência de *Colletotrichum* spp. nas sementes. A partir dos 70 dias de armazenamento foram verificados os mesmos resultados, onde os tratamentos com os extratos vegetais e com o fungicida resultaram em menores incidências do patógeno. Fato que pode estar associado à redução no inóculo inicial do fungo, como pode ser observado na primeira avaliação.

QUADRO 6. Porcentagem de incidência de *Colletotrichum* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	13,0 a	2,5 a	1,8 a	1,3 a	1,3 a
Ext. Alho	4,0 bc	1,3 ab	0,0 b	0,3 b	0,3 b
Ext. Canela	5,5 b	1,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
Ext. Cravo-da-índia	2,3 c	0,3 d	0,3 b	0,0 b	0,0 b
Fungicida	0,3 d	0,0 d	0,0 b	0,0 b	0,0 b
CV (%)	40,1				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Constata-se que no tratamento controle foi observado na primeira avaliação 13% de incidência do patógeno, decaindo até os 105 dias de armazenamento e se mantendo, nos mesmos patamares ao final das avaliações. Na Figura 6 está demonstrado o comportamento de *Colletotrichum* spp. ao longo do período de armazenamento.

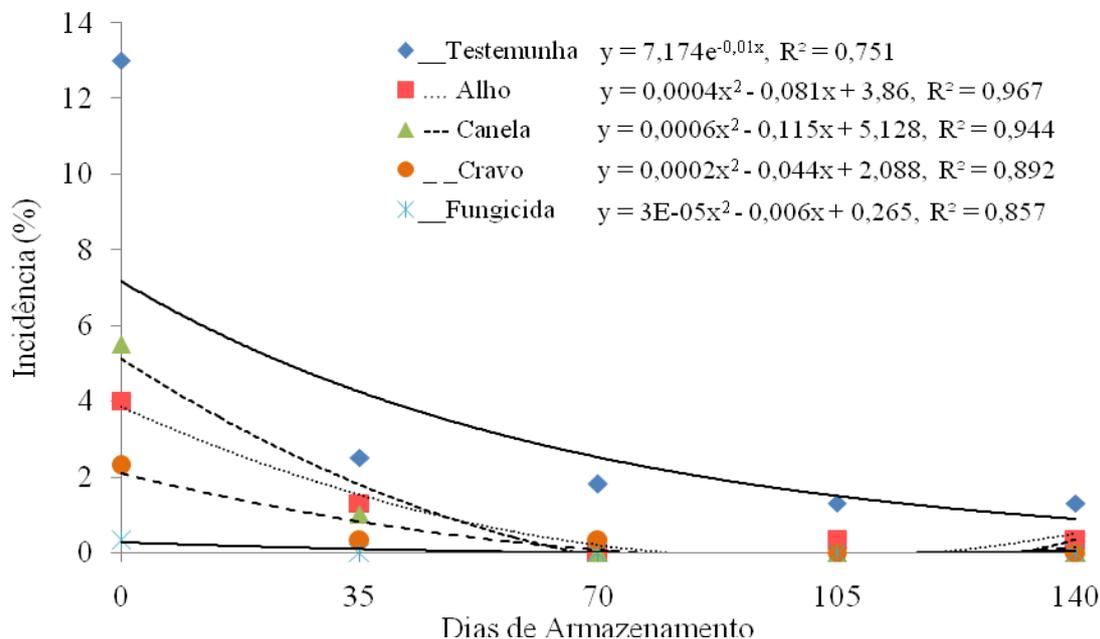


FIGURA 6. Incidência de *Colletotrichum* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

Quando as sementes foram tratadas com o fungicida e os extratos vegetais observam-se um declínio mais acentuado, a partir da primeira avaliação, na incidência do

patógeno. Aos 70 dias de armazenamento não foi constatada a presença de *Colletotrichum* spp. nas sementes quando submetidas aos extratos de alho e canela. Em relação ao extrato de cravo-da-índia, ainda foi constatada incidência do patógeno de 0,3% neste mesmo período, não sendo observado o inóculo posteriormente.

Galli et al. (2007) verificaram que sementes de soja armazenadas em câmara fria a 10°C e 50% de umidade relativa tiveram a incidência de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* reduzida ao longo de seis meses de armazenamento. No entanto, Silva et al. (2003) relataram aumento na população de *Colletotrichum* sp. quando sementes de paineira foram armazenadas a 23°C e umidade relativa de 48%. De acordo com Ito e Tanaka (1993), a infecção das sementes por *C. dematium* var. *truncata* se restringe ao tegumento, localizando-se na camada intermediária da semente, que é rica em amido. O embrião normalmente não é colonizado, mas quando infectado, garante a sobrevivência do patógeno por período prolongado de tempo, principalmente nas sementes armazenadas a baixas temperaturas.

A maior incidência fúngica nas sementes de soja foi ocasionada por *Fusarium* spp. A redução no teor de umidade previamente ao armazenamento, não influenciou a viabilidade do patógeno (Quadro 7).

QUADRO 7. Porcentagem de incidência de *Fusarium* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	99,8 a	99,3 a	96,8 a	93,3 a	80,8 a
Ext. Alho	94,0 b	86,3 b	85,3 b	69,3 b	71,5 b
Ext. Canela	93,8 b	89,5 b	84,5 b	70,0 b	58,8 c
Ext. Cravo-da-índia	94,0 b	91,0 b	84,3 b	76,0 b	70,5 b
Fungicida	13,8 c	11,5 c	12,5 c	6,8 c	0,8 d
CV (%)	3,95				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Constataram-se diferenças significativas entre os tratamentos logo na primeira avaliação, sendo observada uma pequena redução na porcentagem de *Fusarium* spp. com a utilização dos extratos vegetais, e queda mais expressiva por meio do tratamento com fungicida. Este comportamento se manteve até os 105 dias de armazenamento. Souza et al. (2007), tratando sementes de milho com diferentes concentrações dos extratos de alho e

capim-santo, verificaram que ambos os extratos vegetais promoveram redução da incidência de *F. proliferatum*, sendo os melhores resultados observados com o uso do extrato de alho na concentração de 10%.

Aos 140 dias de armazenamento verificou-se menor incidência fúngica nas sementes tratadas com o fungicida, seguido do extrato de canela. Os extratos de alho e cravo-da-índia promoveram reduções semelhantes entre si e significativamente superiores ao tratamento controle.

Foi verificado nos tratamentos controle e fungicida, que o patógeno manteve incidência praticamente constante até os 70 dias de armazenamento, sendo constatado posteriormente um decréscimo nas avaliações seguintes. Para o fungicida foi relatado incidência final de 0,8%, enquanto na testemunha mesmo ocorrendo esta redução, verificou-se aos 140 dias de armazenamento incidência de 80,8% (Figura 7). Corroborando com os resultados, Pereira et al. (2007) também observaram tendência de redução de *Fusarium*, somente após o terceiro mês de armazenamento.

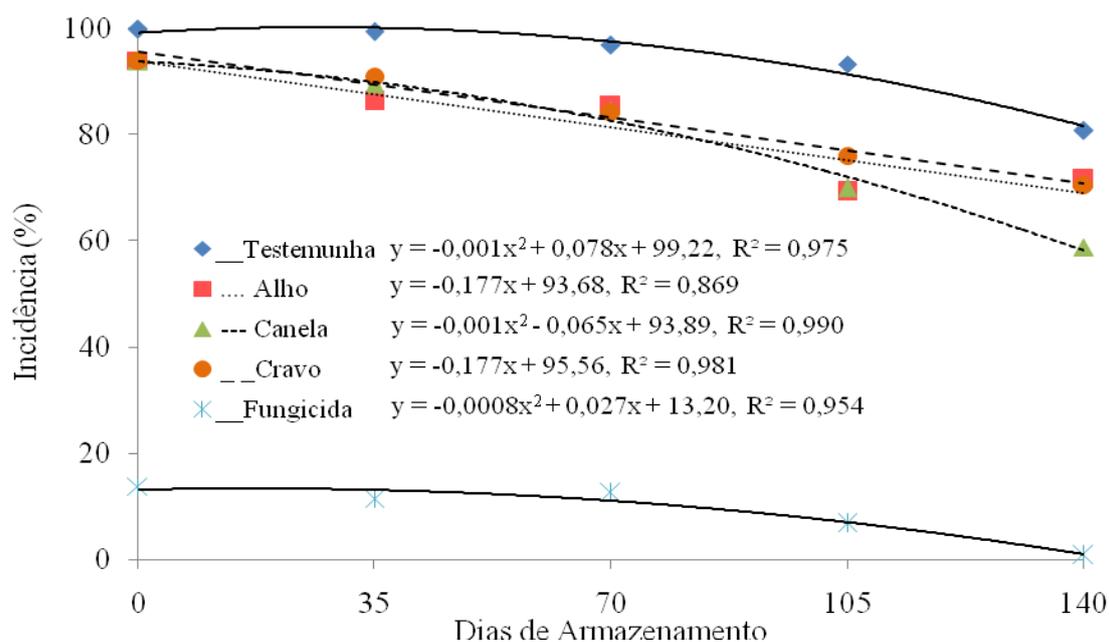


FIGURA 7. Incidência de *Fusarium* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

Verifica-se que os tratamentos com os extratos vegetais resultaram em declínio na porcentagem de incidência de *Fusarium* spp. no decorrer do armazenamento. O patógeno manteve comportamento semelhante, à utilização dos extratos de alho e cravo-da-índia. Nas sementes tratadas com extrato de canela, pode ser observada uma redução mais acentuada na incidência do patógeno a partir dos 70 dias de armazenamento. Souza et al. (2003) em

trabalhos com sementes de algodão, não verificaram controle de *Fusarium* sp. com a utilização do extrato de aroeira.

Telles Neto et al. (2007) observaram decréscimo linear na viabilidade de *F. graminearum* em sementes de trigo, relatando uma redução de 7,86% para cada mês de armazenamento. No entanto, Bizzeto e Homechin (1997) constataram que o gênero *Fusarium* spp. manifestou-se em elevado percentual em sementes de soja, independentemente do período de armazenamento.

De acordo com Tanaka et al. (2001) a sobrevivência dos fungos considerados de campo decresce de modo muito mais acentuado em condições ambientais, quando comparado àqueles armazenados em câmara fria. Porém, Galli et al. (2007) verificaram consistente redução de *Fusarium* sp. associados a sementes de soja armazenadas em câmara fria. Segundo Sisterna e Lori (1990), a manutenção da viabilidade de *Fusarium* spp. durante o armazenamento é influenciada pela localização interna deste nas sementes, sendo sua penetração facilitada por danos advindos do campo, principalmente aqueles causados por percevejos.

O tratamento de semente realizado com o fungicida e com o extrato de cravo-da-índia promoveram efetivo controle de *Phomopsis* spp., verificando-se reduções de 95,6 e 88,2% em relação à testemunha, respectivamente. Os relevantes resultados proporcionados pelo tratamento com extrato de cravo-da-índia mantiveram-se no decorrer do período de armazenagem, não sendo verificada diferença em relação ao fungicida (Quadro 8).

QUADRO 8. Porcentagem de incidência de *Phomopsis* spp., por período de armazenamento, em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	6,8 a	3,3 a	2,3 a	0,3 a	0,0 a
Ext. Alho	2,8 b	1,0 b	1,0 ab	0,0 a	0,0 a
Ext. Canela	3,3 b	0,8 bc	0,5 bc	0,0 a	0,0 a
Ext. Cravo-da-índia	0,8 c	0,3 cd	0,3 c	0,0 a	0,0 a
Fungicida	0,3 c	0,0 d	0,0 c	0,0 a	0,0 a
CV (%)	53,43				

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os extratos de alho e canela reduziram em 58,8 e 51,5%, respectivamente, a incidência do patógeno em relação à testemunha. A efetividade dos tratamentos em reduzir o inóculo inicial de *Phomopsis* spp., foi determinante na eliminação do patógeno aos 105 dias de armazenamento, enquanto nas sementes não tratadas ainda registrava-se a presença do fungo, embora sem diferença significativa entre os tratamentos.

Foi observada redução na viabilidade de *Phomopsis* spp. conforme aumentava-se o período de armazenamento para todos os tratamentos testados (Figura 8). Resultados semelhantes foram verificados por Zorato e Henning (2001) e Galli et al. (2007).

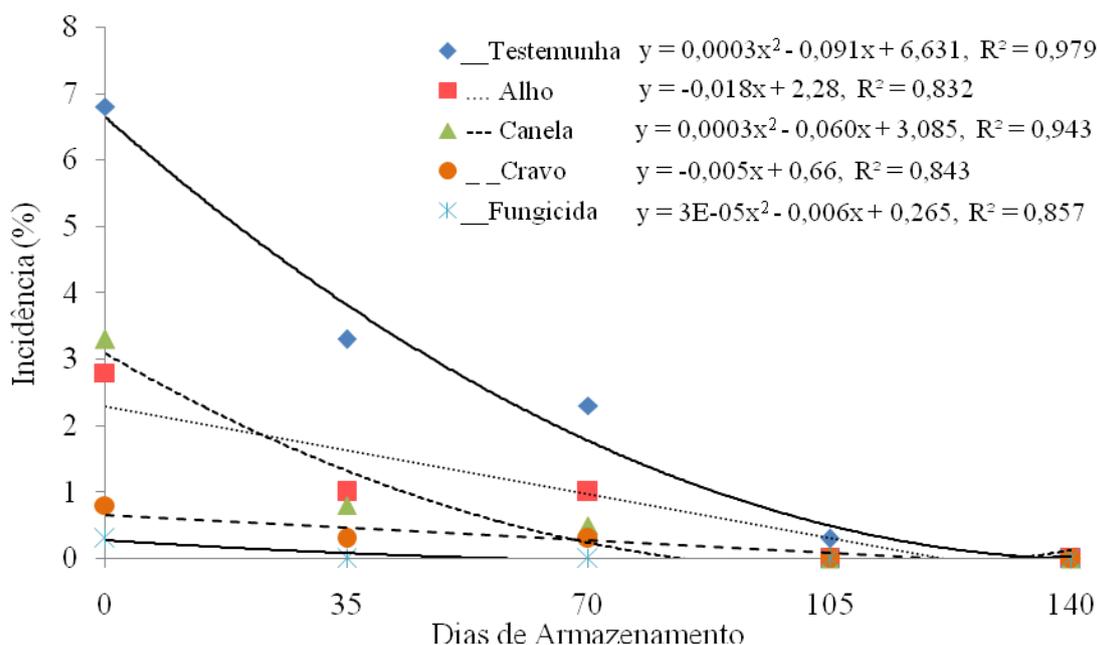


FIGURA 8. Incidência de *Phomopsis* spp. em sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

O controle verificado com o tratamento fungicida e o extrato de cravo-da-índia, na primeira avaliação, influenciou de modo efetivo a longevidade de *Phomopsis* spp. nas sementes. Entretanto, com o uso do fungicida não se verificou a presença do patógeno a partir dos 35 dias de armazenamento. Para o extrato de cravo-da-índia este fato só foi observado a partir dos 105 dias.

Para o extrato de canela ajustou-se o modelo quadrático, devido ao acentuado declínio na incidência de *Phomopsis* spp. a partir do tratamento de sementes. Já o modelo que melhor representou a incidência do patógeno quando submetidas ao extrato de alho foi o linear. No entanto, para ambos os tratamentos a incidência foi nula a partir dos 105 dias de armazenamento. No tratamento controle, apenas ao final das avaliações, não foi constatada a incidência do fungo. Pereira et al. (2007), analisando o desempenho de sementes de soja em

intervalos de três meses, não constatarem incidência do patógeno a partir do sexto mês de armazenamento.

Em relação à qualidade fisiológica das sementes verificou-se, por meio do resultado da análise de variância, interação significativa entre os fatores produtos x período de armazenamento, para a variável germinação padrão. Para o desenvolvimento de plântulas foi verificado efeito apenas do período de armazenamento. A emergência a campo realizada aos 140 dias de armazenamento apresentou efeito simples dos produtos utilizados no tratamento de sementes.

De acordo com Tanaka et al. (2001) fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, dependendo das condições de temperatura e umidade, podem se desenvolver e provocar danos durante o armazenamento, reduzindo a germinação e o vigor de sementes. Entretanto, no presente estudo, não foi detectada relação entre a incidência de fungos e a qualidade fisiológica das sementes, apesar das elevadas incidências de alguns patógenos. Comportamento semelhante foi relatado por Pereira et al. (1994), que também constataram que a ação de fungos não foi a causa principal da baixa qualidade das sementes.

Nos dois primeiros períodos de armazenamento, não foram verificadas diferenças significativas entre os produtos utilizados no tratamento de sementes, para a porcentagem de germinação (Quadro 9). Os resultados da germinação de sementes de soja constatados por Cruz et al. (2000) evidenciaram que a água destilada aromatizada de todas as plantas medicinais estudadas pelos autores, em duas formas de tratamento (fumigação e imersão) proporcionaram porcentagem de germinação superior àquela verificada na testemunha. Viegas et al. (2005), avaliando a influência de produtos sintéticos e de origem vegetal sobre a qualidade de sementes de amendoim, verificaram que o fungicida Captan e os produtos a base de pó de alho e de canela favoreceram a germinação e o vigor das sementes, assim como promoveram a redução de plântulas deterioradas.

Aos 70 dias de armazenamento foi observada maior germinação no tratamento fungicida comparado à testemunha, sendo os resultados obtidos com o uso dos extratos vegetais considerados intermediários, pois os mesmos foram, tanto semelhantes ao tratamento controle, como também ao fungicida.

Aos 105 dias de armazenamento verificou-se que o fungicida proporcionou porcentagens de germinação superiores ao extrato de cravo-da-índia e a testemunha, sendo semelhante aos extratos de alho e canela. Com o uso deste último constatou-se melhor desempenho na germinação quando comparado ao tratamento controle, sem, entretanto, diferir dos demais tratamentos.

QUADRO 9. Germinação (%) de sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos, por período de armazenamento. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Dias de Armazenamento				
	0	35	70	105	140
Testemunha	98,0 a	91,0 a	88,0 b	81,0 c	78,5 b
Ext. Alho	95,5 a	94,5 a	93,5 ab	87,5 abc	82,5 ab
Ext. Canela	99,0 a	92,5 a	91,5 ab	88,0 ab	83,0 ab
Ext. Cravo-da-índia	97,0 a	93,0 a	92,0 ab	86,5 bc	84,0 ab
Fungicida	95,5 a	92,5 a	95,0 a	93,5 a	89,0 a
CV (%)	3,78				

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Ao final das avaliações nota-se o mesmo comportamento verificado na análise aos 70 dias de armazenamento. Gonçalves et al. (2003), em trabalhos com tratamento químico e natural sobre a qualidade de sementes de feijão, não observaram diferenças significativas na germinação entre os tratamentos, no terceiro e no sexto mês de armazenamento.

Os resultados evidenciam a tendência natural de redução do potencial de germinação das sementes ao longo do armazenamento, sendo verificada esta redução em maior intensidade no tratamento controle. No tratamento com fungicida observou-se a maior preservação da viabilidade das sementes (Figura 9).

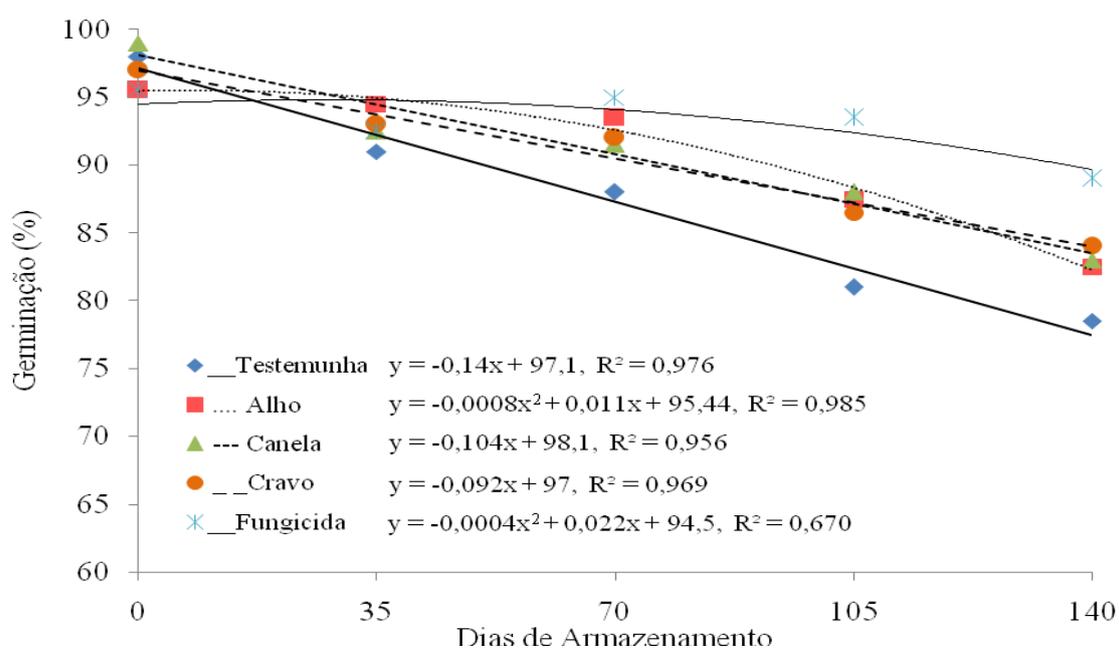


FIGURA 9. Germinação (%) de sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

O processo de redução da viabilidade de sementes durante o período de armazenamento, segundo Vieira e Carvalho (1994) teria, como origem, a desestruturação dos sistemas de membranas celulares, causada por grupos químicos de alta reatividade que recebem a denominação de radicais livres, que se formariam pela ação de processos metabólicos normais, mas que poderiam ter sua atuação acelerada por injúrias sofridas pelas sementes antes da armazenagem.

Foi observada redução linear da germinação das sementes quando tratadas com o extrato de canela e cravo-da-índia. O modelo que melhor se ajustou ao extrato de alho foi o quadrático, pois este tratamento manteve praticamente constante a porcentagem de germinação até os 70 dias de armazenamento, sendo posteriormente constatado um decréscimo, que resultou, ao término das avaliações, em valores semelhantes aos demais extratos utilizados. Lopes et al. (2000) verificaram drástica redução na germinação de sementes de feijão não tratadas, a partir dos 45 dias de armazenamento, apresentando-se aos 180 dias totalmente inviáveis. No entanto, quando estas sementes foram tratadas com produtos naturais e químico a redução foi menos acentuada.

Os comprimentos da parte aérea e do sistema radicular de plântulas oriundas de sementes armazenadas apresentaram uma relação linear inversamente proporcional, com a tendência de reduzirem o seu desenvolvimento à medida que se prolonga o período de armazenamento (Figura 10).

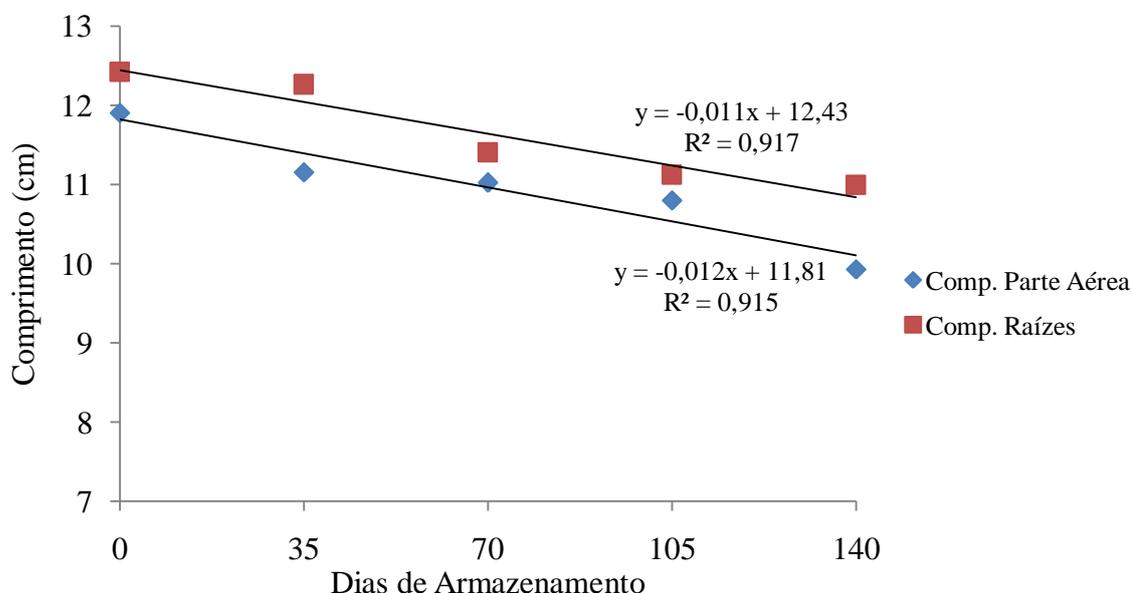


FIGURA 10. Desenvolvimento de plântulas de soja armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

Na Figura 11 estão demonstrados os valores da massa seca de plântulas, no qual se ajustou a um modelo de equação quadrática. Comportamento verificado devido a um ligeiro aumento desta variável nos primeiros dias de armazenamento, todavia, nota-se a partir deste período que a massa seca das plântulas apresentou declínio no decorrer do armazenamento. Fato associado à redução, tanto no comprimento da parte aérea como do sistema radicular das plântulas ao longo do armazenamento.

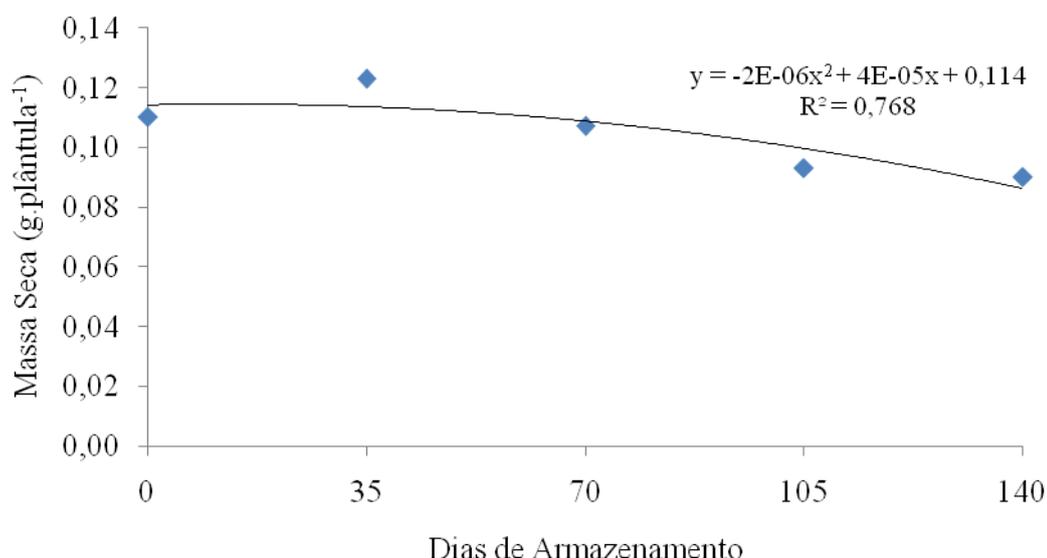


FIGURA 11. Massa seca de plântulas de soja armazenadas durante 140 dias. Dourados – MS, 2008.

A diferença significativa no vigor de plântulas foi verificada apenas para a emergência a campo realizada aos 140 dias de armazenamento das sementes (Quadro 10). Observou-se que as sementes tratadas com fungicida apresentaram maior emergência a campo em relação ao tratamento controle, sem, entretanto, diferir dos tratamentos com extratos vegetais, concordando com os resultados de Coutinho et al. (1999) que não verificaram diferenças na emergência a campo e no índice de velocidade de emergência de sementes de feijão tratadas com extratos vegetais e fungicidas.

Segundo Lopes et al. (2000) sementes perdem seu vigor ao longo do armazenamento. Cardoso et al. (2004) verificaram que a porcentagem média de plântulas emergidas em campo diminuíram com o avanço do período de armazenamento.

No estudo foram verificados de modo geral menores valores na emergência a campo realizada aos 140 dias de armazenamento, em relação à emergência inicial. Entretanto, analisando o vigor por meio do índice de velocidade de emergência observa-se que houve um aumento para as sementes armazenadas. Vale salientar que sementes de soja iniciam seu

processo de germinação e emergem rapidamente quando o solo apresenta boa disponibilidade hídrica e temperatura adequada. Considerando irrigações semelhantes em ambas as avaliações, constata-se que a temperatura, nos períodos de estudo, foi o fator que proporcionou esta diferença. Foi verificada no período de condução da primeira avaliação, temperatura média de 18,2°C, sendo a mínima de 8,8°C e máxima de 23,6°C, enquanto na outra avaliação a temperatura média foi de 26,1°C, com mínimo de 19,7°C e máximo de 30,4°C. De acordo com Embrapa (2006), 25°C é a temperatura ideal para uma emergência rápida e uniforme. Portanto, o aumento no índice de velocidade de emergência foi ocasionado pelas condições ambientais e não resultante do aumento do vigor das sementes.

QUADRO 10. Percentual de emergência a campo (EC) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de soja submetidas a diferentes tratamentos, em dois períodos de armazenamento. Dourados - MS, 2008.

Tratamentos	Período de Armazenamento			
	0		140	
	EC ^{ns}	IVE ^{ns}	EC	IVE ^{ns}
Testemunha	96,0	14,1	80,0 b	19,1
Ext. Alho	96,7	14,1	86,2 ab	20,1
Ext. Canela	96,4	14,2	83,3 ab	19,6
Ext. Cravo-da-índia	96,9	14,3	87,4 ab	20,8
Fungicida	95,5	13,7	91,9 a	22,0
CV (%)	1,49	2,80	6,08	6,37

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

NS: Não significativo

4.4 CONCLUSÕES

Os extratos de cravo-da-índia e canela exercem controle superior a 50% na incidência de *Aspergillus* spp., *Colletotrichum* spp. e *Phomopsis* spp. O extrato de alho controla com a mesma eficiência apenas *Colletotrichum* spp. e *Phomopsis* spp.

A incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. aumenta com o período de armazenamento, enquanto *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* spp., *Phomopsis* spp. e *Fusarium* spp. perdem sua viabilidade.

Os tratamentos com extratos vegetais são eficientes na manutenção da qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas, a semelhança do fungicida.

As condições de armazenamento proporcionam redução na viabilidade e no vigor de sementes soja.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C.; QUEIROZ, D. M. Modelamento da perda de qualidade de sementes de soja, em função das condições iniciais e da atmosfera no armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.3, p.403-408, 2000.

BANSAL, R. K.; SOBTI, A. K. An economic remedy for the control of two species of *Aspergillus* on groundnut. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.43, p.451-452, 1990.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M. Efeito do período e da temperatura de armazenamento na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja com altos índices de *Phomopsis sojae* (Leh.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.2, p.296-303, 1997.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M. Microrganismos associados a sementes de soja submetidas ao armazenamento, à assepsia e à retirada de tegumento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.130-139, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CARDOSO, P. C.; BAUDET, L.; PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A. Armazenamento em sistema a frio de sementes de soja tratadas com fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.26, n.1, p.15-23, 2004.

CASTRO, P. R. C.; RODRIGUES, J. D.; MORAIS, M. A.; CARVALHO, V. L. M. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). **Planta Daninha**, Campinas, v.6, n.1, p.79-85, 1983.

COUTINHO, W. M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de extratos de plantas Anacardiáceas e dos fungicidas Benomyl e Captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.560-568, 1999.

CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.15, p.28-34, 2000.

DHINGRA, O. O. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, n.1, p.139-146, 1985.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2007**. Sistema de Produção, n.11. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 225p.

GALLI, J. A.; PANIZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Sobrevivência de patógenos associados a sementes de soja armazenadas durante seis meses. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.2, p.205-213, 2007.

GONÇALVES, E. P.; ARAÚJO, E.; ALVES, E. U.; COSTA, N. P. Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Revista Biociência**, Taubaté, v.9, n.1, p.23-29, 2003.

GOULART, A. C. P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1467-1473, 2001.

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W. F. B.; FUJINO, M. T. **Viabilidade técnica do tratamento de sementes de soja com fungicidas antes do armazenamento**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1999. 41p. (Boletim de Pesquisa, 2).

HAMAWAKI, O. T.; JULIATTI, F. C.; GOMES, G. M.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, V. L. M. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de genótipos de soja do ciclo precoce/médio em Uberlândia, Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.201-205, 2002.

ITO, M. F.; TANAKA, M. A. S. **Soja – principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. 48p.

KROHN, N. G.; MALAVASI, M. M. Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com fungicidas durante e após o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.26, n.2, p.91-97, 2004

LOPES, K. P.; BRUNO, R. L. A.; BRUNO, G. B.; SOUZA, A. P. Produtos naturais e fosfeto de alumínio no tratamento de sementes de feijão-macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) armazenadas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.2, p.109-117, 2000.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS: UFLA: FAEPE, 2000. 138p.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MATOS, F. J. A. **As plantas da farmácia viva**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997. v.1, 57p.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.4, p.1101-1105, 1994.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London : MacMillan, 1979. v.1, 839p.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E.; BOTELHO, F. J. E.; OLIVEIRA, G. E.; TRENTINI, P. Desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e peliculizadas durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.3, p.656-665, 2007.

PEREIRA, G. F. A.; MACHADO, J. C.; SILVA, R. L. X.; OLIVEIRA, S. M. A. Fungos de armazenamento em lotes de sementes de soja descartados no estado de minas gerais na safra 1989/90. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.2, p.216-219, 1994.

SILVA, R. T. V.; HOMECHIN, M.; FONSECA, É. P.; SANTIAGO, D. C. Tratamento de sementes e armazenamento na sanidade de sementes de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p.255-260, 2003.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTTO, V. J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n.1, p.5-8, 1996.

SISTERNA, M. N.; LORI, G. A. Longevidad y efecto de los hongos patógenos de semillas de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.195-199, 1990.

SOUZA, A. A.; BRUNO, R. L. A.; ARAÚJO, E.; BRUNO, G. B. Micoflora e qualidade fisiológica de sementes do algodoeiro tratadas com fungicidas químicos e extrato de aroeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.25, n.1, p.56-64, 2003.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.3, p.501-508, 2001.

TELLES NETO, F. X. B.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Viabilidade de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo durante o armazenamento. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.414-415, 2007.

VIEGAS, E. C.; NASCIMENTO, F. G.; MEYRELLES, B. G.; ROSSETTO, C. A. V. Qualidade fisiológica de sementes armazenadas de amendoim influenciada pelos produtos sintéticos e de origem vegetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.79-85, 2005.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

ZORATO, M. F.; HENNING, A. A. Influência de tratamentos fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.236-244, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram constatados dentre os extratos vegetais testados na pesquisa, que àqueles provenientes de bulbos de alho, casca de canela e botão floral de cravo-da-índia, influenciaram de modo mais efetivo o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus* spp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani*, *Penicillium* spp. e *Phomopsis* sp.

O extrato aquoso de cravo-da-índia pode ser uma alternativa eficiente para estudos *in vitro*, pois o mesmo inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fungos fitopatogênicos estudados, com a vantagem de não sofrer alterações de seus princípios ativos, quando submetido a diferentes metodologias de esterilização.

O extrato aquoso de alho apresenta atividade antifúngica, entretanto, sofre alterações em relação a esta atividade quando esterilizado por meio de diferentes temperaturas, requerendo esterilização por filtragem, de modo a não perder suas propriedades fungitóxicas. O extrato de canela apresenta maior estabilidade, em relação ao extrato de alho, porém também tem sua atividade antifúngica reduzida quando exposto às metodologias de esterilização que utilizem temperaturas superiores a 100°C.

Nos estudos sobre o efeito de diferentes concentrações de extratos vegetais sobre fungos fitopatogênicos foi observada uma relação denominada dose-dependente, onde maiores atividades antifúngicas são constatadas nas maiores concentrações. Todavia, o extrato aquoso de cravo-da-índia inibiu completamente o crescimento dos fungos *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp., a partir das concentrações 7,6%, 7,5%, 8,9% e 7,1%, respectivamente, o que proporcionaria a mesma viabilidade que as maiores concentrações, porém com menores custos. O uso do extrato de alho promoveu total inibição apenas de *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp., a partir da concentração de 9,8%.

O controle dos fungos associados às sementes de soja, com a utilização dos extratos vegetais, não ocorreu sobre toda a micoflora encontrada, pressupondo que os extratos estudados apresentam especificidade a certos patógenos ou ainda que a metodologia aplicada no tratamento de sementes não seja a mais apropriada. Nesse sentido, futuros estudos deveriam ser desenvolvidos, com o intuito de testar diferentes técnicas de tratamentos de sementes com extratos vegetais, como por exemplo, a imersão.

O tratamento com fungicida proporcionou maior eficiência no controle dos patógenos associados às sementes de soja. No entanto, em relação à qualidade fisiológica tanto o produto químico como os extratos vegetais foram eficientes na manutenção da qualidade das sementes quando armazenadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C.; FARONI, L. R. D. Efeito das condições e período de armazenagem sobre a viabilidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.4, n.1, p.1-7, 2000.
- BORDINGNON, J. R.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: Embrapa Soja, 1994. 32p. (Documentos, 70).
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- CIRIO, G. M.; LIMA, M. L. R. Z. C. Métodos de detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de milho (*Zea mays* L.) em 270 dias de armazenamento. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.4, n.1, p.19-23, 2003.
- COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: diversidade microbiana e agricultura sustentável. In: WORKSHOP SOBRE BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas, SP.
- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.7, p.15-24, 2006.
- CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. In: XX CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 20. 1997, São Paulo. **Resumos...** São Paulo-SP, 1997.
- CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; INOUE, M. H.; ÁVILA, M. R.; BATISTA, M. A.; STANGARLIN, J. R. Potencial de plantas medicinais no controle de patógenos que incidem sobre sementes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1. 1999, Londrina. **Anais...** Londrina-PR, 1999.
- CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.15, p.28-34, 2000.
- FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.1, p.29-38, 2007.

GONÇALVES, E. P.; ARAÚJO, E.; ALVES, E. U.; COSTA, N. P. Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Revista Biociência**, Taubaté, v.9, n.1, p.23-29, 2003.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51p. (Documentos, 235).

HENNING, A. A.; CATTELAN, A. J.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; COSTA, N. P. **Tratamento e inoculação de semente de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1994. 6p. (Comunicado Técnico, 54).

ITO, M. F.; TANAKA, M. A. S. **Soja – principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. 48p.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS: UFLA: FAEPE, 2000. 138p.

MALLOZZI, M. A. B.; CORREA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.2, p.5-26, 1998.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p.513-516, 2006.

PESSOA, M. N. G.; LIMA, C. S. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre *Fusarium* spp. em sementes de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 5., 1998, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa, 1998.

RANGEL, M. A. S.; GABRIEL, M.; SMIDERLE, O. J. Avaliação de substâncias alternativas para proteção de grãos de soja contra fungos. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém. **Anais...** Belém-PA, 2006.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.123-127, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. Cap.5, p.125-138.

SILVA, M. B.; NICOLI, A.; COSTA, A. S. V.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C. M.; SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471. 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.11, p.16-21, 1999.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, Poznan, v.9, p.151-159, 1992.