



ESCOLA MUNICIPAL ALBERTO SANTOS DUMONT

**APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE IN VITRO DO FUNGO
CAUSADOR DA ANTRACNOSE DO MORANGO**

TOLEDO-PR

2022



NATALIA CRISTINA RODRIGUES

LAYZA TAIS FABRI

ISABELLY GONÇALO DA SILVA

DIONÉIA SCHAUREN

**APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE IN VITRO DO FUNGO
CAUSADOR DA ANTRACNOSE DO MORANGO**

Relatório apresentado à 6ª FEMIC - Feira
Mineira de Iniciação Científica.

Orientação do Prof. Dionéia Schauren.

TOLEDO-PR

2022



RESUMO

Na atualidade o uso de defensivos agrícolas ou agroquímicos tem aumentado bastante sempre visando uma maior produção, possibilitando assim a resistência de patógenos, o desequilíbrio biológico, dentre outros danos ao meio ambiente. Pesquisadores têm mostrado interesse na pesquisa com extratos vegetais para tentar reduzir os impactos causados pelo uso excessivo de agroquímicos. O presente estudo foi desenvolvido no Colégio Estadual Jardim Porto Alegre, Toledo-PR, no Clube de Ciências. Foi preparado o meio BDA e adicionados os extratos de hibisco, ipomeia, arruda, pau amargo, melão de são Caetano nas concentrações de 5; 10; 15 e 20 g L⁻¹. As folhas foram secas no forno; na estufa. Os extratos foram armazenados em um local sem incidência de luz por 7 dias. Inoculou-se o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com uma única incisão no centro da placa. Após inseridos no centro da placa a mesma foi vedada com plástico filme e colocada em uma BOD com foto período de 12 horas e temperatura de 27+-1 °C até uma das colônias atingir o tamanho máximo na placa. O estudo encontra-se em andamento e o resultado será avaliado medindo o tamanho da colônia utilizando duas retas ortogonais. Após a avaliação será calculada a média e será realizada a análise estatística usando o teste de média Scott-Knott a 0,05% de significância.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duchesne; Morango; Controle Aleternativo.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	7
3 OBJETIVO GERAL	8
4 METODOLOGIA	9
5 RESULTADOS OBTIDOS	19
6 CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS	21



1 INTRODUÇÃO

No sistema agrícola atual, utiliza-se principalmente de defensivos agrícolas e agrotóxicos, sempre visando uma maior produção. Devido ao fortalecimento dos patógenos e a resistência destes ao controle químico contínuo, torna-se necessária a utilização de métodos alternativos de controle, que são economicamente mais acessíveis, seguros e menos poluentes (STANGARLIN et al., 1999).

A incidência da antracnose nos cultivos necessita de medidas de controle. No sistema de cultivo convencional, o uso de fungicidas químicos é frequentemente utilizado para garantir o sucesso da produção, causando efeitos negativos para a saúde humana, animal e o ambiente (LIBERATO et al., 1999). O uso indiscriminado de agroquímicos é considerado como um dos mais agravantes problemas da agricultura (PRIMAVESI, 1997), provocando a contaminação do solo, água, animais, a resistência de patógenos, o desequilíbrio biológico, dentre outros sérios danos ao meio ambiente (WIT et al., 2009; KORBES et al., 2010). Surge, portanto, a necessidade de adaptar métodos alternativos para controle de doenças e pragas em culturas tradicionais.

Existem diversas opções de estudo em controle alternativo, possibilitando encontrar plantas específicas que atuam como controladoras ou inibidoras do desenvolvimento de patógenos exclusivos. Dentre os métodos utilizados para o controle alternativo do *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), destacam-se os óleos essenciais e extratos vegetais, que se mostraram efetivos contra esse patógeno (LO CANTORE et al, 2004).

Pesquisadores tem mostrado interesse na pesquisa com extratos vegetais, uma vez que existe uma grande diversidade de substâncias que as mesmas possuem. A flora brasileira é abundante, tendo vegetais que apresentam substâncias que possuem ação biológica contra patógenos ou induzem a resistência de plantas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003). Extratos são preparações concentradas, provenientes de plantas frescas ou secas, que podem ou não ter sofrido algum tratamento prévio, como a moagem e até mesmo a inativação enzimática, preparados com solvente para isolar os princípios ativos (SALES, 2004).



A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) é muito difundida no Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e Goiás, além do Distrito Federal, em virtude da sua alta rentabilidade. A produtividade e a qualidade do morango são influenciadas pelo fotoperíodo, pela temperatura, pelo período de dormência, por pragas e doenças, por condições do solo, pela adubação, por flutuações na umidade do ar e do solo, entre outros fatores (UENO, 2004). Consequentemente, cultivares de morangueiro diferem muito entre si, a depender da sua adaptação às condições regionais e ambientais. É por esse motivo que uma cultivar que se desenvolve satisfatoriamente em uma região não apresenta o mesmo desempenho em outro local com condições ambientais diferentes.

A antracnose em frutos pode ser causada por várias espécies de *Colletotricum*: *C. acutatum* J. H. Simmonds, *C. fragariae* A. N. Brooks, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz. (teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk) e *C. dematium* (Pers.), sendo que a espécie mais comumente encontrada é *C. acutatum* (MAAS, 1998). Os sintomas causados pelas diferentes espécies em frutos são similares. A podridão de antracnose inicia-se com uma lesão de cor castanho-clara e manchas de aspecto encharcado em frutos maduros, que rapidamente se desenvolvem para lesões arredondadas e firmes, de cor marrom-escura a preta ou castanha.

Em condições úmidas, forma-se uma massa de conídios sobre o centro da lesão, de coloração salmão, rosada ou alaranjada. Posteriormente, as lesões permanecem firmes até atingirem o fruto inteiro, que pode secar e mumificar. Lesões em frutos verdes podem ser restritas a um único aquênio, que, por sua vez, fica preto e ligeiramente afundado. Conforme o fruto amadurece, uma lesão típica de antracnose desenvolve-se no aquênio e, depois, uma massa de conídios pode ser vista nesse local (MAAS, 1998).



2 JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças que acometem a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) a antracnose é considerada uma das mais relevantes (MAAS, 1998). No morangueiro, é causada pelo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* atingindo a plantação e também o pós colheita dos frutos.

Em condições favoráveis para seu desenvolvimento como alta temperatura e alto índice pluviométrico, esta doença pode ocasionar perdas de até 100% da produção. Além disso, as lesões, que ocorrem principalmente nos frutos, deturpam os mesmos tornando-os inviáveis ao comércio o que acaba prejudicando os produtores.

Mesmo que exista maneiras efetivas de controlar a doença com o auxílio de químicos, isto pode gerar e selecionar patógenos mais resistentes (SALES JÚNIOR et al., 2007). Desta forma identificar novos extratos com potencial de inibição deste patógeno se torna necessário e uma opção promissora para a agricultura orgânica.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Encontrar um meio alternativo de controlar a antracnose a base de extratos vegetais onde substituiriam os agroquímicos utilizados em plantações.

3.2 Objetivos específicos

- O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do extrato aquoso de ipoméia (*Stictocardia macalusoi*), Arruda (*Ruta graveolens* L), Hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis*), Pau amargo (*Quassia amara* L.) e Melão de São Caetano (*Momordica charantia*) em diferentes concentrações no controle ou redução do desenvolvimento *in vitro* do patógeno causador da antracnose em frutos de morango.
- Substituir os defensivos agrícolas utilizados em produções.



4 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ciências do Colégio Estadual Jardim Porto Alegre em Toledo-Paraná.

Inicialmente preparou-se o meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), utilizando 170 gramas de batata inglesa, 20 gramas de dextrose, 12 gramas de Ágar, todos os componentes foram pesados em uma balança analítica de precisão em suas respectivas quantidades e reservados em local sem humidade. Colocou-se batata em um Becker, cozinhando-a em um bico de Bunsen juntamente com 1 Litro de água destilada como o mostrado na figura 3. Quando a mistura se encontra homogênea (após a batata dissolver), a mesma é coada e extraído o caldo.

Figura 1: Preparando meio BDA.



Fonte: Isabelly Gonçalo da Silva.

Figura 2: Preparando meio BDA.



Fonte: Layza Tais Fabri.

**Figura 3:** Preparando meio BDA.**Fonte:** Natalia Cristina Rodrigues.

O caldo é acondicionado em um Becker completando até alcançar a marca de 1 Litro. Após isso, é levado ao bico de Bunsen, adiciona-se a dextrose, mexendo até a homogeneização, espera-se até o ponto de ebulição e adiciona-se o Ágar, em agitação constante. Após todos os componentes dissolvidos, distribui-se o BDA pronto em Erlenmeyers de 250 mL, e adicionados os extratos nas seguintes concentrações de 5; 10; 15 e 20 g L⁻¹. Como mostra a tabela a seguir:

Tabela 1: Tratamentos dos extratos.

TRATAMENTOS SEGUNDA ETAPA	
T1	Controle 0 gL ⁻¹
T2	Hibisco (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>), 05 gL ⁻¹
T3	Hibisco (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>), 10 gL ⁻¹
T4	Hibisco (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>), 15 gL ⁻¹
T5	Hibisco (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>), 20 gL ⁻¹
T6	Ipomeia (<i>Stictocardia macalusoii</i>), 05 gL ⁻¹
T7	Ipomeia (<i>Stictocardia macalusoii</i>), 10 gL ⁻¹
T8	Ipomeia (<i>Stictocardia macalusoii</i>), 15 gL ⁻¹
T9	Ipomeia (<i>Stictocardia macalusoii</i>), 20 gL ⁻¹
T10	Arruda (<i>Ruta graveolens</i> L), 05 gL ⁻¹
T11	Arruda (<i>Ruta graveolens</i> L), 10 gL ⁻¹
T12	Arruda (<i>Ruta graveolens</i> L), 12 gL ⁻¹
T13	Arruda (<i>Ruta graveolens</i> L), 20 gL ⁻¹
T14	Pau amargo (<i>Quassia amara</i> L.), 05 gL ⁻¹
T15	Pau amargo (<i>Quassia amara</i> L.), 10 gL ⁻¹
T16	Pau amargo (<i>Quassia amara</i> L.), 15 gL ⁻¹
T17	Pau amargo (<i>Quassia amara</i> L.), 20 gL ⁻¹
T18	Melão de São Caetano (<i>Momordica charantia</i>), 05 gL ⁻¹
T19	Melão de São Caetano (<i>Momordica charantia</i>), 10 gL ⁻¹



T20

Melão de São Caetano (*Momordica charantia*), 15 gL⁻¹

T21

Melão de São Caetano (*Momordica charantia*), 20 gL⁻¹

Figura 4: Preparando meio BDA.



Fonte: Layza Tais Fabri.

Figura 5: Adicionando ágar no meio BDA.



Fonte: Isabelly Gonçalo da Silva.

Figura 6: Inserindo 180 mL de meio BDA nos Erlenmeyer's.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.



Os extratos de hibisco, ipomeia, arruda, pau amargo e melão de são Caetano foram preparados da seguinte forma: após as folhas serem coletadas, e postas para secar, no forno as folhas foram secas na estufa durante 24 horas a 70°C.

Figura 7: Extrato de Hibisco.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.

Figura 8: Extrato de ipomeia.



Fonte: Layza Tais Fabri.

Figura 9: Extrato de arruda.



Fonte: Isabelly Gonçalo da Silva.



Figura 10: Extrato de pau amargo.



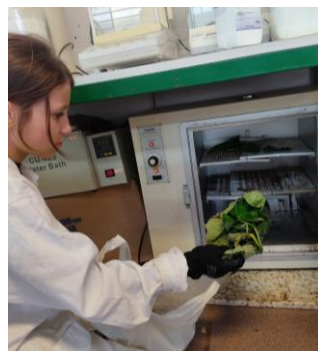
Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.

Figura 11: Extrato de melão de são caetano.



Fonte: Layza Tais Fabri.

Figura 12: Desidratando os extratos.



Fonte: Isabelly Gonçalo da Silva.

Após estarem secas as mesmas foram trituradas em moinhos de facas, até ficarem uma espécie de pó fino. Após, foram acondicionadas em frascos de vidro com tampas metálicas para evitar a umidade.



Figura 13: Triturando os extratos desidratados.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.

As folhas para os extratos foram preparadas: pesando em uma balança analítica de precisão nas concentrações ditas anteriormente (5 g L^{-1} ; 10 g L^{-1} ; 15 g L^{-1} ; 20 g L^{-1}), estas foram acondicionadas em garrafas de 200 mL (usou-se regra de três para calcular a redução do peso dos extratos afim de não desperdiçar material) anteriormente higienizadas. Após prontos, foram armazenados em um local sem incidência de luz por uma semana (7 dias), para a concentração das folhas na água.

Figura 14: Pesando os extratos.



Fonte: Layza Tais Fabri.

Figura 15: Diluindo os extratos em 100 mL de água.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.



Após esse período os extratos foram coados e com o auxílio de uma pipeta de 20 mL foram inseridos no BDA anteriormente preparado e acondicionado em um Erlenmeyer, cada um contendo um tratamento. Após foi tampado com plástico filme, e fechado com papel Kraft para evitar a contaminação, em seguida levados a autoclave para a esterilização, juntamente com as placas de Petry previamente embaladas em papel Kraft.

Figura 16: Identificando os Erlenmeyers.



Fonte: Dionéia Schauren.

Figura 17: Pipetando os extratos.



Fonte: Dionéia Schauren.

Figura 18: Embalando os materiais para autoclavar.



Fonte: Layza Tais Fabri.



Figura 19: Colocando os materiais embalados na autoclava.



Fonte: Isabelly Gonçalves da Silva.

Figura 20: Meios e placas de petry autoclavados.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.

Após a autoclavagem, o meio foi vertido nas placas de petry também autoclavadas, em ambiente previamente esterilizado. Após a geleificação, dentro das placas, efetuou-se a inoculação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* a partir de uma matriz pura isolada, para a inoculação utilizou-se um incisor, inserindo estirpe da matriz no meio.

Após a inoculação, as placas foram embaladas com plástico filme e armazenadas de forma aleatória em uma BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C.

Figura 21: Vertendo os meios nas placas de Petry.



Fonte: Isabelly Gonçalves da Silva.



Figura 22: Inoculando o fungo no meio BDA.



Fonte: Layza Tais Fabri.

Figura 23: Embalando as placas com plástico filme.



Fonte: Dionéia Schauren.

Após uma das colônias atingir o tamanho total da placa será medido o diâmetro dos fungos em duas retas ortogonais A e B (horizontal e vertical), a cada 48 horas, as medições estão sendo realizadas e serão finalizadas quando um dos tratamentos tiver a colônia do mesmo diâmetro da placa.

Figura 24: Medindo o diâmetro dos fungos.



Fonte: Dionéia Schauren.

Figura 25: Medindo o diâmetro dos fungos.



Fonte: Natalia Cristina Rodrigues.

Título do projeto



Após o período estabelecido de análise, compararam-se as médias dos diâmetros finais de cada colônia, separados por grupos formados pelo teste de média de Skott – Knott a 0,05% de significância.



5 RESULTADOS OBTIDOS

Para o teste *in vitro* obteve-se resultados significativos para os tratamentos que estão identificados com A e os identificados com B e C foram os tratamentos semelhantes estatisticamente ao controle (tabela 2). Porém a uma clara redução de tamanho micelial em praticamente todos os tratamentos testados, sendo que o estrato de hibisco mais se destacou no quesito redução da colônia.

Tabela 2: Teste de média de Skott – Knott a 0,05% de significância.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	RESULTADOS DO TESTE
T2- Hibisco 05 gL ⁻¹	2.080000	A
T4- Hibisco 15 gL ⁻¹	2.360000	A
T5- Hibisco 20 gL ⁻¹	2.380000	A
T8- Ipomeia 15 gL ⁻¹	2.400000	A
T6- Ipomeia 05 gL ⁻¹	2.520000	A
T18- Melão de São Caetano 05 gL ⁻¹	2.660000	A
T12- Arruda 15 gL ⁻¹	2.660000	A
T19- Melão de São Caetano 10 gL ⁻¹	2.680000	A
T9- Ipomeia 20 gL ⁻¹	2.780000	A
T20- Melão de São Caetano 15 gL ⁻¹	2.820000	A
T15- Pau amargo 10 gL ⁻¹	2.980000	A
T7- Ipomeia 10 gL ⁻¹	2.980000	A
T17- Pau amargo 20 gL ⁻¹	2.980000	A
T16- Pau amargo 15 gL ⁻¹	3.140000	A
T10- Arruda 05 gL ⁻¹	3.300000	A
T3- Hibisco 10 gL ⁻¹	3.460000	A
T11- Arruda 10 gL ⁻¹	3.920000	B
T13- Arruda 20 gL ⁻¹	3.960000	B
T21- Melão de São Caetano 20 gL ⁻¹	3.980000	B
T14- Pau amargo 05 gL ⁻¹	4.860000	C
T1- Controle 0 gL⁻¹	4.930000	C

FONTE: Natalia Cristina Rodrigues.

Resultados de Ribeiro (2016), conseguiu controlar a antracnose causadora de contaminação no mamão em cultivo *in vitro* usando *T. harzianum*. Já para Oliveira et. al (2013), conseguiu controlar o *Colletotrichum* em bananas no pós colheita na utilização do fungo *Trichoderma* sp., controlando um porcentual de inibição do patógeno em média de 56%.



6 CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Concluiu-se que para os tratamentos eficazes no controle da antracnose os extratos de Hibisco 05, 10, 15 e 20 gL^{-1} ; Ipomeia 05, 10, 15 e 20 gL^{-1} ; Arruda 15 gL^{-1} ; Pau amargo 10, 15 e 20 gL^{-1} ; Melão de São Caetano 05, 10 e 15 gL^{-1} , já os demais não são estatisticamente viáveis para o controle alternativo do *Colletotrichum gloesporioides*.



REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, et al., **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. 820 p.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
- KORBES, D. et al. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. **Rev. Soc. Bras. Fonoaudiol.** 2010.
- LIBERATO, J.R et al. Fitotoxicidade de Fungicidas Triazois ao Mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p. 112-113. 1999.
- LO CANTORE, P. et al. Antibacterial Activity of Coriandrum sativum L. and Foeniculum vulgare Miller Var. vulgare (Miller) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7862-7866, 2004.
- MAAS, J. L. **Compendium of strawberry diseases**. St. Paul: APS Press, 1998. 98 p.
- OLIVEIRA, E.S.; VIANA, F.M.P.; MARTINS, M.V.V.; PESSOA, M.N.G. Alternativas limpas para controle da podridão pós-colheita causada por Colletotrichum em banana. Fortaleza: **Embrapa** Agroindústria Tropical, 2013.
- PRIMAVESI, A. **Agroecologia: Ecosfera, tecnosfera e agricultura**. São Paulo: Nobel. p.199, 1997.
- RIBEIRO, J.G.; SERRA, I.M.R.S.; ARAÚJO, M.U.P. **Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por Colletotrichum gloeosporioides em mamão**. Summa Phytopathologica, v.42, n.2, p.160-164, 2016.
- SALES JÚNIOR, R.; TORRES, G. R. C; GUIMARÃES, I. M. Panorama da resistência a fungicidas no gênero Colletotrichum. In : **WORKSHOP REGIONAL SOBRE Colletotrichum**, 1. 2007, Recife. Colletotrichum 2007. RECIFE: UFRPE, 2007.
- SALES, A. L. Estudo de extratos vegetais e bagaço de cana-de-açúcar na desinfecção de águas residuárias. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande-PB. 99p. 2004.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. ; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, supl., p.554-556, 2003.



SILVA, G. S. (2006) Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 31, p. 9.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.11, p. 16-21, 1999.

TÖFOLI, J.G. Morango, controle adequado. **Revista Cultivar**, São Paulo, n.38, p.1 2006. [online]

TOZZE JR., H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JR., N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

UENO, B. Antracnose do morangueiro (“flor preta”) causada por *Colletotrichum acutatum*. Londrina: **Iapar**, 1996. 11 p. (Iapar. Informe da Pesquisa, 119).

WIT, J. P. et al. Integração de métodos físicos e biológicos para o controle de doenças e pragas em lírios e espatifilo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas, **Embrapa**: Jaguariuna-SP, Cap 22, p. 330-335. 2009.