



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**EXTRATOS AQUOSOS DE ALHO (*Allium sativum* L.) E SISAL
(*Agave sisalana* Perrine) NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* E
DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

LIANE SANTOS SALES SOUZA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MAIO - 2010

**EXTRATOS AQUOSOS DE ALHO (*Allium sativum* L.) E SISAL
(*Agave sisalana* Perrine) NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* E
DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

LIANE SANTOS SALES SOUZA

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 2000

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S729 Souza, Liane Santos Sales

Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal, / Liane Santos Sales Souza. _ Cruz das Almas, BA, 2010.

f. 91. ; il.

Orientador: Ana Cristina Fermino Soares

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Área de Concentração: Fitotecnia.

1. Sisal. 2. Sisal-doenças. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Tecnológicas. II. Título.

CDD 633.577

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LIANE SANTOS SALES SOUZA**

Dra. Ana Cristina Fermino Soares
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientadora)

Dra. Franceli da Silva
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

Aos meus filhos, Jullia, Juliana e Murilo, que mesmo com toda a minha ausência sempre me receberam com um sorriso no rosto.

DEDICO

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim e sabiam que um dia eu chegaria lá.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, todo poderoso, pelo dom da vida, a graça concedida do acordar a cada manhã e pela força de sempre seguir em frente em busca dos meus objetivos apesar de todas as dificuldades;

A Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares, pelo apoio nos momentos difíceis, pela orientação, amizade, disponibilidade em contribuir na realização deste projeto e na confiança em minhas idéias;

A Prof^a. Dr^a. Franceli da Silva pelos ensinamentos sobre extratos vegetais e pela boa vontade em ajudar sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza, pelos ensinamentos e boa vontade em ajudar nos momentos difíceis;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento, pela atenção, boa vontade e ensinamentos;

A laboratorista Zozilene Nascimento Santos Teles, por todo apoio, paciência em ensinar e ajudar, carinho e dedicação;

A doutoranda Jurema Rosa de Queiroz Silva, pela boa vontade em ajudar e nas sugestões de grande contribuição para meu aprendizado;

Ao doutorando Jefferson Oliveira de Sá, por todo o companheirismo, disponibilidade de estar apoiando a implantação de alguns experimentos além das sugestões de grande ajuda;

A doutoranda Kátia Cristina Magalhães de Abreu, pela realização das análises estatísticas além das sugestões dadas;

Ao pós-doutorando Marlon da Silva Garrido, pela realização das análises estatísticas;

A mestranda Carolina Yamamoto Santos Martins pela companhia, amizade e apoio nos momentos difíceis;

A mestranda Lorena Barbosa Varjão, pela ajuda, boa companhia e ânimo;

A graduanda em Ciências Biológicas Yslai Silva Peixoto, pelo companheirismo, ajuda nos momentos difíceis e pela força que tem um exemplo para muitas pessoas;

Aos amigos e colegas Josilda, Lica, Cristiane, Verinha, Jack, Shirley, Eliana, Darcilúcia, Lucimare, Rafael, Márcia, Adailson, Augusto, Nailson, Aline, Patrícia, Jacqueline Leite, Cláudia, Ana Cláudia, Edilla, Cleidiane, pelo convívio e amizade;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB pelos ensinamentos;

Aos colegas do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias (turma 2008) e do curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola pelo convívio e amizade;

A minha vó, Hilda de Jesus Santos, mulher guerreira e temente a Deus, que apesar de não ter frequentado escolas têm grande sabedoria;

A minha mãe Maria Helena pelo amor e exemplo de dedicação ao ensino, em quem sempre me espelhei;

Ao meu pai que, apesar da distância, sempre esteve presente em meu coração e pelo exemplo de força e perseverança em buscar os objetivos desejados;

A minha tia Maria José pelo carinho, amor e pelas palavras de ânimo e incentivo;

As minhas irmãs Luize e Livia que fizeram e fazem parte de minha trajetória de vida;

Aos meus irmãos Jéssica e Caíque Luiz, que apesar do pouco convívio temos laços em comum que nunca se apagarão;

Aos tios e tias, primos e primas que sempre acreditaram em mim, Hilzete, Zito, Lícia, Josenito, Edmundo, Marlene, Hilvânia, Hernetete, Hilmar, Mara, Mirian, Eveline, Enne Caroline, Neto;

A minha sogra Raimunda e cunhada Jose, que foram minhas substitutas quando eu não podia estar com meus filhos;

Ao meu esposo Helberte pelo amor, carinho, compreensão e ajuda;

Enfim, a todos que sempre acreditaram junto comigo em meus sonhos e que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

**“Sucesso é uma questão de não desistir,
e fracasso é uma questão de desistir cedo demais.”**

Walter Burke

**“As pessoas que vencem neste mundo são as
que procuram as circunstâncias de que
precisam e, quando não as encontram, as
criam.”**

Bernard Shaw

“Um ao outro ajudou e ao seu companheiro disse: esforça-te...”

Isaías 41:6

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
EXTRATO AQUOSO DE ALHO (<i>Allium sativum</i> L.) NO CONTROLE DE <i>Aspergillus niger</i> E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine).....	18
Capítulo 2	
EXTRATO AQUOSO DE SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine) NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E MANCHAS FOLIARES CAUSADAS POR <i>Aspergillus niger</i> NO SISAL	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

EXTRATOS AQUOSOS DE ALHO E SISAL (*Agave sisalana* Perrine) NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

Autor: Liane Santos Sales Souza

Orientador: Ana Cristina Fermino Soares

Resumo: O Brasil é um país com extensa diversidade de plantas, muitas destas com comprovado potencial antifúngico. Vários extratos vegetais apresentam comprovada ação tóxica contra fungos e bactérias fitopatogênicas. O extrato de alho tem sido muito estudado devido a sua ação inibitória sobre o crescimento micelial e esporulação de vários fungos. O extrato aquoso de folhas de sisal tem ação inibitória contra nematóides, carrapatos e mosquitos. A podridão vermelha do sisal, causada por *Aspergillus niger*, já se encontra disseminada em 100% dos plantios de sisal na Bahia, com incidência média variando de 5 a 33% e vem se agravando pela falta de métodos de controle. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos aquosos de alho e de folhas de sisal no controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal. O extrato aquoso de alho, nas concentrações acima de 3%, quando não esterilizado em autoclave, inibe em 100% o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. niger*. Entretanto, este extrato não foi eficiente no controle da podridão vermelha em mudas de sisal. O extrato da folha de sisal estimula o crescimento e esporulação de *A. niger* e aumenta a severidade da doença, acelerando o aparecimento dos sintomas e morte da planta. Estes testes indicam que o resíduo fresco de sisal, constituído por 96% da polpa da folha, oriundo do desfibramento das folhas de sisal, não deve ser utilizado para adubação dos plantios de sisal. O extrato aquoso de alho, por apresentar eficácia *in vitro*, deverá ser mais estudado, destacando-se a necessidade de avaliação de diferentes formas de aplicação do extrato na planta.

Palavras - chave: extratos vegetais, *Allium sativum* L., Aspergilose, controle alternativo

AQUEOUS EXTRACTS OF GARLIC AND SISAL LEAVES (*Agave sisalana* Perrine) ON CONTROL OF *Aspergillus niger* AND RED ROT DISEASE OF SISAL

Author: Liane Santos Sales Souza

Advisor: Ana Cristina Fermino Soares

Abstract: Brazil has a wide diversity of plants, several of them with antifungal activity. Several plant extracts have been studied and have proven their fungitoxic action against pathogenic fungi and bacteria. Garlic extract has been widely used and presents inhibitory effect against mycelial growth and sporulation of several fungi. Aqueous extract from sisal leaves have shown inhibitory effects against nematodes, ticks and mosquitoes. Sisal red rot disease, caused by *Aspergillus niger*, is disseminated in 100% of sisal plantations, with average incidences varying from 5 to 33%, and this incidence is aggravated due to lack of control methods. The aim of this study was to evaluate the effect of aqueous extracts of garlic and sisal leaves on control of *Aspergillus niger* and red rot disease in sisal seedlings. Garlic aqueous extract, in concentrations above 3%, when not autoclaved, inhibited 100% of mycelial growth, sporulation and spore germination of *A. niger*. On the other hand, the aqueous garlic extract had no effect on control of red rot disease of sisal seedlings, under greenhouse conditions. Sisal leaf aqueous extract stimulates growth and sporulation of *A. niger* and causes an increase in disease severity, accelerating symptoms development and plant death. This study indicates that sisal waste products, composed of 96% of leaf pulp after fiber extraction, should not be used by farmers for fertilization of sisal plantations. Garlic aqueous extract, since it has in vitro efficacy for control of *A. niger*, should be further tested with emphasis on different forms of plant application to the extract.

Key-words: plant extracts, *Allium sativum* L, Aspergillosis, alternative control

INTRODUÇÃO

Controle de fungos fitopatogênicos com extratos vegetais

Com mais de 56.000 espécies (excluindo fungos), o Brasil tem uma das floras mais ricas do mundo, com quase 19% das espécies a nível mundial (GIULIETTI, et al. 2005). No caso dos fungos, segundo PEIXOTO (2003), as estimativas indicam existirem no Brasil entre 12,5 e 13,5 mil espécies e, com exceção das espécies vegetais de importância medicinal, muito pouco se conhece a respeito da composição química de 99,6 % das plantas que compõem a flora brasileira (MING, 1996).

Fungicidas originados de plantas são utilizados há séculos. Entretanto, as pesquisas envolvendo a procura de fungicidas obtidos de plantas só vêm aumentando nos últimos vinte anos. Trabalhos mostram o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2003). Um grande número de plantas apresenta propriedades antifúngicas em seus extratos. Essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença a ser controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do extrato (SILVA et al., 2005).

As substâncias químicas extraídas das plantas, normalmente são classificadas em metabólitos primários e metabólitos secundários (VIVAN, 2005). Os metabólitos primários são substâncias necessárias no desenvolvimento fisiológico da planta e possuem papel importante no metabolismo celular básico (TAIZ e ZEIGER, 2004). Por outro lado, os metabólitos secundários são substâncias que não tem função no metabolismo primário da planta, mas

frequentemente têm papel ecológico como atração de polinizadores, defesa contra microrganismos, insetos e predadores, e também contra outras plantas (FUMAGALI et al., 2008).

Os metabólitos secundários são sintetizados em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, sendo utilizados comercialmente como produtos farmacêuticos ou inseticidas (VIVAN, 2005). Compostos de origem vegetal podem se constituir em importantes agentes de controle de pragas e micro-organismos patogênicos, pela fácil obtenção e utilização, pelo baixo custo e por minimizarem os problemas apresentados pelos produtos químicos sintéticos (MORAIS et al., 2009).

A necessidade de diminuir a dependência por agrotóxicos na agricultura tem gerado uma enorme demanda por trabalhos de pesquisa visando o desenvolvimento de métodos alternativos de controle fitossanitário, adotando uma nova visão de agricultura que trata a natureza como um sistema vivo que reage a toda e qualquer interferência que altere a sua estrutura e funções (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003). Neste sentido, a utilização de extratos vegetais no controle de fitopatógenos tem recebido destaque, pela abundância dos recursos vegetais brasileiros e pelo fácil acesso ao produtor rural (DEQUECH et al., 2008).

O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, por exemplo, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que validam sua eficácia (HERNANDEZ et al., 1998; OWOLADE et al. 2000; MORAIS, 2004). Extratos vegetais brutos são usados como defensivos agrícolas na agricultura orgânica há algum tempo, como é o caso do extrato de cavalinha (*Equisetum pyramidale*), urtiga (*Urtica dioica*) e nim (*Azadirachta indica*), entre outros (ABREU JÚNIOR, 1998). Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos e óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (CUNICO et al., 2003).

O alho e sua ação antimicrobiana

O alho (*Allium sativum* L.) tem sua origem na região da Sicília, Ásia Central e vários pontos da Europa e do Ocidente (CORREA, 1975). Pertence à família Liliaceae e a depender da região pode ter várias sinonímias como alho-comum,

alho bravo, alho-do-reino, alho branco (LORENZI, 2002). É uma planta bulbosa e herbácea, com folhas estreitas, longas e pontiagudas, lineares, subuladas, fistulosas, com inflorescência em umbela, pedunculada, com flores alvas ou levemente esverdeadas (GALANTE, 2008).

A característica marcante é o bulbo (cabeça) que é envolvido por invólucros que reúnem os bulbilhos (dentes), que por sua vez também são envoltos por invólucros próprios que podem ter coloração esbranquiçada, rósea ou violeta. Possui forte cheiro e sabor sendo usado pelo homem ao longo da história na culinária e como recurso terapêutico (VIEIRA, 1992; SILVA et al., 2002).

O nome botânico do alho pode ser uma palavra latina derivada do cético *all*, que significa ardente, o que corresponde à sensação que o paladar produz. Desde o Egito antigo esta planta era usada como remédio e sua atividade antibiótica foi observada por Pasteur em 1958. Em toda a literatura é uma das plantas mais citadas para fins medicinais e nos últimos anos foi a segunda mais vendida nos Estados Unidos (DE SOUZA, 2010).

A principal substância que compõe o sabor característico do alho é a dialila dissulfeto que compõe aproximadamente 70% dos compostos voláteis deste produto (WU et al. 1996). Entre os princípios ativos presentes estão alicina, ajoeno, ácido fosfórico livre, óleo volátil, essências sulfurada e oxigenada, aliina, sulfureto de alila, sulfeto de alilo, alilglucósio, óxido dialila dissulfeto, alinase, alitiamina, sulfuretos, hormônios, resinas e os compostos isotiocianato, inulina, nicotinamina e galantamina (CORREA, 1975; VIEIRA, 1992).

CHUNG (2006) descobriu que o extrato de alho tem propriedades antioxidantes, em decorrência dos compostos presentes como a aliina, alicina, alil cisteína e dissulfeto dialila, quando preparados quimicamente ou por purificação direta, protegendo o organismo contra a ação dos radicais livres.

Em pesquisas conduzidas *in vivo* e *in vitro* foram identificados no alho dois princípios antibacterianos distintos: alicina (CAVALLITO e BAILEY, 1944) e garlicina (MACHADO et al. 1948), ambos de ação contra bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Na medicina popular, os bulbilhos do alho são utilizados na forma de infusão ou de óleo, sendo empregados no tratamento das infecções do sistema respiratório. Também têm sido popularmente utilizados na

forma de extratos aquosos e alcoólicos, considerando-se seu potente efeito antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, hepatoprotetor, viril, hipolipidêmico e antiagregante plaquetário (AMAGASE et al. 2001; KASUGA et al. 2001), antimicrobiana (GIOVANELA, 2002) e antioxidante (KHOSLA et al. 2004). Outras ações farmacológicas estão sendo registradas em estudos com ratos (MUKHERJEE et al. 2004) e humanos (HODGE et al., 2002).

O extrato de alho é usado atualmente como bactericida, fungicida, vermífugo, antiviral e antiprotozoário (CARRICONDE 1988; TESKE, 1995; ALONSO, 1998; DANTAS, 2003). O óleo de alho tem sido usado em muitos experimentos para avaliação da atividade antifúngica (PAI, 1995; SOVOVA, 2002) e antihelmíntica (AMARAL et al., 2006).

A literatura científica relata a ação antifúngica do extrato de alho sobre fitopatógenos como *Alternaria brassisicola*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea* e *Plectosphaerella cucumerina* (*Fusarium tabacinum*) (CURTIS et al. 2004) e o controle de *Aspergillus flavus* em sementes (BILGRAMI et al. 1992; VIEGAS, 2005). O extrato aquoso de alho afeta o crescimento micelial de *Phomopsis viticola* e *Elsinoe ampelina* (LEITE et al. 2009), controla fitopatógenos da soja (VENTUROSIO, 2009) e *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro (NASCIMENTO et al., 2008).

Aspergillus niger

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencem aos ascomicetos e são muito utilizados na produção de alimentos, ácido cítrico, glucônico e gálico (LEONEL, 1995). Muitas espécies são encontradas na natureza, vivendo de forma saprófita causado podridão em órgãos vegetais, a exemplo de sementes armazenadas em condições de elevada umidade (FELIX, 2007). A espécie *Aspergillus niger*, dentre todas do gênero, é a mais fácil de ser identificada devido à característica micelial esbranquiçada a amarelada de onde partem conídios escuros (PELCZAR et al., 1980).

Segundo ABARCA et al. (1997) o *A. niger* é uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (*Generally Regarded As Safe*) conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA) devido à baixa toxicidade e pela

capacidade de alguns isolados produzirem ocratoxina A em baixas quantidades. É muito estudado na área da biotecnologia, no que se refere à secreção de proteínas, degradação de enzimas, efeitos ambientais de translocação de biomassa e processos de fermentação (SCOTT, 2006).

Em estudos realizados com estirpes atoxigênicas, VARGA et al. (2000) relatam que estas têm se mostrado capazes de decompor micotoxinas em substratos. Resultado semelhante foi obtido por NASSER et al. (2003) em que isolados atoxigênicos de *A. niger* foram selecionados como possíveis antagonistas para espécies toxigênicas do gênero. Este é um fungo comum da microbiota do solo e produz enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam a lignocelulose, atuando no ciclo do carbono na natureza (GOMES, 2007). As espécies do gênero *Aspergillus* crescem em altas concentrações de açúcar, nutrindo-se de água extraída de substâncias relativamente secas (PELCZAR et al., 1980).

Segundo estudos *in vitro* realizados por AGUIAR et al. (2008) o *A. niger* é produtor de celulasas sob condições nutricionais controladas, apresentando atividade celulolítica nas condições estudadas de pH 5,0 e temperatura de 50°C em testes realizados *in vitro*. Estudos vêm sendo realizados na utilização deste microrganismo para degradação de resíduos poluentes deixados no ambiente (BOAVENTURA et al., 2004).

Entretanto, os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados importantes produtores de micotoxinas (NUNES, 2003), dentre elas a aflatoxina que é altamente tóxica e carcinogênica para homens e animais, tornando-se um fator preocupante para a indústria alimentícia (AMADO, 2010).

Além disso, *A. niger* causa doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou obstrução aérea recorrente, afecção em cavalos atletas que resulta na diminuição do desempenho, intolerância ao exercício, dispnéia expiratória, tosse e perda de peso nos casos crônicos graves (THOMASSIAN, 2005). Em seres humanos, causa aspergilose, aspergilloma, colonização intracavitária pulmonar em pacientes imuno-supressivos e é o agente mais frequente encontrado em otomicose (SEVERO, 1987).

Em plantas de amendoim, *A. niger* causa podridão do colo (MORAES et al., 1997) e no sisal a podridão vermelha do caule e lesões na folha (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SÁ, 2009).

A cultura do Sisal

A planta do sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma monocotiledônea com características bem peculiares. As folhas são pontiagudas com espinhos nas pontas, medindo cerca de 9 cm de largura e aproximadamente 1,5 metros de comprimento, quando a planta se torna adulta, em média com 8 anos, embora algumas espécimes possam chegar até 15 anos. Um dos aspectos inerentes do sisal é que emite apenas uma floração em todo ciclo de vida, morrendo logo em seguida (SEAGRI, 2010). Tem sua origem no México, região de Yucatan, pertence à família Agavaceae e ao gênero *Agave*. A espécie mais cultivada é a *Agave sisalana* Perrine e foi introduzida no Brasil pelo comendador Horácio Urpia Júnior, na Bahia, na região de Madre de Deus e Maragogipe, por volta de 1903 trazidos da Flórida por uma empresa americana (WIKIPEDIA, 2010).

Por ser uma planta semixerófita, o sisal necessita de clima quente e grande luminosidade, condições que encontrou na região do nordeste brasileiro para o estabelecimento e expansão do seu cultivo. Além disso, devido às características da planta em possuir folhas carnosas e suculentas, epiderme cutinizada e redução de estômatos, o sisal adaptou-se bem à região semi-árida, onde encontrou condições favoráveis para o seu crescimento. Teve sua disseminação inicialmente no estado da Paraíba e só depois na Bahia (CNA, 2010).

Com 92 mil toneladas colhidas em 2005, o Estado da Bahia é o maior produtor de sisal do Brasil e responde por 94% de toda produção nacional, atingindo uma área plantada de 200 mil hectares. O Brasil está na primeira posição do ranking mundial da produção de sisal (SEPLAN, 2006). Com 21.256,50 quilômetros quadrados, o Território do Sisal, está localizado na Microrregião Nordeste do estado e abrange os municípios de Araci, Barrocas, Biritinga, Candeal, Cansanção, Conceição do Coité, Ichu, Itiúba, Lamarão, Monte Santo, Nordestina, Queimadas, Quijingue, Retirolândia, Santaluz, São Domingos, Serrinha, Teofilândia, Tucano e Valente. A Microrregião Piemonte da Diamantina conta com 12 municípios com produção significativa de sisal. Nesta região, 92,8% das 29,5 mil propriedades rurais são familiares, cuja área média é de 23,73 ha. A outra Microrregião produtora de sisal é a de Paraguaçu, onde existem nove municípios com plantio significativo desta cultura. Assim como nas outras regiões,

mais da metade da área é ocupada por propriedades familiares, que no total superam 90% do número de estabelecimentos rurais (CONSOLI, 2009).

A fibra beneficiada ou industrializada rende cerca de 82 milhões de dólares por ano em divisas para o Brasil, além de gerar mais de meio milhão de empregos na cadeia de serviços (UNIVERSIA, 2010).

Os subprodutos do sisal após o desfibramento e/ou beneficiamento também podem ser aproveitados. A mucilagem, após ser retirada a bucha, é utilizada como adubo orgânico e na alimentação de rebanho bovino e caprino, mas em pequenas quantidades e sem o tratamento adequado. O suco do sisal é rico em ecogenina e é usado como medicamento ou bioinseticida, no controle de larvas nos primeiros estágios de vida, nematóides e carrapatos. O substrato restante ainda pode ser usado para o cultivo de cogumelos comestíveis (FAPESB, 2002).

Base da agricultura familiar dos municípios da região sisaleira da Bahia, o sisal é uma cultura muito importante para a região uma vez que gera renda pela venda local de produtos manufaturados e pela exportação da fibra natural. Contudo, nos últimos anos a cultura vem sofrendo um declínio em sua produção devido à podridão vermelha, doença causada pelo fungo *A. niger* (SOARES et al., 2006).

A podridão vermelha, também conhecida como podridão do caule, apresenta os seguintes sintomas: amarelecimento e murcha das folhas, com a descoloração avermelhada do caule até a base das folhas e posterior apodrecimento deste, causando o desprendimento do solo e morte da planta. As folhas murchas não servem para o desfibramento e comercialização da fibra (SÁ, 2009).

Muito pouco se conhece sobre esta doença. Entretanto, estudos preliminares demonstram a redução e inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. niger*, com a adição em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) de extratos vegetais como pata de vaca, orégano, boldo e sabugueiro, em testes realizados *in vitro*, evidenciando o possível uso destes compostos para o controle alternativo da podridão vermelha do sisal (SOUZA e SOARES, 2009a; SOUZA e SOARES, 2009b; SOUZA e SOARES, 2009c; SOUZA e SOARES, 2009d).

Foram conduzidos em laboratório experimentos preliminares utilizando extratos aquosos obtidos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), alho

(*Allium sativum*), mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.), nim (*Azadirachta indica*), boldo (*Peumus boldus*), sabugueiro (*Sambucus nigra*), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi), capim santo (*Cymbopogon citratus*), pata-de-vaca (*Bauhinia variegata* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) para avaliar o efeito destes extratos no crescimento e esporulação de *A. niger*. Os melhores resultados para inibição do crescimento de *A. niger* foram obtidos com o extrato de alho (*A. sativum* L.), sendo este utilizado no presente trabalho.

Desta forma, considerando o potencial de utilização de extratos vegetais para o controle de *A. niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal e a utilização do resíduo de sisal para adubação dos plantios de sisal, este trabalho teve como objetivo avaliar do efeito fungitóxico do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) e sua utilização para o controle da podridão vermelha do sisal e o efeito do extrato da folha de sisal no crescimento de *A. niger* e na incidência e severidade da podridão vermelha e manchas foliares em mudas de sisal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 580 -582, 1997.

ABREU JÚNIOR, H. DE. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na Agricultura**, Editora Campinas, 111p. 1998.

AGUIAR, C. M., MARGONAR, M. H. L., DE LUCENA, S. L.. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da Temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos . In: XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul) FURB, **Resumos... 13 a 15 de novembro de 2008**. p. 1 - 6.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: Isis. p. 987. 1998.

AMADO, M. A. In: **Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos, vantagens e inconvenientes**. Disponível em: http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm. Acesso em: 12 mar.2010.

AMAGASE, H.; PETESCH, B. L.; MATSUURA, H.; KASUGA, S. Intake of garlic and its bioactive components. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 955-962, 2001.

AMARAL F. M. M.; RIBEIRO M. N. S.; BARBOSA-FILHO J. M.; REIS A. S.; NASCIMENTO F. R.F.; MACEDO R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.16, p. 696-720. 2006.

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

BOAVENTURA, MA. A. D., LOPES, R. F.A.P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: the biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. V.35, n.4, p.345-347. 2004.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. 279p.

CARRICONDE, C.; MORES, D. **De volta às Raízes**. Olinda: GCL Gráfica e Editora Ltda, p.13. 1988.

CAVALLITO, C.J., BAILEY, J.H. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. L. isolation, physical propertie and bacterial action. **Journal of the American Chemical Society**. v. 66, p. 1950-1951, 1944.

CHUNG, L.Y. As propriedades antioxidantes dos compostos do alho: alil cisteína, aliina, alicina e dissulfeto de alil. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n.2, p. 205-213, 2006.

CNA. **Sisal: problemas e soluções**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25/01/2010.

CONSOLI, M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de melhoria competitividade do APL dos fornecedores da indústria automotiva**. Disponível em: <http://www.markestrat.org/pmc/pdfs/RelatorioFinalAPLSisal.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2010.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil, e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Nacional, p.1026, 1975.

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.H.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.

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**, v.4, n.2, p.77- 82, 2003.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A. J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, p. 79–89. 2004.

DANTAS, I.C. **O raizeiro e suas raízes: um novo olhar sobre o saber popular**. Dissertação (Mestrado em saúde coletiva). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2003. 287 p.

DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C. G.; EGEWARTH, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v.21, n.1, p. 41-46, 2008.

DE SOUZA, A. T. **Aspectos Econômicos da Cultura do Alho**. Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/opinio/analise_alho.htm. Acesso em: 02 fev.2010.

FAPESB. **Enquadramento do arranjo produtivo do sisal**. Salvador, 2002.

FELIX, A. A. A.. **Identificação e desenvolvimento de técnica alternativa de controle de fungos em sementes utilizadas no artesanato**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília, 2007. p. 88.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALANTE, R. M. **Extração de Inulina do alho (*Allium sativum* L. var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leite fixo**. Dissertação. (Programa de Pós Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2008. p. 113.

GIOVANELA, L. E. M. Efeito da degradação de extratos de *Allium sativum* L. (Liliiflorae – Liliaceae) no crescimento de microrganismos patogênicos. **Caderno de Iniciação à Pesquisa**, v.4, p. 25-31, 2002.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. DE; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C. V. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil, mega-diversidade**. v.1, n. 1, 2005.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.** Tese (Doutorado em Biologia dos Fungos), Universidade Federal de Pernambuco: Pernambuco, 2007. 114p.

HERNANDEZ, A.A.M., ROSAS, R.M., AGUILERA, P. M.M. ; LAGUNES, T.A. Use of plant and mineral powders as an alternative for the control of fungi in stored maize grain. **Agrociencia**, v. 32, p. 75-79, 1998.

HODGE G.; HODGE S.; HAN P. *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production *in vitro*: Potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. **Cytometry**, v.48, n.4, p. 209-215, 2002.

KASUGA, S.; UDA, N.; KYO, E.; USHIJIMA, M.; MORIHARA, N.; ITAKURA, Y. Pharmacological activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1080-1084, 2001.

KHOSLA P.; KARAN R. S.; BHARGAVA V. K. Effect of garlic oil on ethanol induced gastric ulcers in rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 1, p.87-91, 2004.

LEITE, C. D.; BOTELHO, R. V.; FARIA, C. M. D. R.; MAIA, A. J. Efeitos do extrato de alho sobre agentes causais da antracnose (*Elsinoe ampelina*) e da escoriose (*Phomopsis viticola*) da videira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p.1409-1412, 2009.

LEONEL, M.; CERADA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p. 2, 1995.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, 1. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum. p. 512. 2002.

MACHADO, P.A., GUTIERRES, D.M., CROSS, J.D. Garlicina - Um novo antibiótico. **Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v. 55, n.2, p.9-31, 1948.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Ed.) **Plantas medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudos Multidisciplinar**, São Paulo: Ed. Universidade Paulista. p.69-86. 1996. 230p.

MORAES, S. A.; GODOY, I.J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**, Ed. UFV:Viçosa, Minas Gerais, p.1-43, 1997.

MORAIS L.A.S.; MATTOS L.P.V.; GONÇALVES G.G.; BETTIOL W. Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p.113-117, 2009.

MORAIS, M.S. **Efeito de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba: Areia. 2004. p.48.

MUKHERJEE M.; MITRA S.; MITRA C. Prevention of bone loss by oil extract of garlic (*Allium sativum* Linn.) in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **Phytotherapy Research**, v.18, n.5, p. 389-394, 2004.

NASCIMENTO, L. C.; NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 313-319, 2008.

NASSER, P. P.; DE SOUZA, S. M. C.; BATISTA, L. R.; MERCER, J.R. Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de ocratoxina A. **Ciência Agrotecnica**, v. 27, n. 5, p. 1172-1175, 2003.

NUNES, I. L. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

OLIVEIRA DE SÁ, J. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009. p. 65.

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**, v. 28, p.323-327. 2000.

PAI S.T.; PLATT M.W. Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* species involved in otomycosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p.14-18, 1995.

PEIXOTO, A.L.; AMORIM, M.P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3 p.21-24. 2003.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**, 1. ed. São Paulo: MCGRAW-HILL, 1980. 566p.

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, p.554-556, 2003.

SCOTT E. B. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v.44, p.17- 21, 2006.

SEAGRI. **A cultura do sisal**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Sisal>. Acesso em: 06 fev.2010.

SEPLAN- Inclusão Social. Bahia que faz: Densificação da base econômica e geração de emprego e renda. **Relatório de Atividades**. Governo do Estado da Bahia, Bahia. Disponível em: http://www.seplan.ba.gov.br/sgc/arquivos/20100302_152309_11_inclusao.pdf. Acesso em: 10 abr.2010

SEVERO, L. C. **Colonização intracavitária pulmonar por *Aspergillus niger* : análise de suas peculiaridades**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia.), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina: Porto Alegre. 1987. 240 p.

SILVA, M.G.; DINIZ, M.F.F.M.; OLIVEIRA, R.A.G. **Fitoterápicos: guia do profissional farmacêutico**. Secretaria e Coordenação Estadual de Saúde. Núcleo de assistência farmacêutica. João Pessoa/Paraíba, 2002. 36 p.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM, p. 221- 246. 2005.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, **Anais...** BA. 2006.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Utilização de extrato aquoso de sabugueiro (*Sambucus nigra*) para inibição in vitro de *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais....** 2009a.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Atividade in vitro do extrato aquoso de boldo (*Peumus boldus*) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão

vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009b.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009c. p.14-15

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de pata-de-vaca (*Bauhinia variegata* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009d. p.16-17.

SOVOVA K.; SOVA P. Pharmaceutical significance of *Allium sativum* L. 4. Antifungal effects. **International Dental Journal**, v. 52, p. 433-437, 2002.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3. ed. Porto Alegre, 719 p. 2004.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. 2 ed. Curitiba, Herbarium Laboratório Botânico, p.317,1995.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. ed. 4, Editora Varela, São Paulo, p.222-225, 2005.

UNIVERSIA. UEMS: **Pesquisadores produzem bioinseticida a partir do sisal**. Disponível em: http://www.universia.com.br/noticia/materia_dentrodocampus.jsp?not=51972. Acesso em: 21 jan.2010.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.

VENTUROSOS, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja**. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal).

Universidade Federal da Grande Dourados : Dourados Mato Grosso do Sul. 2009. 99p.

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**, v. 23, n. 4, p. 915-919, 2005.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. 2 ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 1992. 347p.

VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativo aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. 2005. 72p.

WIKIPEDIA. **Sisal**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sisal>. Acesso em: 20 fev.2010.

WU, J.J.; YANG, J.S.; LIU, M.S. Effects of irradiation on the volatile compounds of garlic (*Allium sativum* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 4, p. 506-508, 1996.

CAPÍTULO 1

**EXTRATO AQUOSO DE ALHO (*Allium sativum* L.) NO CONTROLE
DE *Aspergillus niger* E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL
(*Agave sisalana* Perrine)**

**EXTRATO AQUOSO DE ALHO (*Allium sativum* L.) NO CONTROLE
DE *Aspergillus niger* E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL
(*Agave sisalana* Perrine)**

Liane Santos Sales Souza
Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) tem propriedades bactericida, fungicida, vermífugo, antiviral, dentre outras, sendo muito utilizado na medicina alternativa. Sabe-se que cerca de 30 componentes do alho possuem poder terapêutico e sua capacidade fungitóxica diminui a germinação de esporos de vários fungos patogênicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fungitóxico do extrato aquoso de alho sobre *Aspergillus niger* e no controle da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine). Foram avaliados os seus efeitos sobre o crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e colonização de discos do caule de sisal por *A. niger*, e no controle da podridão vermelha em mudas de sisal. O extrato aquoso de alho, quando esterilizado em autoclave, perde o seu potencial inibitório. A partir da concentração de 3 % do extrato, ocorreu a inibição total do crescimento micelial e da esporulação de *A. niger*. Em todas as concentrações testadas não ocorreu germinação dos esporos. Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho inibiram o crescimento micelial e esporulação de *A. niger* a partir da concentração de 15% (alho em água, p/v). Contudo, em condições de casa de vegetação, o extrato de alho não promoveu o controle da podridão vermelha em mudas de sisal. Considerando a eficiência de 100% no controle *in vitro* de *A. niger* pelo extrato aquoso de alho, sugere-se que diferentes formas de aplicação do extrato de alho na planta devem ser avaliadas.

Palavras-chave: controle alternativo, podridão vermelha do sisal, alho

**GARLIC (*Allium sativum* L.) AQUEOUS EXTRACT IN THE
CONTROL *Aspergillus niger* AND RED ROT DISEASE OF SISAL
(*Agave sisalana* Perrine)**

Liane Santos Sales Souza
Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) extract has bactericidal, fungicidal, anthelmintic, antiviral, and other properties. It is known that about 30 components of garlic have healing properties and its fungitoxic activity inhibits spore germination of several fungal pathogens that affect commercial plantations. Thus, this work aimed to test the antifungal effect of garlic aqueous extract on growth and sporulation of *Aspergillus niger*, and control of sisal (*Agave sisalana* Perrine) red rot disease. The effects on mycelial growth, sporulation, spore germination, colonization on sisal stem transversal cuts, and severity of red rot stem disease on sisal seedlings. Garlic aqueous extract, when autoclaved loses its inhibitory potential. Garlic aqueous extract in concentrations of 3% and above caused 100% inhibition of *A.niger* mycelial growth and sporulation. All tested concentrations of garlic extract inhibited *A. niger* spore germination. Growth of *A. niger* on pieces of sisal stem tissue was inhibited when the pieces of tissue were immersed in garlic extract at concentrations of 10% and above and when they were sprayed on with the extract at concentration of 3% and above. However, under greenhouse conditions, garlic extract did not promote control of red rot stem disease in sisal seedlings. Considering that aqueous garlic extract inhibited *A. niger* growth and sporulation in vitro, we suggest that different forms of plant application of garlic extract should be tested.

Key-words: alternative control, sisal red rot disease, *Allium sativum* L.

INTRODUÇÃO

No território brasileiro existe uma enorme variedade de espécies vegetais e, em virtude desta grande diversidade, estão presentes recursos naturais com potencial para o tratamento de doenças humanas, de animais e vegetais, o que desperta o interesse pela busca de novas substâncias e alternativas para o controle de doenças (LORENZETTI, 2010).

A utilização de extratos vegetais no controle alternativo de pragas e doenças de plantas vem ganhando espaço no meio científico, uma vez que a sociedade vem pressionando as autoridades para uma possível redução no uso indiscriminado de defensivos agrícolas, numa tentativa de mudança no modo de viver, com a busca por produtos mais saudáveis e livres de substâncias químicas que causam problemas de saúde (MAIRESSE e COSTA, 2009).

Os extratos de plantas medicinais que apresentam propriedades antifúngicas podem ser uma alternativa ecológica para substituir o uso de defensivos químicos e estes ainda podem ser associados às práticas de manejo integrado de doenças o que pode atender à grande procura atual por produtos para a produção agroecológica de alimentos (CARVALHO et al., 2002).

Trabalhos realizados com extratos vegetais evidenciam o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos, por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos e, pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997; STANGARLIN et al., 1999).

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) é um dos mais estudados podendo ser usado como bactericida, fungicida, vermífugo, antiviral e antiprotozoário (CARRICONDE, 1988). Atualmente foram identificados cerca de 30 componentes do alho que apresentam efeito terapêutico (KATZUNG et al. 2003). Este possui duas substâncias, a alinase e aliína, que são armazenadas de formas distintas e quando as membranas celulares são rompidas formam a alicina, substância que dá o aroma característico da planta e também atua na defesa da planta, quando esta é atacada por patógenos. Os efeitos da alicina se estendem contra vários microrganismos, o que justifica a diversidade de meios para sua utilização (TALAMINI e STADNIK, 2004). Tem sido relatada a capacidade fungitóxica do

extrato de alho, diminuindo a germinação de esporos sexuais e de conídios de uma gama de fungos fitopatogênicos (BASTOS, 1992; WILSON et al. 1997).

SILVA et al. (1999) demonstraram a atividade nematicida do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o nematóide-das-galhas do cafeeiro (*Meloydogine exigua*). NOWACKI, (2005) utilizando o extrato de alho em galhas nas raízes de couve chinesa demonstrou a significativa inibição da incidência, quando comparado aos demais tratamentos, diminuindo a severidade destas galhas nas plantas, além de não causar fitotoxicidade.

CONNER et al. (1984) estudando óleo essencial de alho, demonstrou que este inibiu oito espécies de leveduras. Neste mesmo sentido, QUINTAES (2001) constatou em laboratório que o extrato fresco de alho tem a capacidade de inibir o crescimento de 14 espécies de bactérias, entre as quais *Stapylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

BOLKHAN e RIBEIRO, (1981) constataram que o uso de extrato de bulbilhos de alho na concentração de 5000 ppm promoveu inibição entre 37 e 76 % no desenvolvimento e crescimento do micélio de *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente. BRAND et al. (2006) estudando extrato de alho, obtiveram 100% de controle de *Trichoderma* spp., 94,4% de *Aspergillus* spp. e 47,2% de *Penicillium* spp.. BARROS et al., (1995) demonstraram em seus estudos o efeito do extrato de alho sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp., apresentando inibição do crescimento micelial, com extrato concentrado, preparado com 5 g de bulbos de alho descascados em 100 ml de água, com trituração por 3 minutos.

A cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine) tem destaque na geração de renda e emprego na região nordeste, sendo uma das poucas alternativas de produção agrícola na região semi-árida do Nordeste. O Brasil é o país que mais produz e exporta esta fibra natural no mundo e o estado da Bahia é o maior produtor de sisal no Brasil, com aproximadamente 94% da produção nacional (SINDIFIBRAS, 2010). Base da agricultura familiar em muitos municípios da região sisaleira do estado da Bahia, o sisal é uma cultura com enorme importância social e econômica, pela fácil adaptação da planta semixerófito ao semi-árido, tornando-se muitas vezes a única espécie cultivada em grande escala

na maioria das propriedades rurais, ou pela agregação de valores à população carente, uma vez que gera renda pela venda local de produtos manufaturados através do artesanato (bolsas, tapetes, chapéus, etc.) e também pela exportação da fibra natural, gerando empregos diretos e indiretos (CONSOLI et al., 2009).

Entretanto, a produtividade nas últimas décadas tem decaído muito. Em 1989, a produção brasileira chegou a 220.000 toneladas e atualmente é de aproximadamente 110.000 toneladas (CNA, 2010). O motivo do declínio na produção anual da fibra de sisal se deve a queda do preço da fibra, falta de investimento em tecnologia para a produção de sisal e beneficiamento da fibra e a disseminação da podridão vermelha, doença causada pelo fungo *A. niger* (SOARES et. al., 2006), que causa a morte da planta e encontra-se disseminada em 100% dos plantios na Bahia, com incidência média variando de 5 a 40% (ALVES et al., 2005).

Poucos estudos foram realizados associando o efeito antifúngico de extratos vegetais ao agente causal da podridão vermelha do sisal, o fungo *A. niger*, embora já existam relatos de estudos com este fungo e a avaliação de extratos de pata de vaca, orégano, boldo e sabugueiro para o seu controle (SOUZA e SOARES, 2009a; SOUZA e SOARES, 2009b; SOUZA e SOARES, 2009c; SOUZA e SOARES, 2009d).

O potencial antifúngico do extrato de alho pode ser uma alternativa viável no controle da podridão vermelha do sisal, visto que este tem ação inibitória comprovada sobre os mais diversos tipos de fungos, bactérias e nematóides, podendo ser utilizado pelos agricultores do nordeste brasileiro, por se tratar de um produto natural de fácil acesso, manuseio e preparo, além de não agredir o meio ambiente, a depender da forma de aplicação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato aquoso de alho e de seus compostos voláteis sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. niger* e o controle da podridão vermelha em mudas de sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) e preparo do meio de cultivo

Bulbilhos de alho (*A. sativum* L.) comprados em comércio local foram previamente lavados com água destilada e triturados em liquidificador (200g em 1000 mL de água destilada) por três minutos, obtendo-se um extrato aquoso na concentração de 20% (p/v). O extrato foi filtrado primeiramente em peneira plástica, depois em funil de vidro contendo algodão estéril e por último em membrana de nitrocelulose (Millipore) com poros de 0,22 µm de diâmetro, sendo acondicionado em tubos de centrífuga estéreis e mantido a 4°C até a realização dos testes. As outras concentrações estudadas do extrato 15%, 10%, 5%, 3%, 2,50%, 2%; 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,75%, 0,50% e 0,25% foram obtidas diluindo o extrato aquoso de alho na concentração inicial de 20% (p/v) ao meio de cultura BDA, depois deste esterilizado em autoclave e quando se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação. Para não ocorrer a diluição do meio de cultura com a adição do extrato vegetal, no preparo deste meio de cultura, diminuiu-se o volume de água adicionado, de acordo com a quantidade de extrato que seria adicionado após a esterilização do meio.

Efeito *in vitro* do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento micelial de *A. niger*

O extrato vegetal foi misturado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), quando o meio se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação, o qual foi vertido em placas de Petri. O fungo *A. niger*, isolado de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, foi multiplicado em meio BDA por sete dias a temperatura ambiente (28±2°C) e discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos assepticamente para as placas de Petri contendo o meio BDA com as diferentes concentrações dos extratos aquosos e incubados em BOD a 28°C. A avaliação foi realizada no período de 7 a 14 dias,

medindo-se o diâmetro da cultura, com auxílio de uma régua milimetrada. A medição foi realizada até quando a cultura do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos nas culturas crescidas no meio BDA com extrato de alho, foram sobre a cultura de *A.niger* na placa de Petri, 20 mL de água destilada esterilizada com duas gotas de Tween 20 e, em seguida, a colônia foi raspada com alça de Drigalski para a obtenção da suspensão de esporos. A contagem de esporos de *A. niger* foi feita com auxílio de câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio ótico, calculando-se a concentração no volume total de 20 mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, o controle (meio BDA sem extrato aquoso de alho) e as concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% (p/v) de extrato de alho, com cinco repetições por tratamento. O mesmo experimento foi realizado utilizando o extrato de alho esterilizado em autoclave.

Efeito *in vitro* do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento micelial de *A. niger* para determinação da concentração mínima inibitória - MIC

Na determinação do MIC, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 11 tratamentos, o controle (meio BDA sem extrato aquoso de alho) e o meio BDA com extrato de alho nas concentrações de 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25%; 1,50%; 1,75%; 2%; 2,5% e 3% (p/v), com cinco repetições por tratamento.

Atividade antifúngica do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre a germinação dos esporos de *A. niger*

Uma alíquota de 40 µL da suspensão de esporos (10^{-7} conídios/mL⁻¹) de *A. niger* e de 40 µL do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.), nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v), filtrado em membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,22 µm), foram colocadas em lâminas escavadas, sendo estas mantidas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e incubadas em BOD a 28 °C. Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada sem o extrato de alho. A porcentagem de

germinação de esporos foi determinada inicialmente após 14 horas de incubação e de hora em hora, para determinação do período e percentagem de germinação dos esporos de *A. niger*. Para a contagem de esporos germinados, adicionou-se uma gota de azul algodão em lactofenol às lâminas com o bioensaio, para paralisar a germinação. A avaliação foi realizada em microscópio ótico, contando-se o número de esporos germinados e não germinados, num total de 200 esporos em cada tratamento e cada repetição, sendo considerados como esporos germinados aqueles que apresentavam a emissão do tubo germinativo, com o dobro do tamanho do esporo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos, o controle positivo (contendo água destilada esterilizada na lâmina escavada) e as concentrações descritas acima, com três repetições por tratamento.

Efeito do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento de *A. niger* em discos do caule de mudas de sisal

Foram cortados pedaços do caule de mudas de sisal em forma de discos (cortes transversais), com aproximadamente 17 mm de diâmetro x 5 mm de altura. Em seguida, os discos do caule de sisal foram lavados e desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, ambos por cinco minutos, seguido de duas lavagens com água destilada e esterilizada, conforme definido por SÁ, (2009). Posteriormente, esses discos foram acondicionados em potes de plástico descartáveis (potes com capacidade para 100 mL, um disco de sisal por pote), contendo fina camada de papel toalha esterilizado no fundo. Os discos de sisal foram borrifados por aspersão com as concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) e, em seguida, foram inoculados, também por aspersão, dentro dos potes dos plásticos, com uma suspensão de esporos de *A. niger* (1,6 mL da suspensão por disco de sisal, na concentração de 10^{-7} conídios.mL⁻¹). Foi utilizado um controle positivo composto por discos de caule não inoculados, com o propósito de verificar a eficiência do processo de desinfestação desses discos. O material foi incubado em BOD a 28 °C por cinco dias. Após a incubação, os discos de sisal foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL de solução salina (0,85%

NaCl), com 100 µL de Tween 20, sendo estes agitados durante 1 minuto para obtenção da suspensão dos esporos da cultura de *A. niger* que cresceu nos discos de sisal. A contagem de esporos de *A. niger* dessa suspensão foi feita com auxílio de câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio ótico, calculando-se a concentração de esporos no volume total de 20 mL da solução salina.

Este teste foi realizado também com discos de sisal desinfestados e tratados por imersão de 10 minutos nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v) do extrato aquoso de alho e, tendo como tratamento controle, o disco imerso em água destilada esterilizada. Em seguida, os discos foram inoculados por aspersão com suspensão de esporos *A. niger* (1,6 mL na concentração de 10^{-7} conídios. mL⁻¹).

O delineamento experimental dos dois experimentos foi inteiramente casualizado com oito tratamentos, sendo o controle positivo (discos tratados com água destilada esterilizada), o controle negativo (discos somente inoculados com *A. niger*) e as concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v), com cinco repetições por tratamento.

Efeito *in vitro* de compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento micelial de *A. niger*

Placas de Petri contendo recipientes pequenos preparados com folhas de alumínio foram esterilizadas em estufa a 180°C por duas horas seguindo a metodologia descrita por YU et al. (2009). Meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) foi vertido nas placas contendo os recipientes de alumínio, para que estes pudessem ficar aderidos às placas, mas sem adição de meio de cultura nesses recipientes (Figura 1). Foram colocados 2 mL do extrato vegetal, nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v), nestes recipientes de alumínio, para que o extrato não entrasse em contato direto com o meio de cultura e nem com a cultura de *A. niger*. No tratamento controle foram utilizados 2 mL de água destilada esterilizada nos recipientes de alumínio. Discos de 5 mm de diâmetro da cultura de *A. niger* foram transferidos para o centro das placas, sendo estas incubadas em BOD a 28 °C. A avaliação foi realizada no período de 7 a 14 dias, medindo-se o diâmetro da cultura, com auxílio de uma régua milimetrada. A medição foi realizada diariamente até o período em que a cultura do tratamento

controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos, foram adicionados à cultura de *A. niger*, 20 mL de água destilada esterilizada com duas gotas de Tween 20 e a colônia foi raspada com alça de Drigalski para a obtenção de suspensão de esporos. A contagem de esporos de *A. niger* foi feita com câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio ótico, calculando-se a concentração no volume total de 20 mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos, o controle positivo (contendo água destilada estéril no pote de alumínio) e os tratamentos constituídos pelas concentrações citadas acima de extrato aquoso de alho, com cinco repetições.

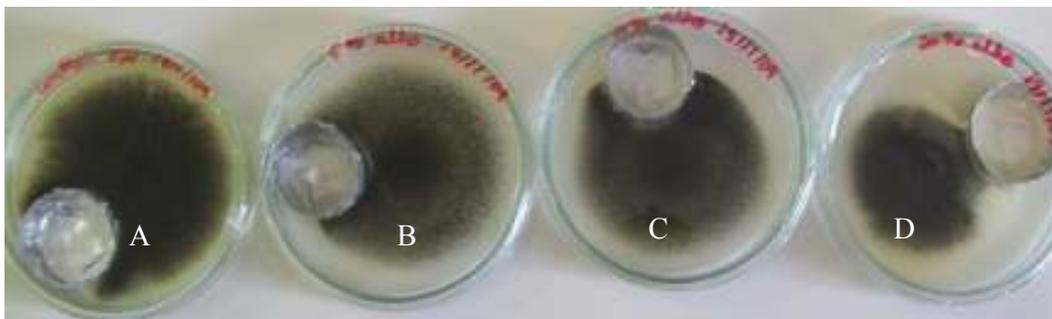


Figura 1. Bioensaio para avaliação do efeito de compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) nas concentrações de A) 0%; B) 5%; C) 10% e D) 20%, sobre o crescimento micelial de *A. niger*.

Efeito do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre a incidência e severidade da podridão vermelha em mudas de sisal inoculadas com *A. niger*

Na área experimental do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB-UFRB) foram plantadas mudas de sisal oriundas de bulbilhos colhidos na região sisaleira. Foram coletadas desta área, 245 mudas de sisal com aproximadamente 20 cm de altura, sendo estas transplantadas para sacos de polietileno (21 x 14,5 cm) com capacidade para 1 dm³, contendo solo de área de pastagem do campus de Cruz das Almas. As mudas foram mantidas em estufa agrícola, com irrigação a cada quatro dias. Para

a inoculação com *A. niger* foram feitas lesões padronizadas nas mudas (quatro perfurações equidistantes, com 1 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro), conforme descrito por SÁ, (2009). Em seguida, as mudas foram mergulhadas em recipientes contendo o extrato aquoso de alho nas concentrações de 1%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v), por dois minutos. Nos tratamentos controle com e sem a inoculação com o fungo, as mudas foram mergulhadas em água corrente por dois minutos. Após ficarem mergulhadas no extrato de alho, as mudas foram colocadas em bandejas plásticas e mantidas por quinze minutos ao ar livre, sendo em seguida inoculadas com *A. niger* via aspersão com suspensão de esporos na concentração de 10^{-7} conídios.mL⁻¹ nas raízes e no caule com os ferimentos. No tratamento controle positivo, as mudas foram tratadas com água destilada esterilizada e não foram inoculadas. As mudas foram plantadas imediatamente após a inoculação, sendo mantidas em viveiro com 50% de sombreamento e irrigadas a cada quatro dias com água corrente. O experimento foi avaliado com 10 e 20 dias após a inoculação, avaliando-se a incidência e severidade da doença. Na avaliação da severidade, utilizou-se a escala de notas descrita por SÁ (2009), ilustrada na figura 2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos, o controle positivo e o negativo e as concentrações de 1%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v), com 35 repetições por tratamento.

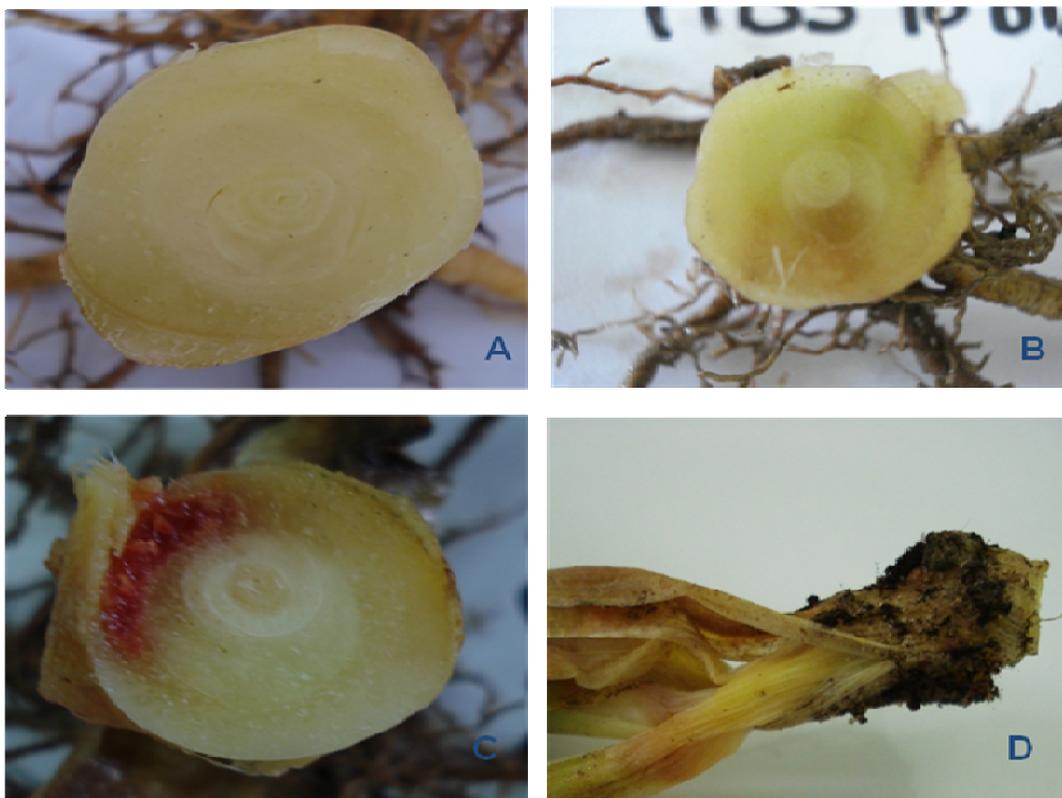


Figura 2. Escala de notas adotada por SÁ (2009), para avaliar a severidade da podridão vermelha de sisal em mudas inoculadas. **(A)** Nota 0 - Planta sadia; **(B)** Nota 1 - Sintoma inicial, escurecimento dos tecidos internos do caule; **(C)** Nota 2 - Vermelhidão dos tecidos internos do caule; **(D)** Nota 3 - Planta morta.

Análise estatística dos dados obtidos

Os dados relativos à inibição do crescimento micelial, esporulação (em placas de Petri com meio de cultura e em discos de caule de sisal) germinação de esporos e efeito de compostos voláteis sobre o desenvolvimento de *A. niger*, foram analisados pelo teste de regressão e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). O Índice de Doença (ID) foi obtido a partir da média ponderada das notas, conforme (MCKINNEY, 1923), utilizando-se a seguinte expressão matemática:

$$ID = \frac{\sum (n * f)}{z * N}$$

em que: ID é o Índice de Doença; n é a nota de severidade conferida à planta avaliada; f é a frequência das notas no total das plantas avaliadas; Z é o valor

numérico da nota máxima na escala; e N é o total de observações. Para cada data de avaliação foi calculado o ID, obtendo ao final o ID acumulado do período avaliado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato aquoso de alho, esterilizado por filtração, na concentração de 1% inibiu em 41,19% o crescimento micelial de *A. niger*. Entretanto, a esporulação do fungo aumentou em 92,52% no meio BDA com extrato de alho na concentração de 1%, quando comparada ao tratamento controle e, nas demais concentrações não ocorreu esporulação, não sendo possível desta forma, ajustar a equação (Figura 3). A partir da concentração de 5% do extrato de alho em BDA, ocorreu inibição em 100% do crescimento micelial de *A. niger*. FRENCH (1992), afirma que muitos compostos químicos voláteis podem estimular ou inibir o desenvolvimento e a germinação de esporos de fungos em determinadas concentrações.

BRAND et al. (2009) estudando o extrato aquoso de alho, obteve 100% de controle de *Trichoderma* spp. e 94,4% de controle de *Aspergillus* spp. Nos estudos de LEMAR et al. (2005) observou-se que a aplicação de extrato de alho causou um estresse oxidativo em células de *Candida albicans*, o que levou à inibição do crescimento das colônias do fungo e a desestruturação dos seus componentes celulares.

Quando esterilizado em autoclave, o extrato aquoso de alho não inibiu o crescimento micelial de *A. niger*, mas inibiu a esporulação em 82,7%, 74,9%, 79,3% e 83,4% nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Figura 3). A diminuição do efeito de inibição do crescimento micelial do fungo foi atribuída à forma de esterilização (RIBEIRO e BEDENDO, 1999). Em estudo sobre o efeito *in vitro* do extrato de *Curcuma longa* e da curcumina sobre *Alternaria solani* em tomateiro, comparando o extrato bruto e o autoclavado, foi demonstrado que quando autoclavados, estes não apresentaram inibição do crescimento micelial nem da germinação de

esporos e a inibição da esporulação foi menor, indicando a presença de compostos antimicrobianos termolábeis no extrato (BALBI-PEÑA et al., 2006).

Desta forma, o extrato aquoso não autoclavado de alho (*A. sativum* L.) tem maior potencial inibitório sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. niger* em relação ao mesmo extrato quando submetido a tratamento com altas temperaturas, fato que pode estar associado à presença de compostos fixos que se degradam em altas temperaturas (120°C por 15 minutos).

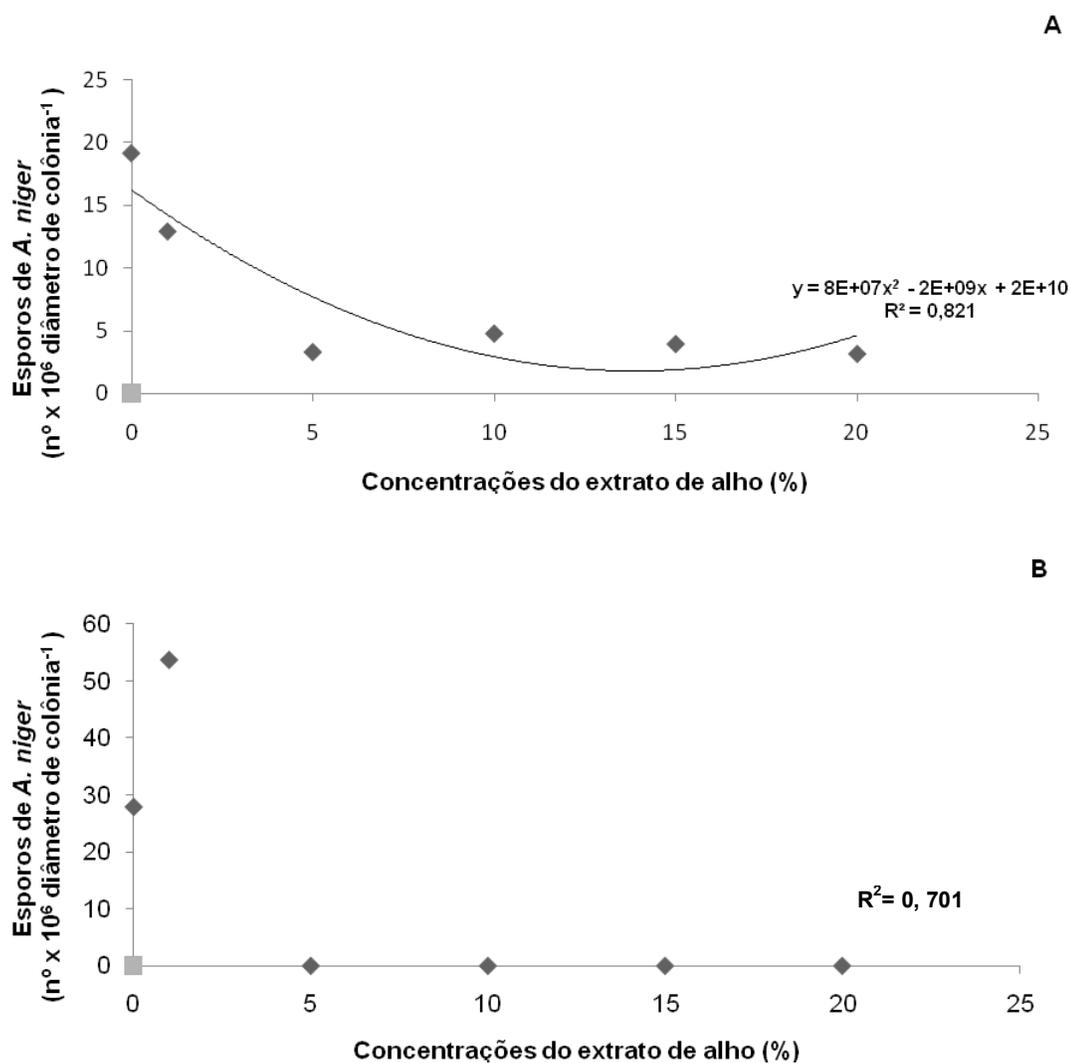


Figura 3. Esporulação de *A. niger* por diâmetro de colônia, em meio batata dextrose agar com a adição de extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.), em diferentes concentrações, aos 14 dias após a incubação. (A) Extrato esterilizado em autoclave; (B) Extrato esterilizado por filtração.

A concentração mínima inibitória (MIC) do extrato aquoso de alho sobre *A. niger* foi definida para a inibição total do desenvolvimento do fungo. Neste trabalho, a concentração de 3% do extrato testado inibiu em 100% o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*. Nas concentrações de 1,75% e 2,00% de extrato de alho ocorre inibição do crescimento micelial em aproximadamente 13,25% e com 2,5% de extrato de alho ocorre a inibição em 44,5%. Em relação à esporulação do fungo, a partir da concentração de 0,5% do extrato aquoso de alho, ocorreu inibição de 86% da esporulação e, à medida que se aumenta a concentração aumenta a inibição chegando a 100% com a adição de 3% do extrato aquoso ao meio de cultura, o que demonstra que doses menores também podem ser eficientes no controle do desenvolvimento do fungo (Tabela 1). BARROS et al. (1995) estudando a inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp, na presença do extrato de alho (*A. sativum* L.), encontraram valor de MIC igual a 5%.

Tabela 1. Taxa de inibição da esporulação de *A. niger* por diâmetro de colônia, na presença de diferentes doses de extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.), avaliada 14 dias após incubação.

Concentração do extrato aquoso de alho (%) em meio BDA*	Taxa de inibição da esporulação (%)
0,25	18
0,50	86
0,75	89
1,00	87
1,25	88
1,50	84
1,75	84
2,00	90
2,50	95
3,00	100
5,00	100
10,00	100
15,00	100
20,00	100

*BDA – meio de cultura batata dextrose agar acrescido do extrato aquoso de alho

Com relação ao experimento para avaliar a germinação de esporos de *A. niger*, foi observada a emissão do tubo germinativo após 16 horas de incubação

(Figura 4). O extrato aquoso de alho, em todas as concentrações avaliadas (1%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/v)), causou 100% de inibição da germinação de esporos. Apenas no tratamento controle, utilizando água destilada esterilizada, foi observada a germinação de esporos. SOUZA et al.(2007), avaliando a germinação de esporos de *Fusarium proliferatum* relataram que, a partir das concentrações de 2,5% de extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) e de capim santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.), ocorreu o decréscimo na germinação do patógeno.

Os compostos presentes no extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) inibem a germinação de esporos de *A. niger*, mesmo em baixas concentrações. A ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui a granulação citoplasmática, a desorganização dos conteúdos celulares, inibição da germinação e alongação do tubo germinativo por algumas enzimas, com conseqüente inibição ou redução do crescimento micelial (LO et al., 1996). KRUGNER e BACCHI (1995), citados por BERGAMIN et al.(1995), descrevem que compostos secundários fixos como saponinas e flavonóides, presentes nos extratos aquosos ou em óleos essenciais, podem inibir ou estimular a esporulação e o crescimento micelial de fungos.

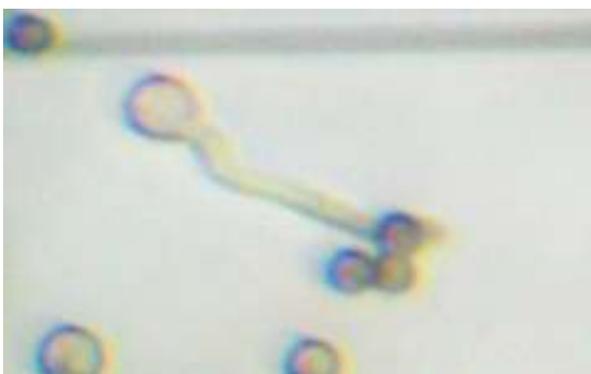


Figura 4. Esporo de *A. niger* germinado após 16 horas de incubação em água destilada esterilizada.

No presente trabalho, observamos que o extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) inibiu a germinação dos esporos de *A. niger* em 100% em todas as concentrações avaliadas e, quando em contato direto com o extrato vegetal, ocorreu 100% de inibição do crescimento micelial do fungo. Nos discos de sisal imersos no extrato aquoso de alho, não ocorreu crescimento micelial nem esporulação do fungo a partir da concentração de 10% do extrato de alho (Figura

5). Entretanto, nos discos borrifados com o mesmo extrato, ocorreu inibição do crescimento de *A. niger* e a partir da concentração de 3%. O extrato de alho a 1%, quando borrifado nos discos de sisal, promoveu a inibição da esporulação do fungo em 52,2%. Estes resultados sugerem que a aplicação do extrato por aspersão é mais eficiente que a aplicação por imersão dos discos no extrato de alho, uma vez que mesmo em menores concentrações obteve-se inibição do crescimento micelial de *A.niger*.

A inibição do crescimento micelial e da esporulação de *A. niger* nos discos de sisal indica que o extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) tem ação fungitóxica, também quando na presença do tecido vegetal da planta (Figura 5), sugerindo que este tem o potencial de controle da podridão vermelha, quando aplicado de forma correta na planta.

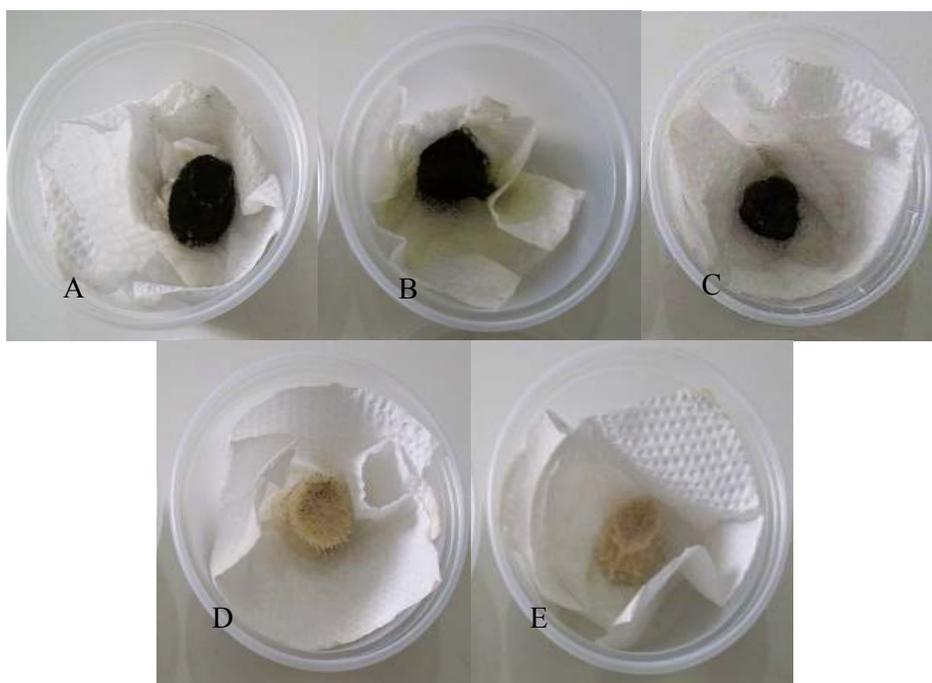


Figura 5. Discos desinfestados de caule de sisal, tratados por imersão no extrato aquoso de alho nas concentrações de A) 0%; B) 1%; C) 5%; D) 10% e E) 20%, inoculados com *A. niger* e incubados por cinco dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$.

No experimento em que o extrato de alho foi borrifado no disco de sisal, o volume do extrato utilizado pode ter contribuído para a inibição do crescimento micelial do fungo uma vez que, o disco de sisal e o papel toalha dentro dos potes

de plástico ficaram molhados. No experimento em que os discos de sisal foram imergidos no extrato de alho, o papel toalha não ficou umedecido com o extrato e ocorreu desenvolvimento do fungo nas concentrações de até 5% (Figura 5 e 6).

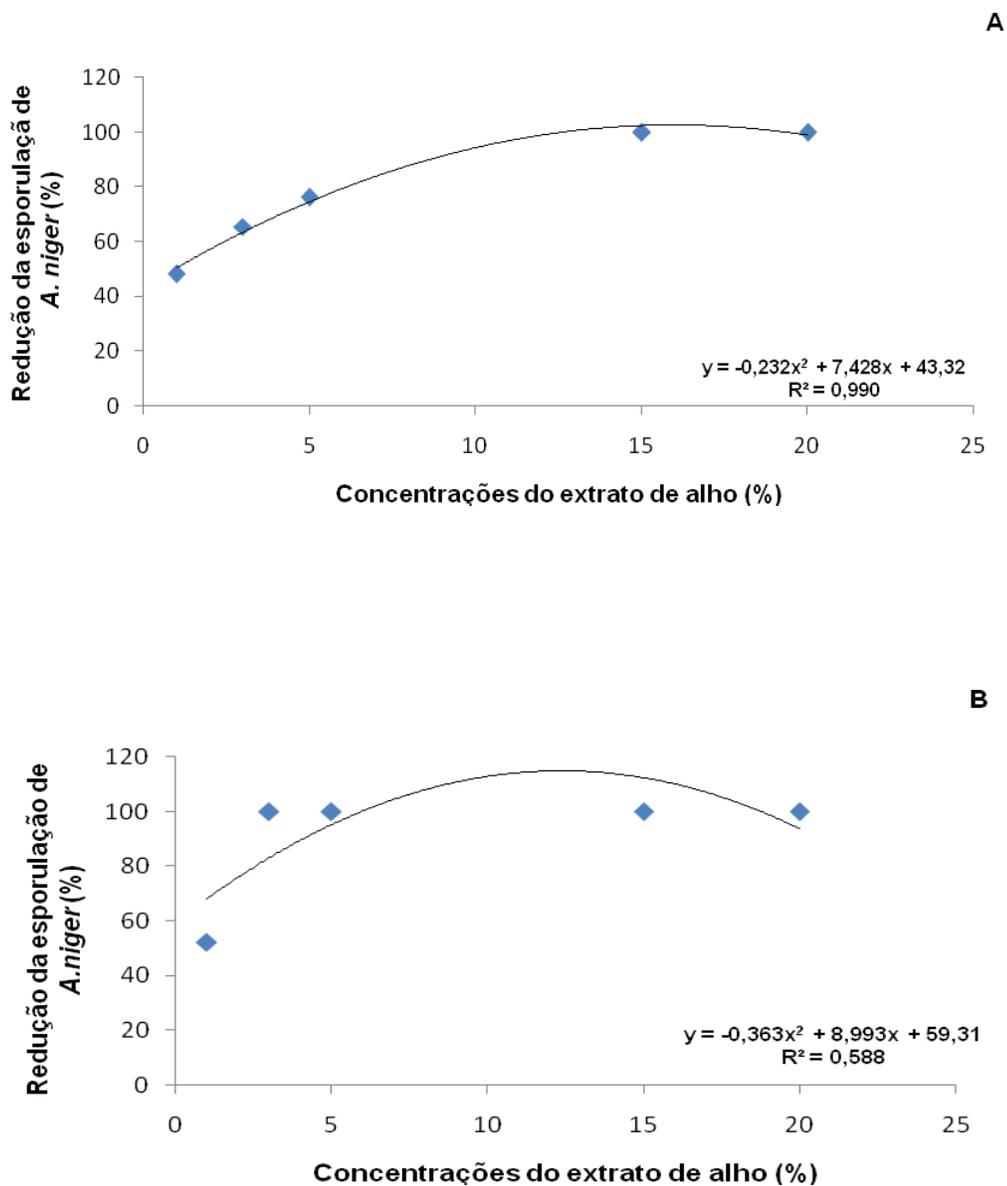


Figura 6. Esporulação de *A. niger* em disco de sisal inoculados com *A. niger* e incubados por cinco dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, (A) tratamento por imersão no extrato de alho, (B) tratamento por aspersion do extrato de alho.

Estes resultados também sugerem que compostos voláteis, além dos fixos, presentes no extrato aquoso de alho podem também ter contribuído para a inibição do crescimento de *A. niger*, uma vez que o extrato que permaneceu no papel toalha pode ter disponibilizado compostos voláteis. Para a avaliação do potencial dos compostos voláteis presentes no extrato de alho, um bioensaio foi conduzido com recipientes de alumínio colocados no interior da placa de Petri, onde se colocou o extrato de alho, de forma que o meio de cultura e a cultura do fungo não tivessem contato direto com o extrato, podendo dessa forma avaliar o efeito de compostos voláteis.

Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho inibiram o crescimento micelial de *A. niger*. Ocorreu inibição de 43,13% e 44,81% nas concentrações de 10% e 15% respectivamente, atingindo 57,14% na concentração de 20% (Figura 7). A taxa de esporulação do fungo diminuiu em 34,48% na concentração de 15% e nas concentrações de 3% e 5% ocorreu um estímulo na esporulação em torno de 25,86% (Figura 8).

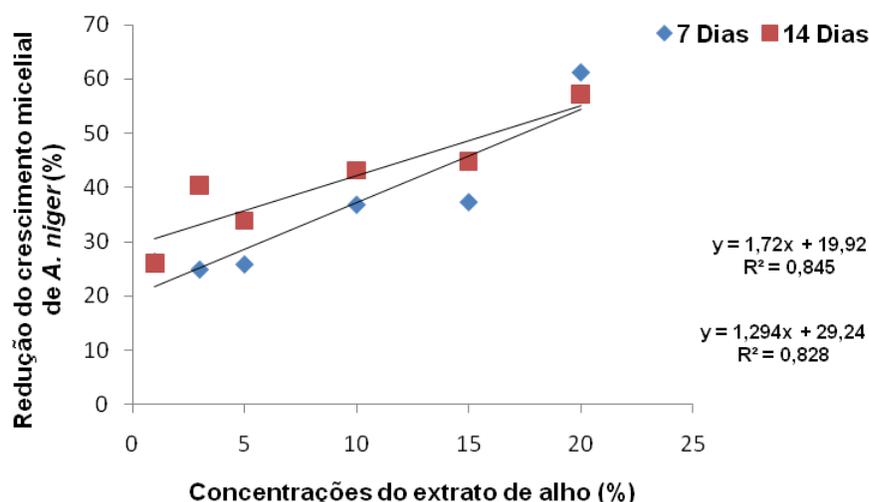


Figura 7. Crescimento micelial de *A. niger* no meio BDA em placas de Petri contendo recipientes com extrato aquoso de alho, em diferentes concentrações, sem contato direto do fungo e do meio com o extrato, evidenciando o efeito de

compostos voláteis produzidos pelo extrato aquoso de alho na placa, observação com 7 e 14 dias de incubação.

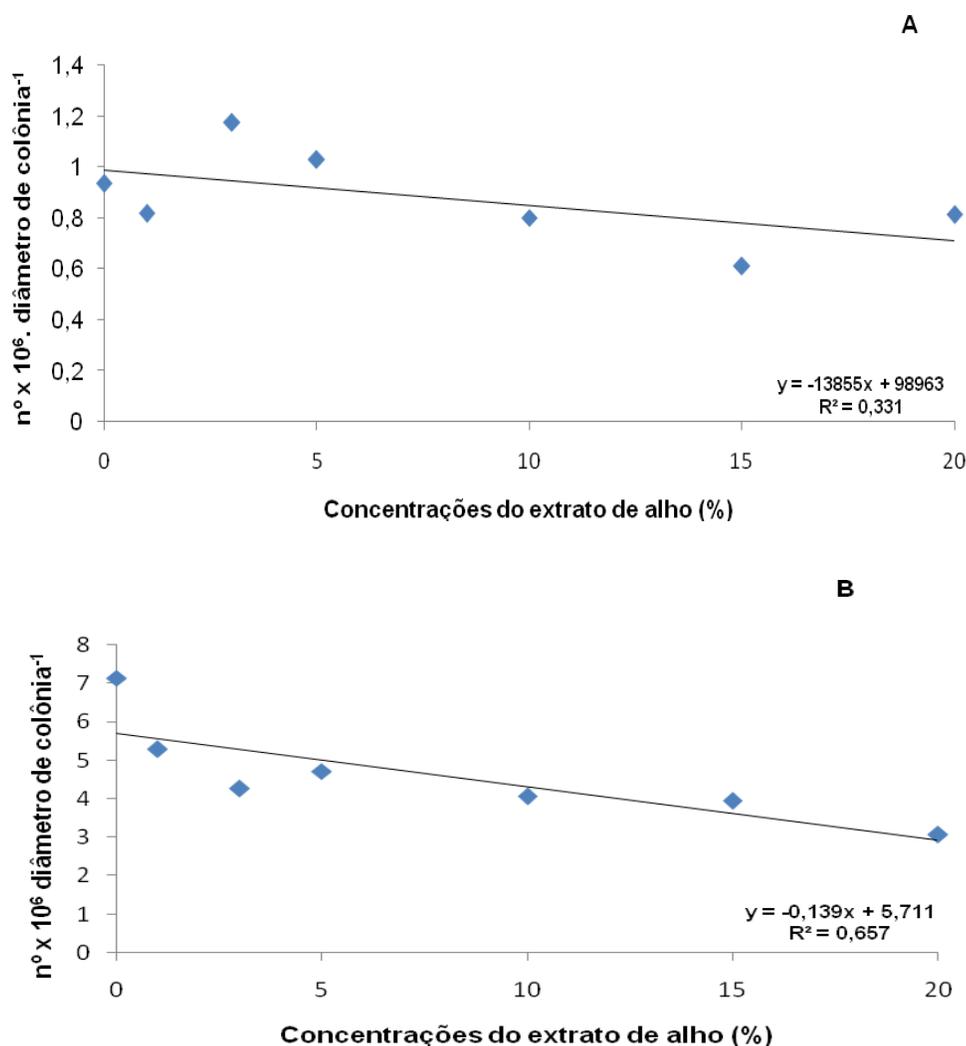


Figura 8. Esporulação de *A. niger* por diâmetro de colônia em meio BDA em placas de Petri contendo recipientes com extrato aquoso de alho, em diferentes concentrações, sem contato direto do fungo e do meio com o extrato, evidenciando o efeito de compostos voláteis produzidos pelo extrato aquoso de alho na placa, (A) Observação com 7 dias de incubação ; (B) Observação com 14 dias de incubação .

Segundo FRENCH (1992), a difusão de traços de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos. Nos estudos realizados por SIMÕES e SPITZER (2000), uma possível atribuição para a redução do potencial de inibição pode ser à volatilização dos constituintes dos extratos ou óleos, e/ou à

instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais modificando a atmosfera no interior das placas de Petri. Segundo KUBOTA et al. (1999), as substâncias que representam os compostos voláteis no alho contêm enxofre e um grupo alil (CH_2CHCH_2), particularmente dialil dissulfito, que é o sulfito mais abundante no bulbilho, embora os dialis mono, tri e tetra sulfitos possam também estar envolvidos.

Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho têm ação fungitóxica sobre *A. niger*, uma vez que o crescimento micelial e a esporulação foram reduzidos com o tratamento com extrato de alho, sem o contato direto do fungo com o extrato nas concentrações acima de 10%.

Apesar de ter sido observado um efeito significativo *in vitro* do controle de *A. niger* com extrato aquoso de alho, incluindo os ensaios nos discos de caule de sisal, os testes realizados em mudas de sisal, em viveiro, não demonstraram eficiência deste extrato no controle da podridão vermelha em mudas de sisal (Figura 9). O extrato aquoso de alho na concentração de 15% retardou um pouco o aparecimento e a severidade dos sintomas de podridão vermelha nas plantas de sisal. Nas demais concentrações, o índice da doença foi também um pouco menor nas mudas tratadas com extrato de alho, em comparação com as mudas do tratamento testemunha, inoculadas com o fungo, embora quando se usou a concentração de 20% do extrato aquoso o índice de doença aumentou (Figura 9).

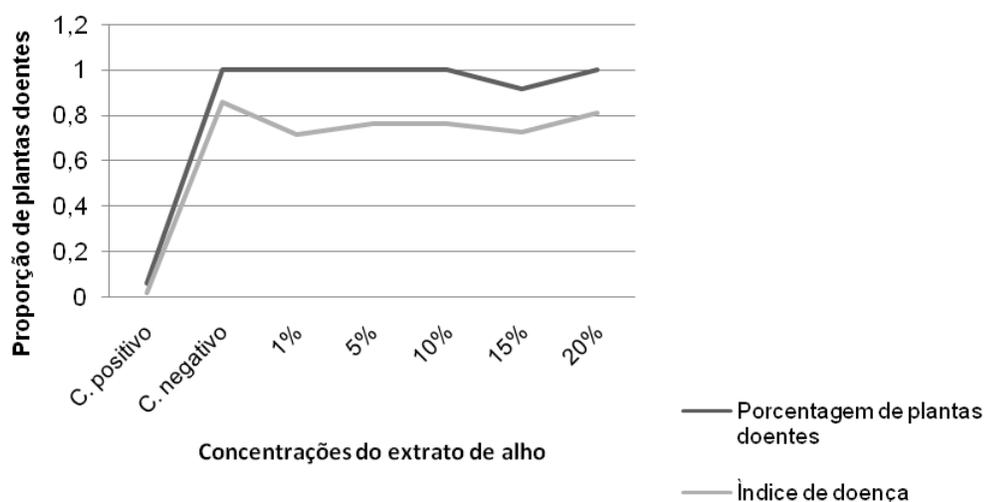


Figura 9. Proporção de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, após tratamento com extrato de alho e inoculação com *A. niger* no caule com

ferimento, em avaliação realizada com 20 dias. Controle negativo (mudas imergidas em água destilada e inoculadas por aspersão da suspensão de *A. niger* 10^{-7} /mL⁻¹ conídios) e controle positivo (mudas não inoculadas, no local da lesão foi aplicada apenas água destilada)

Em condições controladas, *in vitro*, não ocorreu o desenvolvimento do fungo na presença do extrato vegetal, a partir da concentração de 3%. Entretanto, nas mudas de sisal, o extrato de alho não controlou a doença, sugerindo que este não inibiu o desenvolvimento do fungo, ocorrendo infecção e colonização dos tecidos de sisal e desenvolvimento dos sintomas de podridão vermelha. Possivelmente, a forma de aplicação do extrato, por imersão da raiz e caule da muda de sisal, interferiu na ação deste no controle do fungo. Formas diferentes de aplicação do extrato na planta devem ser posteriormente avaliadas. CORDEIRO (2008) ao estudar extratos etanólicos de plantas medicinais afirma que quanto maior o tempo de exposição destes com o organismo a ser controlado, maior é o potencial inibitório do extrato. Em seus estudos com extrato aquoso filtrado das fibras de sisal utilizado para inibição do desenvolvimento de larvas de mosquitos, PIZARRO et al. (1999) afirmaram que diminuindo as doses do extrato e aumentando o tempo de exposição deste com as larvas também se tem resultados satisfatórios. Assim, seria necessária a elaboração de estudos mais detalhados para determinar o tempo ideal de exposição da planta ao extrato aquoso de *A. sativum* L. e as formas de aplicação do extrato para garantir a inibição do desenvolvimento de *A. niger* e controle da podridão vermelha do caule do sisal.

CONCLUSÕES

1. O extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.), quando esterilizado em autoclave, diminui consideravelmente suas propriedades inibitórias sobre o fungo *A. niger*;
2. O extrato de alho esterilizado por filtração controla o crescimento micelial e esporulação *in vitro* de *A. niger* em 100 % nas concentrações acima de 3 %;
3. a aplicação do extrato aquoso de alho por imersão das raízes e caule da muda por dois minutos não promoveu o controle da podridão vermelha em mudas de sisal, nas concentrações de 1 %, 3 %, 5 %, 10 % e 20 %, ocorrendo diminuição do índice de doenças nas plantas com a adição de 15 % do extrato;

4. Os testes *in vitro* indicam o potencial de uso de extrato de alho para o controle de *A. niger*. Entretanto, no controle da podridão vermelha do sisal, a metodologia de aplicação do extrato deve ser mais estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. O, SANTIAGO, E. GIRÃO. MOREIRA LIMA, A. R.. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do nordeste brasileiro**. 2005. Disponível em:http://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11. Acesso em: 25 abr. 2010.

BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K, R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: I. avaliação *in vitro*. **Fitopatologia brasileira**. , v.31, n.3, p. 310-314, 2006.

BARROS, ST.; OLIVEIRA, N.T. & MAIA, LC. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* sp. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p.168-170, 1995.

BASTOS, C.N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p. 454 - 457, 1992.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos**. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, p.919.1995.

BOLKHAN, H.A.; RIBEIRO, W.L. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.565-566, 1981.

BRAND, S. C.; JUNGES, E.; MILANESI, P.; BLUME, E. & MUNIZ, M.F. B. **Extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola**. 2006. Disponível em: www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos. Acesso em: 23 fev.2009.

CARRICONDE, C.; MORES, D. **De volta às Raízes**. Olinda: GCL Gráfica e Editora Ltda., p.13.1988.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, E. S. **Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea sp.*) no Nordeste**. In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro. João Pessoa, PB. João Pessoa: **Anais Emepa**. v.1, p.99-112. 2002. 312 p.

CNA. **Sisal: problemas e soluções**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25 jan.2010.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Sensitivity of heatstressed yeasts to essential oils of plants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 229-233, 1984.

CONSOLI, M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva**. Ribeirão Preto, 2009, p.119.

CORDEIRO, L. N. **Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós- Graduação em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande: Patos, 2008. 89p.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria,

45, 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos. UFSCar, 2000. p-255-258

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, v.84, n.3, p.277-288, 1992.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**, 8ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. .2003.p.1008.

KUBOTA, N.; MIYAMUKI, M.; YAMANE,Y.; KOBAYASHI, A. Breaking bud dormancy in grapevine cuttings with garlic volatiles. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.68, n.6, p.927- 931. 1999.

LEMAR K.M.; PASSA O.; AON M.A. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produces oxidative in *Candida albicans*. **Microbiology (Reading, Engl.)** v.151, p. 3257- 3265. 2005.

LO, S.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.1, p.21-31, 1996.

LORENZETTI. E. R. **Agrohorteopatia – uma nova ferramenta ao alcance do agricultor**. Disponível em:<http://www.portaldahorticultura.xpg.com.br/agrohorteopatia.html>. Acesso em: 25 abr. 2010.

MAIRESSE, L. A. S., COSTA, E. C.. **Contaminação ambiental pela agricultura e as novas perspectivas com a moderna biotecnologia**. Orium, Santa Maria 159 p. 2009.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**. v. 6, p.195-218. 1923.

NOWACKI, J. . C. **Efeito de extratos vegetais no controle da galha das crucíferas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná:Curitiba. 2005. p.56.

OLIVEIRA DE SÁ, J. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009. p. 65.

PIZARRO, A, P, B., OLIVEIRA FILHO, A, M., PARENTE, J, P. MELO, M.T.V., SANTOS, C. E., LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.32, n.1, p. 23-29, 1999.

QUINTAES, K.D. Alho, nutrição e saúde. **Revista NutriWeb**, v.3. p. 3, 2001.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999.

SILVA, R. A ; SOUZA, P.E. ; SANTOS, C. D. ; MASSAHUD, N. : RESENDE, J. T. V.: CAMOLESI, J. F.; GAVILANES, M. L.; SILVA, M. A. M. Plantas daninhas medicamentosas de ação fungicida. In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 13. São João del Rei. 1999. **Anais...São João Del Rei**, SBQ, p.225-235. 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. ;SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18.1102p.

SINDIFIBRAS. **Ações para prevenção e controle da Podridão Vermelha do Sisal na região sisaleira do estado da Bahia**. Disponível em: <http://www.brazilianfibres.com.br/?p=736>. Aceso em: 12 mar. 2010

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., CRUZ, M.E.S., STANGARLIN, J.R. & PASCHOLATI S.F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p.346. 1997.

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**, v.11, n.3, p.16-21, 1999.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, **Anais...**, BA. 2006.

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**. n. 32, p. 465-471. 2007.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Utilização de extrato aquoso de sabugueiro (*Sambucus nigra*) para inibição in vitro de *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pos Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009a.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Atividade in vitro do extrato aquoso de boldo (*Peumus boldus*) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pos Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009b.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da

podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009c. p.14-15.

SOUZA, L. S. S. ; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de pata-de-vaca (*Bauhinea variegata* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009d. p.16-17.

TALAMINI, V. & STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, p. 45-62, 2004.

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

YU, D.; TODA, Y., KUWADA, K.; CRUZ,A. F.; ISHII,T. Effect of volatile compounds in shoots and leaves of bahiagrasss, *Vulpia myuros* and *Vulpia megalura* on the growth of several kinds of soil-borne plant pathoges amd beneficial microorganisms .**Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management**. V.16, n.1, p. 29-35.2009.

CAPÍTULO 2

**EXTRATO AQUOSO DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine) NO
CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E MANCHAS FOLIARES
CAUSADAS POR *Aspergillus niger* NO SISAL**

EXTRATO AQUOSO DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine) NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA E MANCHAS FOLIARES CAUSADAS POR *Aspergillus niger* NO SISAL

Liane Santos Sales Souza
Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO

O Brasil é o país que mais produz fibra de sisal no mundo e várias famílias nordestinas dependem desta atividade agroindustrial para garantir a sua sobrevivência. O sisal é uma planta semi xerófito que foi trazida do México e logo se popularizou no semi-árido nordestino. A *Agave sisalana* Perrine apresenta em sua composição química vários compostos orgânicos, como o ácido oxálico, a cortisona e a saponina, substâncias que têm sido relacionadas a processos de interação planta-animal, por causarem efeitos de irritação, antibiose ou toxicidade. Vários estudos realizados comprovam a ação inibitória do extrato obtido do sisal a vários tipos de fungos e bactérias patogênicas. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do extrato aquoso de folhas de sisal sobre crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos de *Aspergillus niger* e nas lesões foliares e podridão vermelha do caule de sisal. O extrato aquoso de sisal, nas concentrações estudadas, não inibe o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*. Em todas as concentrações, ocorreu o estímulo da germinação dos esporos. As lesões foliares só ocorreram com a instalação de câmara úmida e aumentaram de tamanho à medida que aumentou a concentração do extrato de folha. Em condições de casa de vegetação, o uso do extrato aquoso de sisal causou o aumento na intensidade e severidade da doença e, nas concentrações acima de 30%, todas as plantas morreram no período de 10 dias após a inoculação.

Palavras-chave: sisal, controle alternativo, podridão vermelha, extratos vegetais, *Aspergillus niger*

SISAL (*Agave sisalana* Perrine) AQUEOUS EXTRACT AND CONTROL OF RED ROT DISEASE AND LEAF SPOTS CAUSED BY *Aspergillus niger* ON SISAL

Liane Santos Sales Souza
Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT

Brazil is the country with the highest production of sisal fiber in the world and many families in the north eastern region depend on this agro-industrial activity to ensure their survival. Sisal (*Agave sisalana* Perrine) is a semi xerophytic plant that was brought from Mexico and soon became popular in the semi-arid region. *Agave sisalana* L. has amongst its chemical compounds, oxalic acid, cortisone and saponin, substances which have been associated with plant-animal interactions, with mechanisms of irritation, toxicity or antibiosis. Several studies have shown the inhibitory action of sisal extract against several types of fungi and bacterial pathogens. This study aimed to evaluate the effect of aqueous extract from the leaves of sisal on mycelial growth, sporulation, and spore germination of *Aspergillus niger*, and on leaf spots and stem red rot disease of sisal. The aqueous extract of sisal, in the concentrations studied, did not inhibit mycelial growth and sporulation of *A. niger*. At all concentrations, stimulation of *A. niger* spore germination was observed. Leaf lesions only occurred with the use of a humid chamber and increased with the increase in sisal extract concentrations. Under green house conditions, the use of sisal leaf extract causes an increase in disease incidence and severity, leaves only occurs with the installation of a moist chamber and increase in size with increasing concentration of the extract. Under greenhouse conditions the use of aqueous extract sisal increases the intensity and severity of disease, and with concentrations of 30% and above, all plants died in a period of ten days after inoculation.

Key-words: sisal, sisal alternative control, plant extracts, red rot disease, *Aspergillus niger*.

INTRODUÇÃO

O semi-árido do nordeste brasileiro, região com a maior produção mundial de fibra de sisal, depende desta cultura para geração de renda e de empregos diretos e indiretos, e a garantia da sobrevivência de mais de 700.000 famílias, pois em muitos municípios esta é a principal atividade agroindustrial (SILVA e BELTRÃO, 1999).

A planta de sisal, originária do México, foi trazida para o Brasil e logo se disseminou pelo semi-árido baiano. O sisal é uma monocotiledônea pertencente à classe Liliopsida, ordem Liliales e a família Agavaceae, sendo a espécie mais cultivada no Brasil a *Agave sisalana* Perrine. Segundo AZZINI et al. (1998) esta é praticamente a única espécie cultivada em nosso País para a produção de fibras denominadas "fibras duras" ou estruturais e as suas características agrônomicas e tecnológicas têm permanecido inalteradas em decorrência de sua propagação vegetativa, por meio de bulbilhos e rebentões.

No beneficiamento do sisal, apenas 4% da folha produz uma fibra rígida que é usada para diversos fins, como produção de cordas, artesanato, tapetes, etc., e o restante 96% é composto de resíduos sólidos e líquidos, denominados de mucilagem e suco, que são normalmente descartados, utilizados para adubação dos plantios e para alimentação animal (OASHI, 1999).

Nas últimas décadas têm-se verificado um declínio na produção de sisal no semi-árido, sendo este fato atribuído, entre outros fatores, a problemas fitossanitários que incluem a podridão vermelha do caule (WANDERLEY FILHO et al., 2006), causada pelo fungo *Aspergillus niger* (SOARES et al., 2006). A falta de nutrientes também pode causar sintomas de amarelecimento e murcha das folhas de sisal, o que também interferem na produtividade da cultura (SALGADO et al., 1982)

O suco de sisal apresenta em sua composição química, vários compostos orgânicos, como o ácido oxálico, a cortisona e a saponina, substâncias que têm sido relacionadas a processos de interação planta-animal, por causarem efeitos de irritação, antibiose ou toxicidade (PIZARRO, 1999; WILKOMIRSKI et al., 1975). As saponinas são glicosídeos formados por uma aglicona com esqueleto de

triterpeno, esteróide ou alcalóide esteróidal, a qual está ligada uma (saponina monodesmosídicas) ou duas (saponina bidesmosídicas) cadeias de açúcares, que podem ser lineares ou ramificadas. Na *A. sisalana* as saponinas (porção não glicosídicas de uma saponina) encontradas são: tigogenina e a diosgenina, ambas com funções analgésicas, anti-oxidantes e anti-inflamatórias e a hecogenina, com a função principal de síntese de corticosteróides, sendo esta última encontrada em maior quantidade (OLIVA NETO *et al.*, 2005).

Estudos realizados por GONÇALVES JÚNIOR (2002) demonstraram o efeito do suco do sisal no controle do nematóide de galhas do tomateiro. PIZARRO (1998, 1999) diagnosticou ações biocidas do extrato aquoso de sisal em relação ao carrapato bovino e larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. O suco fresco de sisal foi utilizado em plantas de milho em diferentes idades, sem causar fitotoxicidade nas plantas (NEGREIROS *et al.*, 2006). O extrato produzido da folha de sisal alterou o crescimento micelial, produção e fertilidade de picnídios de *Botrydiplodia theobromae* (LARANJEIRA *et al.*, 1995). O suco curtido de *Agave sisalana* L. controlou os fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., em torno de 47,2 e 39,5%, respectivamente (BARRETO *et al.*, 2010). O extrato aquoso de agave (*Agave sisalana* Perrine) teve efeito inibitório na germinação de conídios e impedimento do crescimento micelial em *Fusarium oxysporum*, reduzindo a intensidade de murcha em feijão vagem (MORAIS, 2004).

No trabalho de VERASTEGUI *et al.* (1996) citado por SANTOS *et al.* (2009) foram avaliados extratos etanólicos de *Agave lechiguilla* contra 20 microorganismos (*Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Nocardia asteróides*, *Nocardiabrasiliensis*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Cândida rugosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus Laurenti*, *Cryptococcus albidus*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* e *Sporotrix schenckii*), apresentando ação deste extrato contra as bactérias *C. perfringens* e *S. dysenteriae* e todos os fungos testados, exceto *C. krusei*.

Existem poucos trabalhos utilizando extratos vegetais para o controle do *A. niger* na cultura do sisal, embora estudos preliminares utilizando extratos de pata de vaca, orégano, boldo e sabugueiro demonstraram redução e inibição do

crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos (SOUZA e SOARES, 2009a; SOUZA e SOARES, 2009b; SOUZA e SOARES, 2009c; SOUZA e SOARES, 2009d).

Considerando que os produtores da região sisaleira utilizam o resíduo do desfibramento do sisal (mucilagem e suco) para adubação dos plantios de sisal e alimentação animal, torna-se necessário avaliar o efeito destes resíduos agrícolas no crescimento do fungo *A. niger* e na incidência e severidade da podridão vermelha do sisal.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato aquoso da folha de sisal (*A. sisalana* Perrine), sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. niger* e o desenvolvimento de manchas foliares e da podridão vermelha do caule, causadas por *A. niger* em plantas de sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana* Perrine)

Folhas de sisal (*Agave sisalana* Perrine) foram lavadas com água destilada e trituradas em liquidificador (750 g de folhas em 1000 mL de água destilada) por três minutos, obtendo-se extrato aquoso com a concentração de 75% (p/v). O extrato foi filtrado em funil de vidro contendo algodão estéril e por último em membrana de nitrocelulose (Millipore) com poros de 0,22 µm de diâmetro, sendo este armazenado em tubos de centrifuga com tampa de rosca, esterilizados, a temperatura de -20°C até sua utilização. As outras concentrações foram obtidas por diluição do extrato aquoso na concentração inicial de 75% com água destilada e esterilizada ou no meio de cultura batata dextrose ágar (BDA).

Efeito *in vitro* do extrato aquoso de sisal sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*

Nos ensaios *in vitro*, utilizou-se o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 minutos. O extrato de sisal preparado e esterilizado, conforme descrito acima foi incorporado ao meio de

cultura BDA, quando o meio se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação, sendo em seguida vertido em placas de Petri. O meio de cultura BDA foi preparado com a quantidade de água necessária para completar para 1 litro com a adição do extrato, evitando-se assim a diluição do meio com a incorporação do extrato de sisal. No tratamento controle utilizou-se o meio de cultura BDA sem a adição do extrato de sisal.

O fungo *A. niger*, isolado de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha do caule, foi multiplicado em meio BDA por sete dias a temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$) e discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para as placas de Petri contendo o meio BDA com as diferentes concentrações dos extratos aquosos. As culturas foram incubadas em câmara tipo BOD a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ e a avaliação do crescimento micelial foi realizada no período de 7 a 14 dias, medindo-se o diâmetro da colônia, com régua milimetrada. A medição foi realizada até quando a colônia do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos, foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada, com duas gotas de Tween 20 e a colônia foi raspada com alça de Drigalski para a obtenção de suspensão de esporos. A contagem de esporos foi feita em câmara de Neubauer (hemacitômetro), com auxílio de um microscópio ótico, com aumento de 400X, calculando-se a concentração de esporos no volume total da suspensão de esporos (20 mL).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, sendo o tratamento controle (meio BDA sem extrato aquoso de sisal) e os seguintes tratamentos: meio BDA com as concentrações de 15%, 30%, 45%, 60% e 75% (p/v) de extrato aquoso de folhas de sisal, com cinco repetições por tratamento.

Efeito do extrato aquoso de sisal sobre a germinação de esporos de *A. niger*

Uma alíquota de 40 μL da suspensão de esporos de *A. niger* (10^{-7} conídios. ml^{-1}) e uma alíquota de 40 μL de cada uma das concentrações do extrato aquoso de sisal 15%, 30%, 45%, 60% e 75% (p/v), filtrado em membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,22 μm) foram colocadas em lâminas escavadas e como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada. As lâminas escavadas foram

mantidas em câmara úmida em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e foram incubadas em BOD a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A porcentagem de germinação de esporos foi determinada inicialmente 15 horas após a incubação e posteriormente de hora em hora. Para a determinação do período de germinação de esporos, estes foram avaliados a cada hora, sendo considerado o período em que aproximadamente 100% dos esporos do tratamento controle estavam germinados. Antes da contagem, para paralisar a germinação de esporos foi colocada uma gota de azul algodão de lactofenol nas lâminas escavadas contendo as suspensões de esporos. A avaliação foi realizada em microscópio ótico, contando-se o número de esporos germinados e não germinados, num total de 200 esporos por repetição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e seis tratamentos. Os tratamentos controles foram constituídos por esporos em água destilada esterilizada e foram avaliadas as seguintes concentrações de extrato aquoso de folha de sisal: 15%, 30%, 45%, 60% e 75% (p/v).

Efeito do extrato aquoso de sisal sobre *A. niger* nas condições de casa de vegetação.

Na avaliação do efeito do extrato aquoso na severidade da podridão vermelha do sisal, 280 mudas de sisal oriundas de bulbilhos plantados na área experimental do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, no Campus de Cruz das Almas da UFRB, foram plantadas em sacos de polietileno (21 x 14,5 cm) com capacidade para 1 dm^3 , contendo solo de área de pastagem do Campus de Cruz das Almas. As mudas de sisal com aproximadamente 25 cm de altura, foram mantidas em estufa agrícola com sombreamento de 50%. Para a inoculação de *A. niger*, foram feitas lesões padronizadas nas mudas (quatro perfurações equidistantes, com 1 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro, no caule), conforme descrito por SÁ (2009). As mudas foram imersas em recipientes contendo o extrato aquoso de sisal, nas concentrações de 15%, 30%, 45%, 60% e 75% (p/v), por dois minutos, exceto no tratamento controle, no qual as mudas foram imersas em água por dois minutos. As mudas foram retiradas do extrato, colocadas em bandejas plásticas para secar ao ar livre por quinze minutos e, em

seguida, foram inoculadas com *A. niger* via aspersão de suspensão de esporos na concentração de 10^{-7} conídios.mL⁻¹ nas raízes e no caule, sendo plantadas imediatamente após a inoculação. No tratamento controle positivo foi aplicado somente água destilada esterilizada no local das lesões e no tratamento controle negativo, as mudas sofreram ferimentos, foram imersas em água e inoculadas com *A. niger*. O experimento foi avaliado com 10 e 20 dias, sendo avaliadas 20 plantas de cada parcela do experimento para incidência e severidade da doença, utilizando-se a escala descrita por SÁ (2009).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos, o controle positivo e o negativo e as concentrações descritas acima, com 20 repetições por tratamento.

Efeito do extrato aquoso de sisal sobre a severidade de manchas foliares causadas por *A. niger* em plantas de sisal

Foram coletadas sete plantas de sisal da área experimental do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, no Campus de Cruz das Almas da UFRB e plantadas em vasos com capacidade para 5 Kg, contendo solo de área de pastagem do Campus de Cruz das Almas. De cada muda foram selecionadas 10 folhas. Em cada uma das 10 folhas foram feitos dois furos equidistantes causando uma lesão de 2 mm de comprimento. Sobre as folhas lesionadas foram aplicados os tratamentos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com sete tratamentos: controle positivo constando apenas de água, controle negativo com apenas a suspensão de *A. niger*, e as concentrações de 15%, 30%, 45%, 60% e 75% (p/v) do extrato aquoso de folhas de sisal e inoculação com *A. niger*, por aspersão de suspensão de esporos na concentração de 10^{-7} conídios.mL⁻¹, na região do ferimento na folha. As mudas foram envoltas por sacos plásticos de 100 litros para formar uma câmara úmida (Figura 1). O saco plástico foi retirado após 48 horas. As avaliações foram feitas com 4, 8 e 12 dias, sendo as lesões nas folhas medidas com régua milimetrada.



Figura 1. Experimento instalado para avaliar o efeito do extrato aquoso de sisal sobre lesões foliares causadas por *A. niger*, em condições de viveiro com a utilização de câmara úmida.

Análise estatística dos dados obtidos

Os dados relativos à inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. niger*, além das lesões nas folhas foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), com análise de regressão e teste de Tukey a 5% de probabilidade. O Índice de Doença (ID) foi obtido a partir da média ponderada das notas, conforme (MCKINNEY, 1923):

$$ID = \sum (n * f) / z * N$$

em que: ID é o Índice de Doença; n é a nota de severidade conferida à planta avaliada ; f é a frequência das notas no total das plantas avaliadas; Z é o valor numérico da nota máxima na escala e N é o total de observações. Para cada data de avaliação foi calculado o ID, obtendo ao final o ID acumulado do período avaliado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato aquoso de sisal na concentração de 15% inibiu apenas em 4,9% o crescimento micelial de *A. niger*. Nas demais concentrações avaliadas, 30%, 45%, 60% e 75%, ocorreu o estímulo do crescimento micelial do fungo. A concentração de 75% foi a que mais favoreceu o crescimento micelial, em comparação com o tratamento controle (Figura 2).

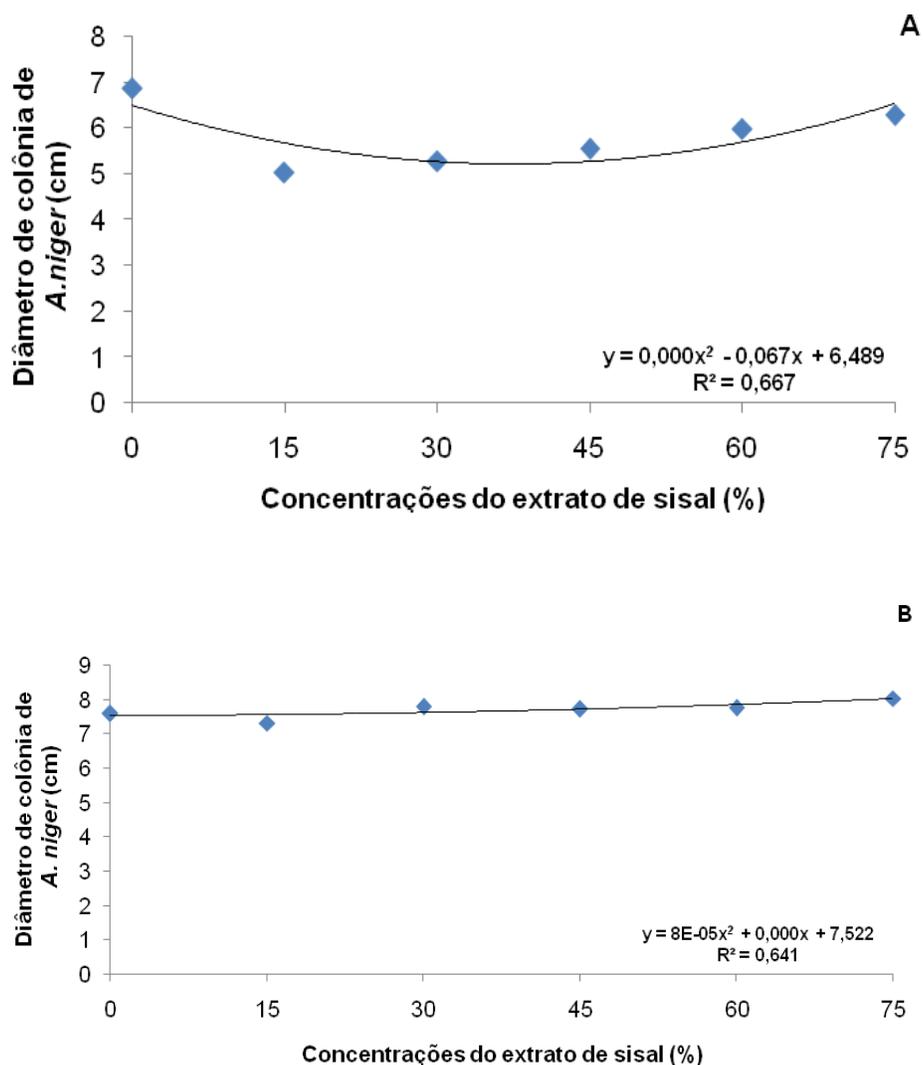


Figura 2. Crescimento micelial de *A. niger* em meio de cultura BDA com extrato aquoso da folha de sisal (*A. sisalana* Perrine) em diferentes concentrações. (A) Avaliação com 7 dias de incubação; (B) Avaliação com 14 dias de incubação.

As espécies do gênero *Aspergillus* crescem em altas concentrações de açúcar, nutrindo-se de água extraída de substâncias relativamente secas (PELCZAR et al., 1980). Segundo OLIVA NETO et al. (2005) um dos componentes do resíduo de sisal mais abundantes são as saponinas que são formadas por cadeias de açúcares. Sugere-se que os açúcares presentes no extrato da folha de sisal possam ter estimulado o crescimento micelial de *A. niger*, entretanto faz-se necessário mais estudos para comprovação do tipo de saponina que possa estar envolvida no desenvolvimento do fungo. Nas visitas as áreas produtoras de sisal, os produtores afirmam que nas áreas de sisal próximas à máquina de desfibramento, ou seja, áreas que recebem maiores quantidades do líquido e mucilagem como subprodutos do desfibramento do sisal, apresentam mais plantas com sintomas de podridão vermelha (observações de campo).

Os valores de contagem dos esporos, estatisticamente foram considerados não significativos. Entretanto, nas concentrações de 15% e 30% do extrato de sisal ocorreu um aumento na esporulação de *A. niger* em 8,6% e 9,2% respectivamente, e no tratamento de 75% atingiu 32,5%. Após 16 horas de incubação dos esporos de *A. niger* com o extrato da folha de sisal, no controle com apenas água destilada sem o extrato, os esporos tinham germinado em 50% de sua totalidade, enquanto que nos tratamentos com extrato de sisal, os esporos de *A. niger* haviam germinado em 100% e no tratamento com as maiores concentrações do extrato, observou-se também o maior desenvolvimento em tamanho do tubo germinativo (Figura 3).

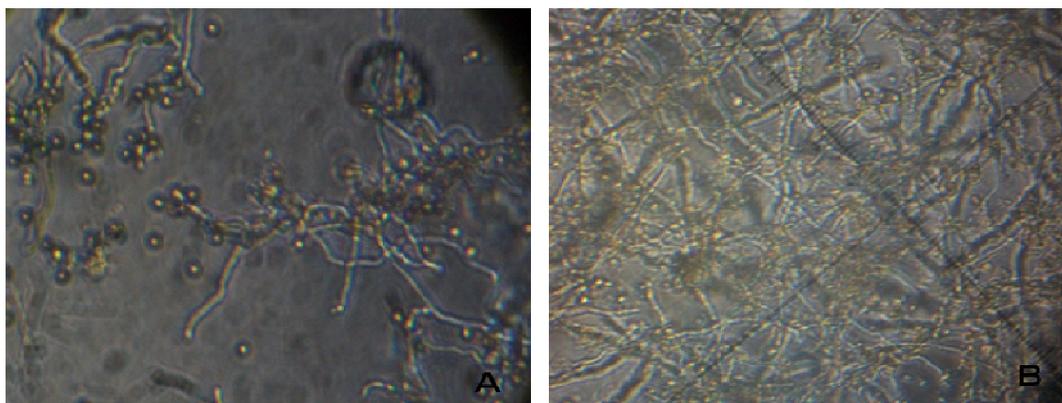


Figura 3: Efeito do extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana* Perrine) sobre a germinação dos esporos do fungo *A. niger*. A) Controle em água; B) extrato na concentração de 15% (p/v).

As lesões nas folhas de sisal só ocorreram com a utilização da câmara úmida, demonstrando a necessidade de umidade para que ocorra a infecção e colonização pelo fungo. As lesões aumentaram de tamanho com o aumento da concentração do extrato de sisal (Figura 4).

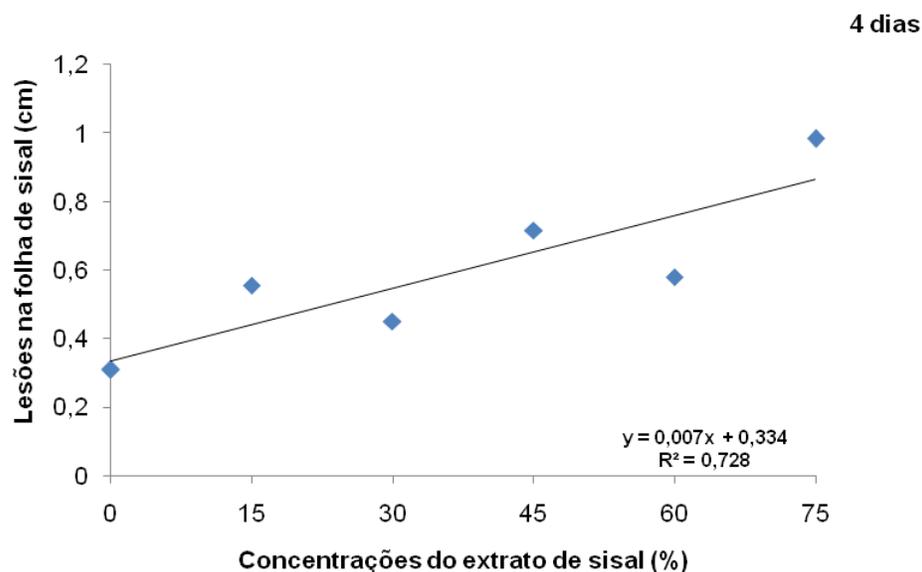


Figura 4. Efeito do extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana* Perrine) no desenvolvimento de lesões foliares em sisal, observadas após 4 dias de inoculação de *A. niger*, em condições de viveiro na presença de câmara úmida.

O aumento do tamanho das lesões causadas por *A. niger* nas folhas de sisal com o aumento da concentração do extrato de sisal aplicado na superfície das folhas correlacionou-se com os estudos de crescimento micelial e germinação de esporos *in vitro*, sugerindo que os componentes presentes no resíduo líquido e fresco de sisal estimulam o desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, promovem o aumento das lesões foliares causadas por *A. niger* (Figura 5).

O mesmo experimento foi realizado várias vezes sem a presença da câmara úmida e as lesões não evoluíram, evidenciando a necessidade de umidade para o desenvolvimento das lesões foliares. Observações de campo têm indicado que as lesões foliares são mais freqüentes no período das chuvas e em plantas com injúria como queima pelo sol ou ferimentos.

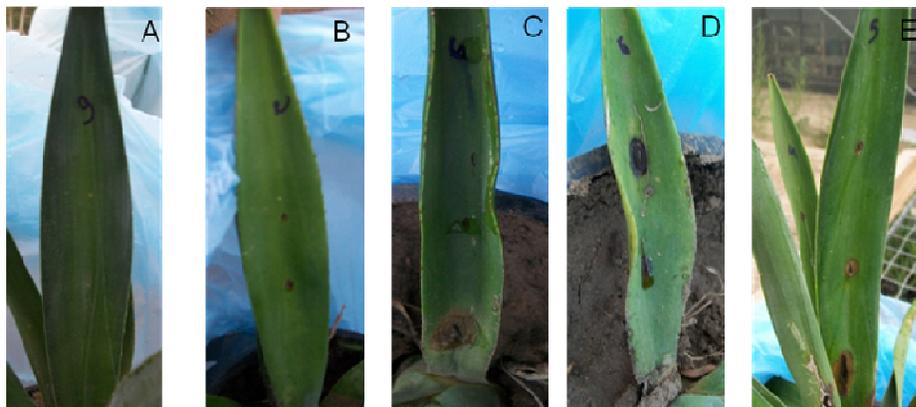


Figura 5. Lesões foliares em mudas de sisal na presença de extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana* Perrine) observadas quatro dias após a inoculação com *A. niger*, em condições de viveiro, com câmara úmida. A) Controle sem fungo, somente com água destilada estéril; B) Controle somente com fungo e água destilada estéril; C) 45% de extrato aquoso de sisal mais fungo; D) 60% de extrato aquoso de sisal mais fungo; E) 60% de extrato aquoso de sisal mais fungo.

Em condições de viveiro, o uso do extrato aquoso de sisal também causou o aumento na severidade da podridão vermelha do caule. O extrato aquoso de sisal causou o aumento no índice da doença em todas as concentrações, indicando que este acelera o desenvolvimento da doença. Apenas 10 dias após a inoculação do caule, todas as plantas estavam mortas ou murchas, em todos os tratamentos com a aplicação do extrato aquoso de sisal (Figura 6).

Os açúcares presentes no resíduo de sisal podem ter sido um dos fatores que estimularam o desenvolvimento do fungo. Assim, a presença do extrato associada à rega de 4 em 4 dias pode ter favorecido o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*, e o processo de colonização nos tecidos do caule e da folha das mudas e o aumento na severidade da doença, com morte das plantas 10 dias após a inoculação. No trabalho conduzido por SÁ (2009), a morte de mudas de sisal inoculadas com *A. niger* ocorreu 15 dias após a inoculação.

Algumas plantas tratadas com as concentrações mais altas entre 45% e 75% de extrato da folha de sisal possuíam na base das folhas, abundante esporulação de *A. niger*, indicando além da colonização interna dos tecidos ocorre também a proliferação externa e esporulação do fungo onde o extrato foi aplicado (Figura 7).

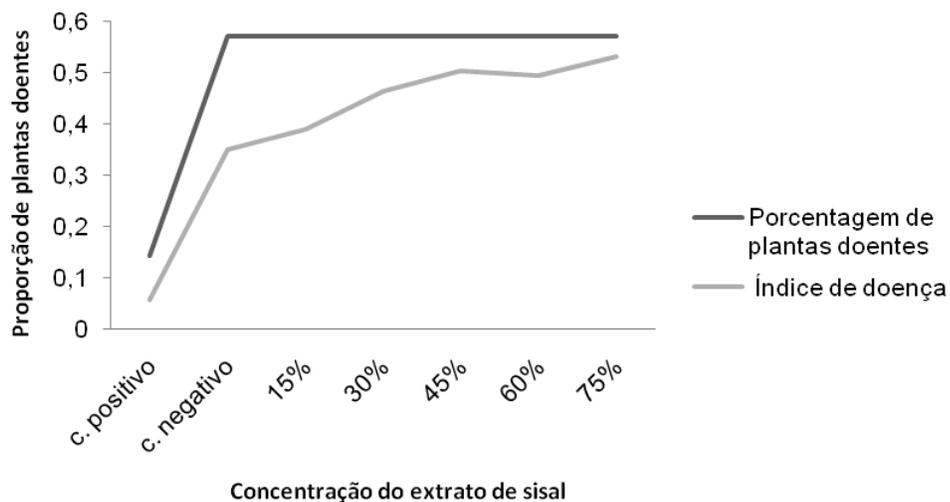


Figura 6. Proporção de plantas com sintomas de podridão vermelha, com a aplicação de extrato aquoso da folha de sisal (*Agave sisalana* Perrine) nas mudas e inoculação por aspersão com *A. niger*. Avaliação realizada com 10 dias. Controle negativo (mudas imersas em água destilada e inoculadas por aspersão da suspensão de 10^7 mL⁻¹ conídios de *A. niger*) e controle positivo (no local da lesão foi aplicada apenas água destilada).



Figura 7. Muda de sisal (*Agave sisalana* Perrine) tratada com extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana* Perrine) na concentração de 75% apresentando esporulação de *A. niger* na base das folhas e apodrecimento do caule, após 10 dias de inoculação.

Desta forma, faz-se necessário que ocorra uma orientação específica aos produtores da região sisaleira que utilizam o resíduo fresco em suas propriedades, visto que nestas condições ocorre o estímulo do fungo e um aumento da severidade da podridão vermelha, podendo causar o aumento da população do fungo no solo e na planta, e novas fontes de inóculo, com aumento da disseminação da doença na região produtora de sisal. Torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de tratamento do resíduo fresco de sisal de forma a eliminar o potencial deste em estimular o desenvolvimento de *A. niger* e a infecção e desenvolvimento de manchas foliares e podridão vermelha do caule.

CONCLUSÕES

1. O extrato aquoso da folha de sisal estimula o desenvolvimento de *A. niger*.
2. Nas concentrações mais altas de 60% e 75% ocorre um aumento no tamanho das lesões foliares causadas por *A. niger* em *A. sisalana* Perrine. As plantas de sisal, quando na presença do extrato de sisal (resíduo), apresentam sintomas mais severos e morrem mais rápido quando inoculadas com *A. niger* no caule, com morte das plantas em média 10 dias após a inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZZINI, A., GONDIM-TOMAZ, R. M. A., ERISMANN, N. M., COSTA, A. A.; BENATTI JUNIOR, R.. Caracterização tecnológica de híbridos de *Agave* **Bragantia** v. 57 n. 1, p.113-117, Campinas 1998.

BARRETO, A. F., ARAÚJO, E., BELTRÃO, N. E. MA., DIONÍZIO, G. **Análise sanitária de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch) da cultivar brs 201 tratadas com extrato de *Agave***. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/148.pdf. Acesso em: 24 jan.2010.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. Reunião Anual da Região Brasileira da

Sociedade Internacional de Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos. UFSCar, 2000. p-255-258.

GONÇALVES JÚNIOR, H.; **Avaliação de extratos de Agave no controle de galhas radiculares do tomateiro.** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba: Areia, 2002. 43p.

LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P.; OLIVEIRA, S. M. A. Efeito de extratos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Botryodiplodia theobromae*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 28. 1995, Ilhéus. **Anais...** Brasil. v. 20, p. 321. 1995.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research.** v. 6, p. 195-218. 1923.

MORAIS, M.S. **Efeitos de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem.** 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba: Areia, 2004. 48p.

NEGREIROS, K. V. DE; SANTOS, D. P. DOS; SOUSA, M. F. DE; ALVES, I., SILVA, M. N. B. Fitotoxicidade do suco do sisal (*Agave sisalana* Perrine) em folhas de milho (*Zea mays* L.) In: XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 10, 2006, (João Pessoa). **Resumos...** Editora Universitária/UFPB, 2006. p.25-26.

OASHI M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba.** Tese PhD (Doutorado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. Brasil. 1999.177p.

OLIVA NETO, P. LEITE, O.D., OGAVA, L.E., LIMA, J. P. **Desenvolvimento de pesquisa com a planta *Agave sisalana* e seus derivados.** Universidade

Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 2005. Disponível em: https://www.unesp.br/pautas/Sessao/00175/46/1/item_46.pdf. Acesso em: 10 fev. 2010.

OLIVEIRA DE SÁ, J. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009. p. 65.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. 1. ed. São Paulo: MCGRAW-HILL, 1980. 566 p.

PIZARRO, A.P.B.; OLIVEIRA FILHO, A M.; PARENTE, J P., MELO, M.V.; SANTOS, C.E.; O aproveitamento do resíduo da indústria do Sisal no controle de larvas de mosquito. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p.23-29, 1999.

PIZARRO, A.P.B.; Utilização do extrato de agave *Americana Linnaeus* no controle de *Boophilus microplus*, **Veterinária Notícia**, v.4, n.1, 1998.

SALGADO, A. L. B.; AZZINI, A.; FEITOSA, C. T.; HIROCE, R.. Efeito da omissão de macro nutrientes em sisal. **Bragantia** v.41 n. 13, p.125-134, 1982.

SANTOS, J. D. G.; BRANCO, A.; SILVA, A. F.; PINHEIRO, C; S. R.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A.P. T.; QUEIROZ, S. R. O. D. ; OSUNA, J. T. A.. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**. V.. 8 n.22, p. 6181-6184, 2009.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E. de M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1999. 205p.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e

podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, **Anais...**, BA. 2006.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Utilização de extrato aquoso de sabugueiro (*Sambucus nigra*) para inibição in vitro de *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana*). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009a.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Atividade in vitro do extrato aquoso de boldo (*Peumus boldus*) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana*). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009b.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009c. p.14-15.

SOUZA, L. S. S. ; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de pata-de-vaca (*Bauhinea variegata* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA). Salvador. **Anais...** 2009d. p.16-17.

WANDERLEY FILHO, M. J. R.; ARAUJO, E.; COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, P. V.; SILVA, A. D. Avaliação do emprego do extrato de nim (*Azadiraca indica*) no controle de fungos associados a podridão do sisal (*Agave sisalana* L.). In: XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 10, 2006 (João Pessoa). **Resumos...** Editora Universitária/UFPB, 2006.

WILKOMIRSKI B, BOBEYKO VA, KINTIA PK. New steroidal saponins of *Agave americana*. **Phytochemistry**. v. 14, p.2657-2659, 1975.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de extratos vegetais apresenta-se com enorme potencial para o controle de fungos fitopatogênicos e com grande vantagem, pois estes possuem pouca toxicidade ao meio ambiente e a outros seres vivos. Vários trabalhos têm sido realizados nas últimas décadas e demonstram sucesso no controle de doenças de plantas e de seres humanos.

O cultivo do sisal, que tem sido a principal fonte de renda e geração de empregos da região semi-árida do nordeste do Brasil, região que atualmente é a detentora da maior produção mundial de sisal, vem sofrendo com a podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *A. niger*. Apesar disso, poucos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para minimizar a disseminação desta doença e não existem produtos químicos ou alternativos para o seu controle.

Este trabalho permitiu que soluções alternativas, como o uso de extratos vegetais, fossem estudadas visando o controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal.

O extrato aquoso obtido dos bulbilhos de alho (*A. sativum* L.) controla em até 100% o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de esporos de *A. niger*, e até mesmo os compostos voláteis presentes no extrato são capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno em condições *in vitro*. Entretanto, quando o extrato foi avaliado em condições de viveiro, em mudas de sisal, não foram obtidos resultados significativos no controle da doença, fato que pode ser atribuído possivelmente à forma e o tempo de aplicação do extrato na planta podendo ser avaliado em pesquisas futuras.

O extrato aquoso obtido das folhas de sisal estimula o desenvolvimento do fungo em todas as concentrações testadas e não se obteve inibição deste nem em condições de laboratório, nem de viveiro na planta. Este extrato estimula o crescimento do fungo e aumenta o índice de doença, acelerando o aparecimento dos sintomas e morte da planta. Assim, sugere-se que os produtores da região

sisaleira não devem utilizar o resíduo fresco de sisal sem tratamento adequado. Formas de tratamento adequado do resíduo devem ser avaliadas para que este não sirva de substrato para o crescimento de *A. niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal.

Este foi um dos trabalhos iniciais com o uso de extratos vegetais no controle de *A. niger* e o controle da podridão vermelha do sisal, avaliando as condições *in vitro* e *in vivo*, dando assim suporte para que outros trabalhos possam ser desenvolvidos nesta linha de pesquisa. Estes resultados podem também ser utilizados para dar subsídios a novos testes para desenvolvimento de terapias alternativas com seres humanos, uma vez que, o fungo *A. niger* causa aspergilose em pessoas com a resistência imunológica deficiente.

Sugere-se que trabalhos futuros avaliem a forma e tempo de aplicação do extrato aquoso de alho na planta e o efeito deste extrato e do extrato da folha de sisal na sobrevivência do fungo no solo.