

Atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*

CELOTO, M.I.B.¹; PAPA, M.F.S.¹; SACRAMENTO, L.V.S.²; CELOTO, F.J.¹

¹Faculdade de Engenharia, Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, FE-UNESP, CEP 15385-000, Ilha Solteira-Brasil marlifsp@bio.feis.unesp.br ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, FCF-UNESP, CEP 14810-290, Araraquara-Brasil

RESUMO: Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos de extratos de *Momordica charantia* sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, e a eficiência destes extratos no controle da antracnose, causada por *C. musae*, em bananas. Extratos aquoso e hidroetanólico, obtidos de folhas e ramos, na concentração de 50% em relação ao volume adicionado, em meio sólido, proporcionaram 71 e 65% de inibição do crescimento micelial, respectivamente, enquanto que em meio líquido, a inibição do crescimento micelial foi de 86 e 81%, respectivamente. Somente o extrato aquoso e o tiofanato metílico, nas concentrações de 50% e 1000 µg mL⁻¹ respectivamente, proporcionaram 100% de inibição da germinação de esporos de *C. musae*. Os extratos metanólico e aquoso inibiram em 80 e 70%, respectivamente, o desenvolvimento das lesões em bananas, quando aplicados até dois dias antes da inoculação do fungo. Estes resultados foram semelhantes ao tratamento com tiofanato metílico, que inibiu 80% do desenvolvimento das lesões. Confirma-se a presença de substância antifúngica nos extratos de *M. charantia* e outros estudos devem ser realizados para viabilizar seu uso no controle da antracnose da banana.

Palavras-chave: *Musa* spp., melão-de-são-caetano, antracnose, extratos vegetais, controle alternativo

ABSTRACT: Antifungal activity of *Momordica charantia* L. extracts against *Colletotrichum musae*. The aims of the present work were to evaluate the effects of *Momordica charantia* extracts on mycelial growth and conidial germination of *Colletotrichum musae*, as well as the efficiency of these extracts in controlling anthracnose caused by *C. musae* in bananas. Water and hydroethanol extracts were obtained from leaves and branches at 50% concentration relative to the added volume. In solid medium, extracts led to 71 and 65% mycelial growth inhibition, respectively, whereas in liquid medium the mycelial growth was inhibited at 86 and 81%, respectively. Only water extract and thiophanate-methyl, at 50% and 1000 µg mL⁻¹, respectively, resulted in 100% inhibition of *C. musae* spore germination. Methanol and water extracts inhibited by 80 and 70%, respectively, the development of lesions in bananas when applied until two days before fungal inoculation. These results were similar to those of the treatment with thiophanate-methyl, which inhibited 80% development of lesions. The presence of antifungal substance was confirmed in *M. charantia* extracts. Future studies must be performed to make its use viable for the control of anthracnose in bananas.

Key words: *Musa* spp., bitter melon, anthracnose, plant extracts, alternative control

INTRODUÇÃO

As doenças de pós-colheita da banana (*Musa* spp.) são de grande importância, principalmente para os frutos destinados à exportação, destacando-se a antracnose causada por *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx. (Bastos & Albuquerque, 2004; Cordeiro

et al., 2005). As lesões de antracnose originam-se de duas formas distintas: lesões originadas de infecções que ocorrem em frutos verdes, permanecendo latentes até o amadurecimento; lesões oriundas de infecções ocorridas em pós-

colheita, decorrente de ferimentos na superfície dos frutos, resultando em lesões não latentes (Cordeiro et al., 2005). Esta doença diminui a vida de prateleira e a atração do consumidor pelo fruto, afetando assim, a qualidade e quantidade de banana disponível para exportação e consumo local (Khan et al., 2001; Anthony et al., 2004).

Para o controle da doença vêm sendo utilizados tratamentos químicos e práticas culturais, com a finalidade de reduzir a quantidade de inóculo no campo. Em pós-colheita, os fungicidas imazalil e tiabendazol estão registrados para o uso, por meio de imersão ou pulverização dos frutos e do engaço (Brasil, 2010), associado ao sistema de embalagem e transporte em condições de refrigeração (Cordeiro et al., 2005). Entretanto, a restrição ao uso destes produtos, devido a problemas de efeitos residuais, espectro de ação e resistência pelo patógeno, tem levado à procura de métodos alternativos de controle tais como, uso de biofungicidas, extratos de plantas e óleos vegetais (Khan et al., 2001; Bastos & Albuquerque, 2004; Thangavelu et al., 2004; Peres et al., 2009), que minimizem o uso de fungicidas convencionais (Anthony et al., 2004; Sponholz et al., 2004; Silva et al., 2008).

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae), conhecida popularmente como melão-de-são-caetano, é considerada planta daninha e medicinal. Na medicina popular é utilizada no tratamento de coccírias, sarnas e impinge (Lorenzi & Matos, 2002). Na medicina tradicional vem sendo estudada para o tratamento da diabetes (Batran et al., 2006) e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Ng et al., 1992). Recentemente, começou a ser estudada no controle de doenças de plantas (Celoto et al., 2008) e nematoides (Batista et al., 1999).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos de extratos de *Momordica charantia* sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, e a eficiência destes extratos no controle da antracnose, causada por *C. musae*, em bananas.

MATERIAL E METODO

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, da Faculdade de Engenharia, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, em Ilha Solteira, SP, no período de janeiro a junho de 2005.

A partir de folhas e ramos secos de *M. charantia*, coletados na região de Ilha Solteira, SP, foram obtidos os extratos aquoso e hidroetanólico, como descrito por Celoto et al. (2008). Foi depositada exsiccata do material de *M. charantia* no Herbário de Ilha Solteira/UNESP, sob o número de registro 7510. Os extratos metanólico e hidrometanólico foram

obtidos no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista, em Araraquara, SP, pelo processo de maceração das folhas e ramos, que permaneceram em contato com o solvente por sete dias. Após a extração, o solvente foi filtrado em papel plegueado, concentrado em rotaevaporador até a obtenção dos extratos secos. Os extratos foram mantidos em refrigerador a 10°C.

A partir de frutos de bananeira, oriundos de supermercado do município de Ilha Solteira, SP, com sintomas de antracnose, foi realizado isolamento direto do fungo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Pelo aspecto da colônia e dos esporos obtidos o fungo foi identificado como *C. musae*. As colônias obtidas foram preservadas em tubos de ensaio com solução salina (Castellani, 1939) e mantidas em refrigerador a 10°C.

Foram realizados dois ensaios *in vitro* para avaliar o efeito dos extratos de *M. charantia* em diferentes concentrações, sobre o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *C. musae*. Aliquotas dos extratos foram adicionadas aos meios BDA e Batata-Dextrose (BD) antes da autoclavagem e vertidos em placas de Petri e frascos de vidro (347 mL) para as concentrações finais de 5, 15, 25 e 50% dos extratos aquoso ou hidroetanólico e de 1, 10, 100 e 1000 µg mL⁻¹ dos extratos metanólico e hidrometanólico. Foi utilizado o fungicida tiofanato metílico, do grupo químico dos benzimidazóis, como um tratamento padrão para comparação com os tratamentos dos extratos, uma vez que o mesmo é relatado como eficiente no controle de *C. musae* (Ventura & Hinz, 2002). O tiofanato metílico foi incorporado aos meios BDA e BD, fundentes, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg mL⁻¹. No tratamento testemunha foi utilizado apenas meio BDA e BD sem adição de extrato ou fungicida. Cada placa de Petri e frasco de vidro receberam um e dois discos de 0,5 cm de diâmetro, retirados da borda de colônias do fungo, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25°C, sob fotoperíodo de 12 h, e os frascos de vidro foram mantidos em temperatura ambiente de 25 ± 3°C, sob fotoperíodo de 12 h e agitação constante em agitador orbital (40 rpm). Após seis dias, mediu-se o diâmetro do crescimento micelial do fungo desenvolvido nas placas de Petri e o peso seco do micélio do fungo nos frascos de vidro.

Para o teste de germinação, foi preparada uma suspensão de conídios, com seis dias de idade, calibrada em 4 x 10³ esporos mL⁻¹. Em cada célula da placa de Elisa ("Enzyme-linked immunosorbent assay"), foram colocadas 50 µL de suspensão de esporos e 50 µL de extrato ou fungicida, de modo a obter as concentrações desejadas. Essas placas

foram incubadas por 48 horas em câmara úmida a 25°C. No tratamento testemunha, foi adicionada água destilada esterilizada. Em microscópio ótico realizou-se a contagem de 100 esporos em cada célula, considerando-se como esporo germinado aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou maior que a largura.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri, um frasco de vidro ou duas células da placa de Elisa.

A partir dos resultados obtidos foram determinadas as percentagens de inibições do crescimento micelial (PIC) e da germinação de esporos (PIG) para cada tratamento, em relação ao tratamento testemunha, conforme Celoto et al. (2008). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SAS (SAS Institute, 2002).

A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC_{50}) e a dose letal para inibição de 50% da germinação dos esporos (DL_{50}) foram estimadas por meio de regressão linear.

No teste *in vivo* foram utilizados frutos de bananeira da variedade Missouri colhidos no estádio de maturação, com a casa ainda verde, na Fazenda de Ensino e Pesquisa da FE/UNESP, no município de Selvíria, MS. Os frutos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) e em água corrente. Para a inoculação, em cada fruto foi realizado ferimento superficial (0,5 cm de diâmetro) e colocados disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA mais crescimento fúngico, retirados de colônias do fungo. Foram avaliados seis tratamentos: 1) extrato aquoso sem diluição; 2) extrato hidroetanólico sem diluição; 3) extrato metanólico a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 4) extrato hidrometanólico a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) tiofanato metílico

a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 6) testemunha adicional (sem aplicação). As aplicações foram feitas 1, 24, 48 e 72 horas antes da inoculação e 24 e 48 horas após a inoculação. Após as inoculações, os frutos foram acondicionados em câmara úmida por 48 horas e a seguir, mantidos em condições de laboratório ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), dispostos em prateleiras, inteiramente casualizados, por 11 dias, até a maturação. As avaliações foram efetuadas mediante ao desenvolvimento da antracnose por meio de medidas do diâmetro das lesões.

No ensaio *in vivo* os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, com cinco tratamentos e seis épocas de aplicação (1, 24, 48 e 72 horas antes da inoculação e 24 e 48 horas após a inoculação) e a testemunha adicional com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por dois frutos de bananeira.

RESULTADO E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados referentes ao efeito dos extratos de *M.charantia* na inibição da germinação de conídios e no crescimento micelial de *C. musae* (Tabela 1), observa-se que o extrato aquoso e o fungicida tiofanato metílico proporcionaram 100%, de inibição da germinação dos conídios, diferindo significativamente dos demais extratos. O fungicida inibiu 100% do crescimento micelial do patógeno e o extrato aquoso 71%. O extrato aquoso provavelmente apresentou menor efeito no crescimento micelial devido à autoclavagem do extrato. Celoto et al. (2008) observaram que extrato aquoso de *M. charantia* não autoclavado, inibiu 91,6% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* a 20%, e 61,4% quando foi submetido a autoclavagem.

O ajuste das equações de regressão foi significativo para as diferentes concentrações dos

TABELA 1. Médias das percentagens de inibição do crescimento micelial (PIC), em meios sólido e líquido e da germinação de esporos (PIG) de *Colletotrichum musae* por extratos de *Momordica charantia* e tiofanato metílico. Ilha Solteira, SP. 2005.

Tratamento e dose	PIC		PIG
	Meio Sólido	Meio Líquido	
Extrato Aquoso - 50 ¹	71 b [*]	86 b [*]	100 a [*]
Extrato Hidroetanólico - 50 ¹	65 c	81 c	0 d
Extrato Metanólico - 1000 ²	54 d	55 d	57 b
Extrato Hidrometanólico - 1000 ²	36 e	44 e	42 c
Tiofanato Metílico - 1000 ²	100 a	97 a	100 a
CV (%)	1,13	2,69	2,34

¹ Valor da dose em %; ² Valor da dose em $\mu\text{g mL}^{-1}$; * Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si (Tukey 5%).

extratos de *M. charantia*, demonstrando o efeito linear das concentrações sobre a inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *C. musae*, ou seja, com o aumento da concentração dos extratos foi verificada maior inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos (Tabela 2). Segundo Thangavelu et al. (2004), o grau de inibição *in vitro* está diretamente correlacionado com a concentração de extratos de plantas em BDA. Ao testarem extratos de *Solanum torvum*, em diferentes concentrações contra *C. musae*, os autores observaram inibição micelial completa quando utilizaram as maiores concentrações de extratos (25 e 50%).

O fungicida tiofanato metílico inibiu completamente o crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. musae* para todas as concentrações avaliadas (Tabela 2). Na classificação dos níveis de toxidez para fungos, proposta por Edgington et al. (1971), composto com $EC_{50} < 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ possuem alta eficiência.

O extrato hidroetanólico apresentou valores de EC_{50} sobre o crescimento micelial, em meio sólido e líquido, abaixo da menor concentração testada (5%), porém não apresentou efeito sobre a germinação dos conídios do patógeno (Tabela 2). Ao avaliar o extrato aquoso, verificaram-se valores de EC_{50} estimados em 23 e 13% sobre o crescimento micelial em meio sólido e líquido, respectivamente. O valor da DL_{50} sobre a inibição de germinação de esporos de *C. musae* para o extrato aquoso foi estimado em 22%, confirmando a presença de substâncias com atividade antifúngica (Tabela 2).

Os resultados referentes ao efeito dos extratos no controle da antracnose *in vivo*, estão apresentados na Tabela 3. Todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, indicando a presença de substâncias antifúngicas nos extratos de *M. charantia* (Tabela 3). O tiofanato metílico apresentou maior efeito na redução da antracnose diferindo significativamente dos demais tratamentos.

TABELA 2. Equação de regressão linear (ERL), concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (EC_{50}), em meio BDA e BD, e dose letal para inibição de 50% da germinação dos conídios (DL_{50}) de *Colletotrichum musae*. Ilha Solteira, SP, 2005.

Tratamentos	Crescimento micelial						Germinação de esporos		
	BDA			BD			ERL	R^2	DL_{50}
	ERL	R^2	EC_{50}	ERL	R^2	EC_{50}			
Aquoso	$y = 1,09x + 25,07$	0,63 [*]	23 ¹	$y = 1,23x + 33,75$	0,71 [*]	13 ¹	$y = 2,13x + 2,17$	0,90 [*]	22 ¹
Hidrometanólico	$y = 0,32x + 50,35$	0,83 [*]	<5 ¹	$y = 0,43x + 61,30$	0,90 [*]	<5 ¹	ns	-	-
Metanólico	$y = 0,05x + 0,06$	0,99 [*]	999 ²	$y = 0,05x + 3,39$	0,95 [*]	932 ²	$y = 0,03x + 26,99$	0,69 [*]	767 ²
Hidrometanólico	$y = 0,04x - 1,29$	0,99 [*]	>1000 ²	$y = 0,04x + 0,17$	0,99 [*]	>1000 ²	$y = 0,03x + 17,25$	0,53 [*]	>1000 ²
Tiofanato metílico	ns	-	-	ns	-	-	ns	-	-

¹ Valores estimados a partir da equação de regressão linear, em %; ² Valores estimados a partir da equação de regressão linear, em $\mu\text{g mL}^{-1}$; ns Não significativo ao nível de 5% de probabilidade; *Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 3. Média dos diâmetros das lesões (cm), causadas por *Colletotrichum musae* em bananas da variedade Missouri tratadas com extratos aquoso, alcoólico, metanólico e hidrometanólico de *Momordica charantia* e com tiofanato metílico aos 11 dias após a instalação do experimento. Ilha Solteira, SP, 2005.

Tratamentos - $\mu\text{g mL}^{-1}$	Aplicação do extrato antes da inoculação				Aplicação do extrato após a inoculação		Médias
	72 h	48 h	24 h	1 h	24 h	48 h	
	Aquoso -100 ¹	1,61 bA [*]	2,21 aA	0,88 cAB	0,85 cC	1,44 bB	
Hidroetanólico - 100 ¹	1,90 aA	1,94 aAB	1,18 bA	1,32 bB	1,30 bBC	1,24 bB	1,48 BC
Metanólico - 1000 ²	1,73 aA	1,34 aC	0,60 bB	0,65 bC	1,58 aAB	1,74 aA	1,27 D
Hidrometanólico - 1000 ²	1,57 bA	1,72 abB	0,52 cB	2,02 aA	1,94 abA	1,60 bAB	1,56 B
Tiofanato Metílico - 1000 ²	0,75 bcB	0,62 cD	0,61 cB	0,62 cC	1,07 bC	1,77 aA	0,90 E
Testemunha	-	-	-	-	-	-	3,02 A
CV (%)	11,16						

¹ Valor da dose em %; ² Valor da dose em $\mu\text{g mL}^{-1}$; * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Ao avaliar os tratamentos observa-se que os melhores períodos de aplicação foram 1 e 24 h antes da inoculação do fungo, proporcionando os maiores efeitos na redução da antracnose, confirmando a ação protetora dos extratos e do tiofanato metílico. O tiofanato metílico inibiu mais de 80% do diâmetro das lesões, em relação à testemunha, quando aplicado 1 e 24 h antes da inoculação do fungo. O extrato metanólico proporcionou redução da antracnose igual ao fungicida, quando aplicado 1 e 24 h antes da inoculação do fungo, reduzindo 79 e 83%, respectivamente, o diâmetro das lesões. Nestes mesmos intervalos de aplicação o extrato aquoso também apresentou redução significativa da antracnose, com mais de 70% do diâmetro das lesões, igual ao tiofanato metílico e ao extrato metanólico.

A utilização dos extratos de *M. charantia* abre uma nova perspectiva de controle alternativo de fungos fitopatogênicos, especialmente a antracnose da banana, pois a presença de substâncias antifúngicas nos extratos desta planta foi confirmada no presente trabalho. Portanto, mais estudos necessitam ser realizados, como a determinação da(s) substância(s) antifúngica(s) presente(s), a demonstração da eficiência dos extratos no controle da doença em condições de campo, a adequação da produção de extrato e a formulação do extrato para uso em larga escala, as doses a serem utilizadas e a determinação da toxicologia dos extratos ao ambiente e ao homem.

REFERÊNCIA

- ANTHONY, S. et al. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, v.157, p.91-7, 2004.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.255-7, 2004.
- BATISTA, L.B. et al. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anhelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v.9, n.2, p.67-73, 1999.
- BATRAN, S.A.E.S. et al. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.2, p.236-42, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.42, p.225, 1939.
- CELOTO, M.I.B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa spp.*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 2005. p.99-117.
- EDGINGTON, L.V. et al. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, v.61, p.42-4, 1971.
- KHAN, S.H. et al. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. **Plant Pathology**, v.50, p.601-8, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 544p.
- NG, T.B. et al. Pro-teins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from cucurbitaceae plants. **General Pharmacology**, v.23, p.579-90, 1992.
- PERES, R. et al. *Achillea millefolium* - Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.3, p.81-93, 2009.
- SAS INSTITUTE. **User's guide: statistic**, version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.
- SILVA, M.B. et al. Tratamento térmico e prochloraz no controle da antracnose em pós-colheita de frutos de banana "Prata-Anã". **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.364-5, 2008.
- SPONHOLZ, C. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana "Prata" no controle da antracnose em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.480-5, 2004.
- THANGAVELU, R. et al. Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, n.4, p.664-8, 2004.
- VENTURA, J.A.; HINZ, R.H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. v.1. p.838-938.