

Controle de *Alternaria solani* em Tomateiro por Extratos de *Curcuma longa* e Curcumina - I. Avaliação *in vitro*

María I. Balbi-Peña¹, Andrea Becker¹, José Renato Stangarlin¹, Gilmar Franzener¹, Mário C. Lopes¹
& Kátia R. F. Schwan-Estrada²

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste de Paraná - Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon, Cx. Postal 1008, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, e-mail: jrstangarlin@unioeste.br;

²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, CEP 87020-900, Maringá, PR

(Aceito para publicação em 03/07/2006)

Autor para correspondência: José Renato Stangarlin

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 31:310-314. 2006.

RESUMO

A descoberta de compostos secundários de plantas medicinais com atividade antimicrobiana mostra-se promissora para o controle de fitopatógenos. A cúrcuma, *Curcuma longa*, apresenta em seus rizomas compostos com atividade antifúngica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fungitoxicidade *in vitro* dos extratos de cúrcuma e da curcumina contra *Alternaria solani*. Foram utilizados extratos brutos aquosos (EB) de rizomas de cúrcuma (esterilizados por autoclavagem) nas concentrações de 0, 1, 5, 10 e 20% e curcumina nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400 mg/L, os quais foram incorporados em meio de cultura batata-dextrose-ágar para avaliação de crescimento micelial e esporulação do fungo. Também foram testados extratos de cúrcuma a 10 e 15% esterilizados por filtração. O efeito dos extratos de cúrcuma autoclavados e não autoclavados e da curcumina na germinação de esporos *in vitro* foi também avaliado. Os extratos de cúrcuma a 10 e 15% não autoclavados inibiram em 38,2% e 23,2%, respectivamente, o crescimento micelial e 71,7% e 87%, respectivamente, a esporulação do fungo. Quando autoclavados, 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. O extrato não autoclavado na concentração de 5% inibiu em até 15% a germinação dos esporos. A curcumina inibiu o crescimento micelial em 29,5% na maior concentração testada, sem, contudo, afetar a esporulação e a germinação de esporos *in vitro*. Esses resultados indicam o potencial antifúngico da cúrcuma e curcumina contra *A. solani*.

Palavras-chave adicionais: planta medicinal, cúrcuma, extrato de planta, pinta preta do tomateiro, controle alternativo de doenças de plantas.

ABSTRACT

Control of *Alternaria solani* in tomato by *Curcuma longa* extracts and curcumin - I. *In vitro* evaluation

The discovery of plant secondary compounds with antimicrobial activity is very promising. Turmeric, *Curcuma longa*, has compounds in its rhizomes with fungicidal activity. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* fungitoxic activity of turmeric extracts and curcumin against *Alternaria solani*. Four different concentrations (0, 1, 5, 10 and 20%) of aqueous extracts of turmeric rhizomes (sterilized by autoclave) and four curcumin solutions (0, 50, 100, 200 and 400 mg/L) were incorporated into potato dextrose agar medium in order to evaluate fungal mycelial growth and sporulation. To evaluate the effect of using an autoclave, 10% and 15% turmeric extracts were sterilized by filtration. The effects of autoclaved and non-autoclaved turmeric extracts and curcumin on *in vitro* spore germination were tested. The concentrations of 10 and 15% of non-autoclaved turmeric extracts inhibited the mycelial growth by 38.2% and 23.2% respectively and the fungal sporulation by 71.7% and 87% respectively. When turmeric extracts were autoclaved, neither mycelial growth nor spore germination was inhibited and the effect on sporulation was reduced, suggesting the presence of thermolabile antimicrobial compounds. The non-autoclaved 5% extract inhibited spore germination by up to 15%. At the highest concentration, the curcumin solution inhibited mycelial growth by 29.5%. Neither *in vitro* sporulation nor spore germination was affected by curcumin. These results show the fungitoxic potential of turmeric and curcumin against *A. solani*.

Additional keywords: medicinal plant, turmeric, plant extract, tomato early blight, alternative plant disease control.

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) pertence à família *Zingiberaceae*, originária do sudeste asiático. O interesse econômico da cultura está baseado nos principais componentes qualitativos dos rizomas: corante curcumina e

óleos essenciais. Utilizada já desde a antiguidade na medicina e gastronomia do oriente, a cúrcuma vem se tornando importante, atualmente, no combate a vários problemas de saúde humana, podendo-se destacar alguns efeitos de seus

componentes como: antiinflamatório (Araújo & Leon, 2001; Balasubramanyam *et al.*, 2003), antioxidante (Scartezzini & Speroni, 2000; Balasubramanyam *et al.*, 2003) e atividades contra protozoários do gênero *Leishmania* (Araújo *et al.*, 1999), bactérias de produtos alimentares (Uechi *et al.*, 2000), fungos e leveduras dermatófitos como *Trichophyton* spp. e *Candida* spp. (Apisariyakul *et al.*, 1995) e contra o vírus da imunodeficiência humana (Mazumder *et al.*, 1995).

O uso de cúrcuma para o controle de fitopatógenos é relatado por Saju *et al.* (1998), que realizaram ensaio *in vitro* com a incorporação do óleo dessa planta em meio BDA nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5%. Os autores determinaram a atividade fungitóxica através da inibição do crescimento micelial, cujos valores foram de 100% para *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Sphaceloma cardamomi* Muthappa e *Pestalotia palmarum* Cooke para a concentração de 1% do óleo, e de 73% para *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, 53% para *Aspergillus* sp. e 39% para *Fusarium* sp. para a concentração de 5% do óleo.

Foi verificado que o extrato aquoso de cúrcuma apresenta fungitoxicidade *in vitro* através da inibição do crescimento micelial em *Fusarium udum* (Berk.) Wollenw. (Raja & Kurucheve, 1998) e reduz o crescimento micelial e a germinação *in vitro* de escleródios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Singh & Rai, 2000).

Singh *et al.* (2002), estudando o efeito de óleos voláteis do rizoma de *C. longa* sobre vários fungos, verificaram que o óleo na concentração de 1000 ppm causou completa inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme* J. Sheld. e, na concentração de 2000 ppm, em *Curvularia pallescens* Boedijn, *Aspergillus niger* Thiegh. e *Fusarium oxysporum* Schlecht. Neste trabalho os autores também avaliaram os óleos de outras espécies de cúrcuma, como *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe (rizomas) e *C. aromatica* Salisb (folhas), obtendo resultados semelhantes a 2000 e 3000 ppm, respectivamente.

Kuhn *et al.* (2006) estudaram o efeito do extrato aquoso de cúrcuma em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings. *In vitro*, o extrato de cúrcuma apresentou ação bactericida dependendo da procedência dos rizomas de *C. longa*: houve inibição completa do crescimento da bactéria na concentração de 10% para o material proveniente de Mercedes/PR, enquanto que para cúrcuma de Jaboticabal/SP houve controle total a 15% e de Mara Rosa/GO a 20%. A cúrcuma proveniente de Maringá PR não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas.

As ações citadas estão ligadas a uma série de compostos presentes no rizoma da cúrcuma, como os fenólicos curcuminóides, que estão quimicamente relacionados ao principal componente do rizoma, a curcumina. Os principais curcuminóides com atividade biológica são: curcumina, desmetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina (Balasubramanyam *et al.*, 2003), turmerona, metil-curcumina e curcuminato de sódio (Araújo & Leon, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade

fungitóxica *in vitro* dos extratos de cúrcuma e da curcumina contra *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, como parte de um trabalho que visa ao controle alternativo da pinta preta do tomateiro.

Foram utilizados isolados obtidos a partir de lesões de plantas de tomateiro infectadas naturalmente com *A. solani*, coletadas no município de Marechal Cândido Rondon PR. O fungo foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubado a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Os rizomas de cúrcuma foram coletados na região de Mercedes PR e armazenados a -20 °C. Foram triturados com o auxílio de liquidificador, em caldo de batata, na dosagem de 200 g de rizoma por litro. O homogeneizado foi filtrado em gaze e papel de filtro Whatman N° 1 para eliminação de restos de células, constituindo um extrato líquido a 20%. Este extrato foi diluído com caldo de batata para se obter extrato bruto (EB) a 1%, 5% e 10%. Em todas as concentrações foram adicionados dextrose e ágar para completar o meio de cultura BDA, as quais foram autoclavadas a 120 °C e 1 atm por 20 min. Foi utilizado um controle com o meio BDA puro.

A partir da curcumina, produto obtido de *C. longa* e disponível comercialmente, foi preparada uma solução estoque (10 mg/mL de etanol absoluto), seguida de incorporação de alíquotas em meio de cultura BDA já autoclavado e semi-fundente para obter concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400 mg/L. Foram preparados um controle com o meio BDA puro e outro com etanol para determinar o efeito deste nos tratamentos com curcumina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

Um disco de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *A. solani* (retirado de colônia com 14 dias em BDA) foi repicado para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram realizadas através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) quando as colônias fúngicas atingiram ¼ da superfície da placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada dosagem em relação à testemunha. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e análise de regressão a 5 % de probabilidade. A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC₅₀) foi estimada através da equação da regressão linear.

O teste de inibição da esporulação foi realizado ao término do teste de inibição de crescimento micelial, avaliando a esporulação do fungo em cada uma das placas usadas nesse teste. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos através da adição de 10 mL de água destilada na placa, raspagem da colônia com bastão de vidro e filtragem em gaze, sendo determinado o número de esporos/ml com auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico. Posteriormente determinou-se o número de esporos/cm² de colônia utilizando os resultados do teste de crescimento micelial. Os dados de inibição da esporulação, em

porcentagem, foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se uma análise de regressão a 5% de probabilidade.

Foi realizada esterilização por filtração dos EB de cúrcuma a 10 e 15% para verificar o efeito da autoclavagem nos extratos. Os rizomas de cúrcuma foram triturados em liquidificador, com caldo de batata, na dosagem de 150 g/L constituindo um extrato líquido a 15%. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 6.500 g durante 20 min para eliminação de restos de células. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,45 µm de diâmetro de poro) para reter as bactérias contaminantes. Ao extrato foram adicionados dextrose, ágar e caldo de batata autoclavados nas concentrações adequadas para se obter extratos a 10 e 15% de cúrcuma em meio de cultura BDA. Os testes de inibição do crescimento micelial e de inibição da esporulação foram realizados seguindo a metodologia acima relatada. Os dados de inibição, em porcentagem, foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

Para determinar a inibição da germinação de esporos, o ensaio foi instalado no delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Os tratamentos utilizados foram: extrato bruto autoclavado e não autoclavado nas concentrações de 0 (controle), 1, 5, 10 e 20%, curcumina nas concentrações de 0 (controle), 50, 100, 200 e 400 mg/L.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão de esporos (2×10^4 conídios/mL) e outra de 50 µL das concentrações de extrato de cúrcuma e curcumina, corrigidas para se manter as concentrações citadas anteriormente, foram colocadas juntas em lâmina de microscopia revestida por uma camada delgada de ágar-água a 1%. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida no escuro a 25 °C e a porcentagem de germinação determinada 12 h após. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do esporo. Foram contados 300 esporos por tratamento.

Com o objetivo de avaliar o período necessário para a máxima germinação de esporos de *A. solani*, foi estabelecida uma curva de germinação de esporos, relacionando a porcentagem de germinação com o tempo necessário para tal. Uma alíquota de 80 µL de suspensão de esporos (2×10^4 conídios/mL), foi colocada em cada um dos recipientes (pocinhos) de uma placa usada no teste de ELISA. A paralisação da germinação foi com 10 µl de azul algodão com lactofenol, no tempo 0 e a cada 2 h em cinco repetições (pocinhos), até 24 h, totalizando 13 tempos de avaliação. Ao final, realizou-se a observação dos esporos germinados e não germinados ao microscópio ótico.

Os dados de inibição da germinação de esporos em porcentagem foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se uma análise de regressão a 5% de probabilidade. Para análise, os dados foram previamente transformados em raiz quadrada de $(x+0,5)$.

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato autoclavado de cúrcuma sobre o crescimento micelial de *A. solani* não foi significativa, ao contrário do efeito sobre a esporulação do fungo (Figura 1 A). O máximo de inibição da esporulação (78,6%) foi alcançado com a concentração de 20% de EB de cúrcuma, embora já tenha ocorrido uma inibição média de 46% com as menores concentrações testadas. Com relação ao efeito dos extratos brutos na germinação de esporos *in vitro*, verificou-se que os não autoclavados causaram inibições de até 15% (Figura 1 B). Os extratos autoclavados não inibiram a germinação dos esporos (dados não mostrados), indicando a presença de algum composto termolábil.

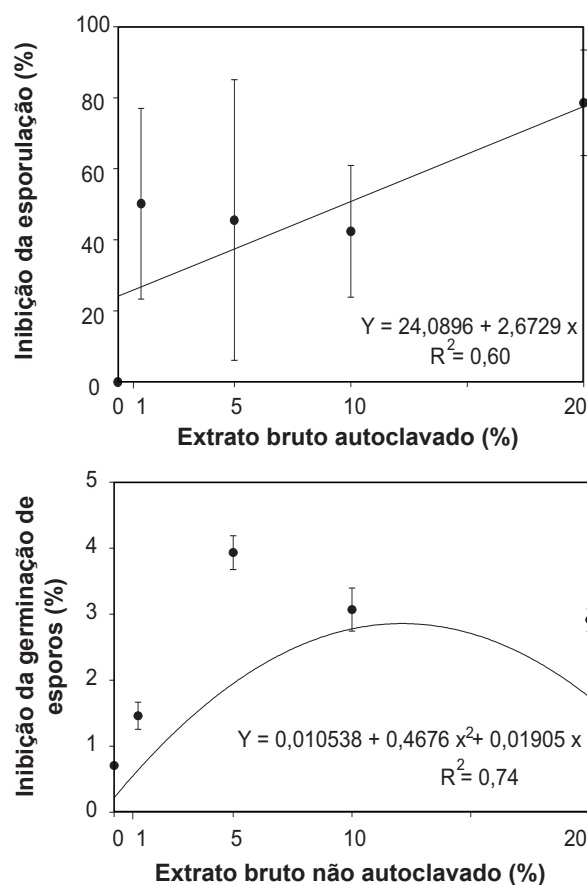


FIG. 1 – A. Efeito do extrato bruto de *C. longa* autoclavado e B. não autoclavado sobre a esporulação e a germinação de esporos de *A. solani*, respectivamente. Tratamentos controle: BDA e ágar-água 1% para os ensaios de esporulação e germinação de esporos, respectivamente. Em B, os dados foram transformados em raiz quadrada de $(x+0,5)$.

A termoestabilidade dos compostos presentes em plantas medicinais está na dependência direta da espécie. Bonaldo *et al.* (2004) observaram que a germinação de conídios de *Colletotrichum lagenaria* (Pass.) Ellis & Halst. foi inibida em mais de 90% na presença de extratos autoclavados de *Eucalyptus citriodora* Hooker, enquanto

que para o extrato não autoclavado a inibição máxima foi de 75%. Franzener *et al.* (2003) verificaram que o efeito antifúngico direto do extrato aquoso de *Artemisia camphorata* Vill. (cânfora) sobre a germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker foi grandemente afetado quando o mesmo foi autoclavado, pois não inibiu a germinação, enquanto que para os extratos não autoclavados a inibição foi de até 20%.

Diante disso, com o objetivo de verificar um possível efeito deletério da autoclavagem nos extratos aquosos de cúrcuma, foram realizados testes de inibição de crescimento micelial e de esporulação utilizando extratos esterilizados por filtração. Para este fim, foram usadas as concentrações de 10% e 15% de extrato de cúrcuma. Houve inibição do crescimento micelial pelos EB não autoclavados, alcançando o nível de 38,2% com EB 10%. No caso da esporulação, a concentração de EB 10% inibiu 71,7%, o que significou 29,3% a mais do que a inibição obtida com o EB autoclavado. Já na concentração de EB 15%, a inibição do crescimento micelial foi de 23,2% e a inibição da esporulação foi de 87%, valor este 8,5% mais alto do que aquele obtido com EB 20% autoclavado. Segundo estes resultados, a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de cúrcuma para *A. solani* estaria baseada fundamentalmente na inibição da esporulação, e em menor grau no crescimento micelial e na inibição da germinação de esporos.

Esses valores de inibição do crescimento micelial foram baixos quando comparados com trabalhos usando o óleo autoclavado de cúrcuma a 5%, cujas inibições foram de até 100% para *C. gloeosporioides*, *S. cardamoni* e *P. palmarum*, embora para *Fusarium* sp. tenha sido de apenas 39% (Saju *et al.*, 1998).

O efeito das concentrações de curcumina sobre o crescimento micelial de *A. solani* *in vitro* pode ser observado na Figura 2. São apresentados também os dados de inibição do crescimento micelial descontando o efeito do etanol utilizado como solvente da curcumina. Houve inibição do crescimento micelial para doses crescentes de curcumina. Quando descontado o efeito do álcool, o máximo de inibição de crescimento micelial foi de 29,5% na maior concentração de curcumina testada (400 mg/L) (Figura 2 B). Provavelmente, poder-se-ia obter maior atividade antimicrobiana se fossem usadas maiores concentrações de curcumina, como no trabalho de Singh *et al.* (2002), no qual o óleo de cúrcuma a 1000 mg/L causou completa inibição do crescimento micelial de *C. falcatum* e *F. moniliforme* e a 2000 mg/L em *C. pallescens*, *A. niger* e *F. oxysporum*. No entanto, no presente trabalho optou-se por usar concentrações de no máximo 400 mg/L para viabilizar futuras aplicações a campo de curcumina para controle da pinta preta do tomateiro. No presente trabalho a curcumina apresentou valores de EC_{50} estimados em 669,42 mg/L sobre o crescimento micelial de *A. solani*.

Em relação à ação da curcumina sobre a esporulação *in vitro*, o único efeito verificado foi devido ao etanol utilizado como solvente. Também não houve efeito da

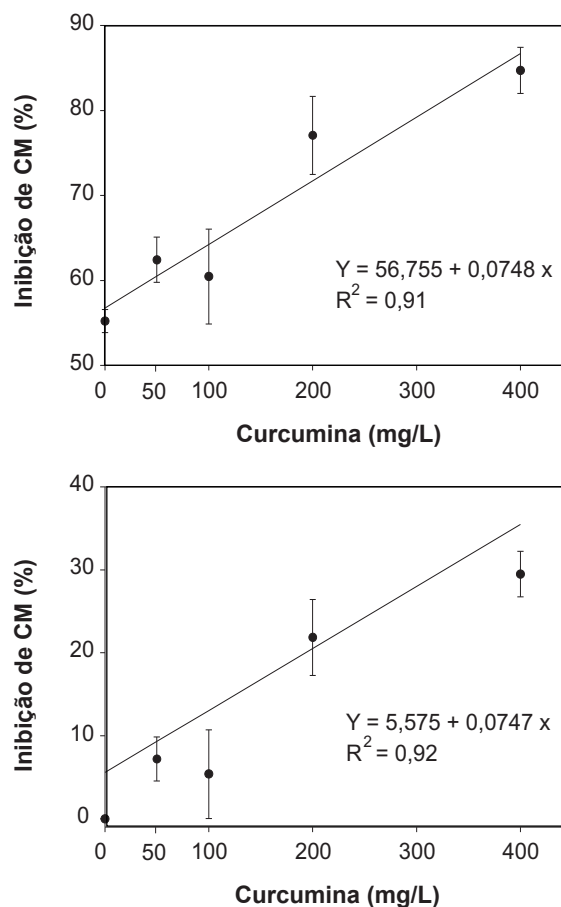


FIG. 2 – A. Efeito de curcumina sobre o crescimento micelial (CM) *in vitro* de *A. solani*. B. Estão representados os valores de inibição de crescimento micelial descontado o efeito do etanol utilizado para diluição da curcumina.

curcumina na germinação de esporos *in vitro*. Deste modo, se fosse considerado um ensaio *in vivo*, a curcumina não estaria interferindo na etapa de infecção (penetração do fungo na planta), mas por outros mecanismos em etapas posteriores do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, como na colonização.

Esses resultados indicam o potencial antifúngico da cúrcuma e curcumina contra *A. solani*, justificando assim, a realização de ensaios em campo para verificar o efeito desses compostos no controle da doença pinta preta.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à concessão de bolsa pela CAPES; JRS e KRFS à concessão de bolsa pelo CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APISARIYAKUL, A., VANITTANAKOM, N. & BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Journal of Ethnopharmacology 49:163-169. 1995.

- ARAÚJO, C.A.C., ALEGRIO, L.V., CASTRO, D., LIMA, M.E.F., GOMES-CARDOSO, L. & LEON, L.L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94:791-794. 1999.
- ARAÚJO, C.A.C. & LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96:723-728. 2001.
- BALASUBRAMANYAM, M., KOTESWARI, A.A., KUMAR, R.S., MONICKARAJ, S.F., MAHESWARI, J.U. & MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: Novel therapeutic implications. *Journal of Biosciences* 28:715-721. 2003.
- BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenaria* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira* 29:128-134. 2004.
- FRANZENER, G., STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. & CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. *Acta Scientiarum* 25:503-507. 2003.
- KUHN, O.J., PORTZ, R.L., STANGARLIN, J.R., DEL ÁGUILA, R.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. & FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Semina Ciências Agrárias* 27:13-20. 2006.
- MAZUMDER, A., RAGHAVAN, K., WEINSTEIN, J., KOHN, K.W. & POMMIER, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochemical Pharmacology* 49:1165-1170. 1995.
- RAJA, J. & KURUCHEVE, V. Influence of plants extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. *Indian Phytopathology* 51:102-103. 1998.
- SAJU, K.A., VENUGOPAL, M.N. & MATHEW, M.J. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Current Science* 75:660-662. 1998.
- SCARTEZZINI, P. & SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology* 71:23-43. 2000.
- SINGH, G., SINGH, O.P. & MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 45: 75-81. 2002.
- SINGH, R. & RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. *Microbios* 102:165-173. 2000.
- UECHI, S., MIYAGI, Y., ISHIMINE, Y. & HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 44:138-140. 2000.