

Efeito inibitório *in vitro* de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh

SANTOS, M.B.; SANTOS, C.Y.; ALMEIDA, M.A.; SANTOS, C.R.S.; SANT'ANNA, H.L.S.; SANTOS, O.S.N.; SILVA, F.*; MARTINS, G.N.

*Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFR, Campus Universitário, s/n, CEP: 44380-000, Cruz das Almas-Brasil * franceli@ufrb.edu.br*

RESUMO: O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.) é a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo. No Brasil, o cultivo ocupa extensa área de solos pobres na região semi-árida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, em regiões com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas. Tendo em vista a propriedade inibitória dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos, avaliou-se o efeito inibitório do extrato vegetal de alho (*Allium sativum* L.) sobre o fungo *Aspergillus niger* isolados da cultura do sisal. O extrato vegetal foi incorporado ao meio BDA fundente, aproximadamente 45°C, nas concentrações 0, 500, 1000, 2000, 50000, 10000 e 50000 mg L⁻¹. Os resultados demonstraram que a dose de 50000 mg L⁻¹ de alho foi eficiente na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger* “extraídos” da cultura do sisal.

Palavras-chave: plantas medicinais, patógenos, extratos vegetais, fungos, alho

ABSTRACT: *In vitro* inhibitory effect of *Allium sativum* extract on *Aspergillus niger* Tiegh.

Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.) is the main source of plant hard fiber extraction in the world. In Brazil, its cultivation occupies a large area of poor soils in the semi-arid region of Bahia, Paraíba and Rio Grande do Norte States, and in regions with scarce or no alternative to explore other crops. Based on the inhibitory property of plant extracts on fungal development, the inhibitory effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract was evaluated on the fungus *Aspergillus niger* isolated from sisal crop. The plant extract was incorporated into melting PDA medium around 45°C, at the following concentrations: 0, 500, 1000, 2000, 50000, 10000, and 50000 mg L⁻¹. (OBS: M. Elena, há duas doses repetidas; creio que a primeira seja 5000). The concentration 50000 mg L⁻¹ garlic extract was effective in inhibiting the growth of the fungus *Aspergillus niger* extracted from sisal crop.

Key words: medicinal plants, pathogens, plant extracts, fungi, garlic

INTRODUÇÃO

A cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.) ocupa extensa área de solos pobres na região semi-árida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, gerando atividade econômica por meio da cadeia produtiva, para mais de meio milhão de pessoas, em regiões com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas (Coutinho et al., 2006).

Silva & Coutinho (2006) destacaram os aspectos da importância do sisal para a economia do setor agrícola nordestino, merecendo destaque a

geração de renda e emprego para contingente de aproximadamente 800 mil pessoas. Na Bahia, maior produtor desta cultura, com mais de 95% da produção da fibra nacional, o cultivo do sisal se estende por 75 municípios atingindo área de 190 mil ha, englobando propriedades de pequeno porte, ou seja, menores que 15 ha, nas quais predominam a mão-de-obra familiar, perfazendo população de aproximadamente 700 mil pessoas que vivem, direta ou indiretamente, em estreita relação com esta fibrosa.

Apesar da relevância tem-se constatado, nos

últimos anos, declínio contínuo desta cultura, expresso em reduções da área cultivada, produção e produtividade. Vários fatores têm contribuído para esta decadência, dentre os quais o baixo índice de aproveitamento da planta de sisal (somente 4% das folhas colhidas se convertem em produto vendável, após o desfibramento), a concorrência com as fibras sintéticas, o elevado custo inicial para a implantação de campos de produção, o número restrito de genótipos adaptados às regiões produtoras, o não aproveitamento dos resíduos do desfibramento, o manejo deficitário da fertilidade dos solos, a falta de máquinas modernas para o beneficiamento e, nos últimos anos, a podridão do tronco, doença que tem ameaçado ainda mais a sustentabilidade desta cultura (Coutinho et al., 2006).

Alves et al. (2004) retratam que a podridão do tronco é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal no Brasil, visto que tem afetado, de forma isolada desde a década de 1970, os sisalais nas principais áreas produtoras dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, atingindo níveis críticos a partir do ano de 1998. A incidência em regiões de cultivo varia de 5% a 40% das plantas.

A podridão do tronco, causada por *Aspergillus niger* var. *niger* Tiegh, torna as folhas das plantas impróprias ao desfibramento, causando a morte com a progressão da enfermidade. É caracterizada pelo escurecimento dos tecidos internos do tronco; as áreas colonizadas pelos agentes etiológicos da doença variam da coloração cinza escuro ao rosa pálido e se estendem da base das folhas à base do tronco da planta. Em plantas com estádios avançados da doença ocorre murcha, as folhas se tornam amareladas e o tronco se torna completamente apodrecido. Segundo Bock (1976), citado por Coutinho et al. (2006), embora a doença seja fatal para a cultura, plantas de sisal infectadas podem sobreviver durante mais de um ano em virtude da lenta colonização da planta pelos agentes causais da doença.

Lock (1962) atribui como principal via de penetração dos agentes etiológicos da podridão do tronco em plantas de sisal, o ferimento causado na base da folha por ocasião do corte destas para o desfibramento; ressalta-se, entretanto, que esses fungos podem também penetrar na planta através de injúrias causadas abaixo do nível do solo por instrumentos utilizados para a realização de tratos culturais, casos em que a infecção ocorre, inicialmente, na base ou na parte lateral do tronco (Bock, 1965); portanto, ferimentos causados por capinas, desbaste de touceiras e retirada de rebentos da planta-mãe para implantação de novos campos ou renovação de áreas, podem ser importantes vias de penetração dos agentes de podridões em plantas de sisal.

A espécie *A. niger* é considerada a mais importante espécie entre as relatadas, tanto pela frequência de ocorrência quanto pela severidade da doença causada (Lock, 1962). Este fungo difere dos demais por causar dois tipos distintos de podridão, a seca e a úmida, esta última determinada pela associação do fungo com espécies de bactérias do gênero *Erwinia*, que degradam a lamela média do tecido colonizado fazendo com que este perca a rigidez e desprenda odores desagradáveis (Bock, 1965).

Mesmo diante destas dificuldades, é preciso entender que o sisal continua sendo uma das poucas opções econômicas para a região semi-árida do Nordeste do Brasil e dificilmente outra cultura poderá ser mais rentável economicamente e mais vantajosa para a área em questão. Por isso, é imprescindível garantir a continuidade, realizar estudos e trabalhos capazes de estimular a expansão e promover o progresso tecnológico (Silva & Coutinho, 2006).

Considerando que, a maioria das perdas econômicas em culturas acontece com o ataque de fungos, bactérias e vírus, métodos que visam mitigar tais perdas na produção e produtividade são de extrema importância na atualidade. Dentre os métodos usuais temos os químicos, físicos, biológicos, culturais, genéticos e legislativos, sendo que os mais usados são os químicos, mas por possuírem poder residual alto no ambiente a utilização é restrita. Em substituição, os métodos de controle físico e biológico são recomendados como alternativas eficazes e menos agressivas para o solo, os rios e a biodiversidade.

O emprego de extratos vegetais é bastante conhecido na agricultura orgânica, como é o caso do extrato de cavalinha (*Equisetum pyramidale* Goldm.), urtiga (*Urtiga dioica* L.) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss), entre outros (Abreu Júnior, 1998; Deffune, 2001; Hammerschmidt, 1999).

Extratos originários de hortelã (*Mentha piperita* L.) e pimenta (*Capsicum* spp.) também têm evidenciado propriedades antifúngicas, demonstrando potencial de controle para patógenos de plantas (Wilson et al., 1997; Bastos, 1992).

Dentre os extratos mais pesquisados encontra-se aquele obtido de alho (*Allium sativum* L., Alliaceae). O efeito inibitório mostrou-se eficaz para extensa gama de fungos, envolvendo não só patógenos de pós-colheita, mas também patógenos foliares e de solo (Tansey & Appleton, 1975; Chalfoun & Carvalho, 1987; Bolkhan & Ribeiro, 1981; Bastos, 1992; Barros et al., 1995).

Segundo Lorenzi & Matos (2002), o alho é originário provavelmente da Europa, e é largamente cultivado em todo o mundo para o uso condimentar, desde a mais remota antiguidade. Cada 100 gramas do produto *in natura* apresentaram em média 4 g de

proteína, 10 g de cálcio, 1,7 mg de ferro, 40 mg de fósforo, 0,7 mg niacina, 9 mg de vitamina C, 0,2 mg de tiamina e 0,11 g de riboflavina.

O óleo essencial obtido do bulbo (0,1 a 0,2%), contém cerca de 53 constituintes voláteis instáveis, quase todos derivados orgânicos do enxofre, principalmente ajoeno, alicina e aliina (Bruneton, 1995).

De acordo com Cavallito et al. (1944) citado por Ejaz et al. (2003), a alicina é a principal substância ativa do extrato de alho fresco, que é responsável pelo típico cheiro acre do alho. Numerosas pesquisas farmacológicas têm mostrado a existência no alho de propriedades antitrombótica, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, hipotensora, hepatoprotetora, cardioprotetora, hipoglicemiante, antitumoral, particularmente em casos de câncer de cólon (Bruneton, 1995; Block et al., 1984; Sheela et al., 1995).

O alho vem sendo usado na medicina tradicional desde a antiguidade, para evitar males do aparelho digestivo, verminoses e parasitoses intestinais, edema, gripe, trombose, arteriosclerose, até infecções na pele e das mucosas (Costa, 1987; Bruneton, 1995; Matos, 2000; Block et al., 1984).

Atualmente uma das opções para o controle dos fungos é o uso de extratos, obtidos de uma gama de espécies botânicas, que promovem a inibição dos fitopatógenos de natureza fúngica (Wilson et al., 1997; Kurita et al., 1981).

A. niger é espécie encontrada, frequentemente, em alimentos como frutos frescos, vegetais, grãos, cereais e outros. Espécies de *Aspergillus* causam prejuízos a inúmeras culturas na região nordeste, entre elas amendoim, mamão, sisal, abóbora, cebola, cenoura, tomate, entre outros, demonstrando assim, a importância de inibidor de crescimento para este fungo (Alves et al., 2004).

Em vista da propriedade inibitória de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos e a importância do fungo *A. niger* na cultura do sisal, o presente trabalho tem por objetivo avaliar *in vitro* o efeito do extrato de alho sobre o crescimento micelial de *A. niger* como possível alternativa para o controle do mesmo.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no laboratório NEMA (Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas - BA.

Isolamento do patógeno

Amostras de *Aspergillus niger* foram retiradas de folhas de sisal que apresentavam os sintomas típicos da podridão do tronco do sisal da região de

Campo Formoso - BA.

Para investigar tal suspeita, ensaios foram realizados nas dependências do Laboratório NEMA, na Universidade Federal do Recôncavo (UFRB) em Cruz das Almas, BA. Fragmentos dos tecidos internos do tronco de plantas com sintomas da doença, foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1%, enxaguados duas vezes em água destilada esterilizada e distribuídos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata - Dextrose - Ágar). Em seguida, foram incubados em câmara BOD, durante cinco dias, na temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O fungo desenvolvido foi identificado como *Aspergillus niger*.

Após identificação, os isolados foram repicados e colocados em meio seletivo BDA salino, e ao alcançarem 20 dias foram repicados através de disco de micélio com 0,5 mm de diâmetro para o meio contendo BDA, permanecendo a temperatura ambiente.

Preparação de extratos vegetais

Na obtenção dos extratos foi utilizado 5 g de material vegetal (alho). O extrato vegetal do alho foi obtido pela trituração dos bulbilhos, não sendo necessária a sua assepsia devido aos catáfilos que os recobrem. Logo após foi triturado no liquidificador acrescido de 50 mL de água destilada e autoclavada. O material foi filtrado em papel filtro Whatman nº1 e posteriormente em membrana filtrante de 0,45 mm de porosidade. Os extratos aquosos foram utilizados imediatamente após a preparação.

Os diferentes extratos foram adicionados ao meio de BDA fundente (aproximadamente 45°C), de modo a se obter concentrações de 0, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 e 50000 mg L⁻¹, onde cada concentração representou um tratamento. Placas com meio BDA contendo discos de *A. niger* foram utilizadas como testemunhas.

Na repicagem foram utilizados discos com tamanho de 0,8 mm do *A. niger*, transferidos para o centro de cada uma das placas componentes de cada tratamento, sendo observados por 10 dias. Cada tratamento contou com 4 repetições.

Instalação do ensaio

Nos tratamentos foram utilizadas as alíquotas de concentrações de 0 (testemunha), 500, 1000, 2000, 5000, 10000 e 50000 mg L⁻¹, adicionadas ao meio BDA fundente a aproximadamente 45°C.

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 4 repetições, sendo um dos tratamentos a testemunha.

Avaliação

A avaliação aconteceu considerando-se a média do diâmetro horizontal e vertical do micélio.

Essas placas foram avaliadas a partir da repicagem do fungo até o 10^o dia. A mensuração do diâmetro ocorreu com auxílio de paquímetro de precisão de marca Vonder.

RESULTADO E DISCUSSÃO

No trabalho desenvolvido no Laboratório do NEMA para o controle de *A. niger* utilizando extrato de alho, foi possível observar que as diferentes concentrações testadas agiram inibindo o crescimento micelial do referido fungo. De acordo com a Figura 1, constatou-se que o extrato de alho inibiu o crescimento, o mesmo tendo sido observado por Ribeiro & Bedendo (1999), onde ocorreu inibição de 67% no crescimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides*.

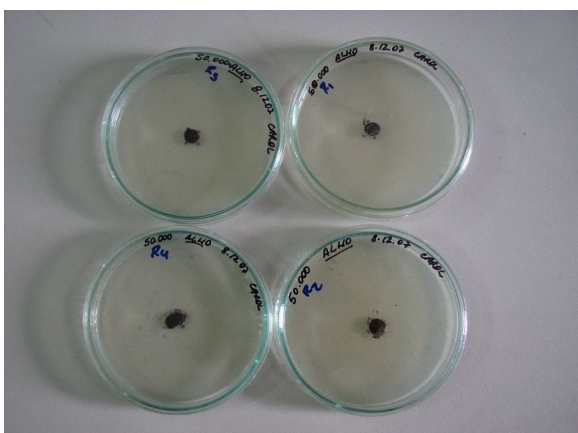


FIGURA 1. Placas contendo o meio BDA com a concentração de 50000 mg L⁻¹ de extrato de alho (ausência do crescimento do *A. niger*).

As doses crescentes de alho utilizadas no experimento (500 a 10000 mg L⁻¹) demonstraram uma redução parcial no desenvolvimento do fungo no meio BDA (Figura 2), pois após o 10^o dia, essas concentrações permitiram apenas crescimento lento

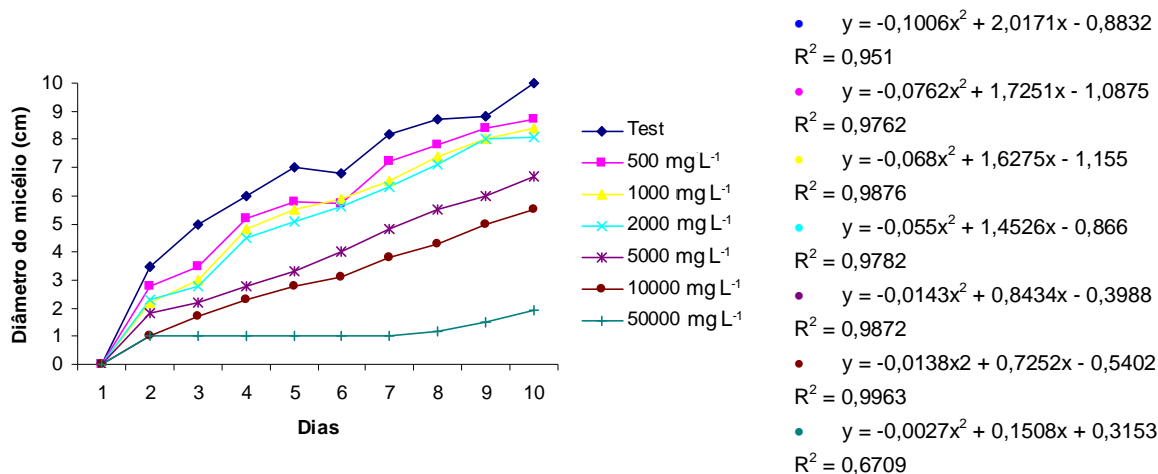


FIGURA 2. Efeito de diferentes doses de extrato de alho sobre o crescimento de *Aspergillus niger*.

do *A. niger*, em contrapartida a concentração de 50000 mg L⁻¹ mostrou-se eficiente, pois inibiu o desenvolvimento do fungo, destacando-se como a mais eficiente das concentrações testadas.

O efeito tóxico do alho sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos também tem sido demonstrado em outros trabalhos. Resultados obtidos por Chalfoun & Carvalho (1987) revelaram que o extrato de bulbilhos foi altamente eficiente na inibição do crescimento micelial de *Gibberella zeae* (Schw) Petch (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe), *Alternaria zinniae* M.B. Elli e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich.

Bolkhan & Ribeiro (1981) constataram que o uso de extrato de bulbilhos na concentração 5000 ppm promoveu inibição de 37, 66 e 76% no desenvolvimento de micélio de *Cylindrocladium clavatum* Hodges & May, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenew. & Reink e *Rhizoctonia solani* Kuhn [(teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk)], respectivamente.

Bastos (1992) relata alta inibição sobre o desenvolvimento de micélio de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agora denominado *Moniliophthora pernicioso* (Aime & Phillips-Mora, 2005) e *Phytophthora palmivora* Butler, tendo sido observada relação direta entre a concentração de extrato no meio e taxa de inibição de crescimento da colônia. Também fungos dos gêneros *Curvularia* Boedjin e *Alternaria* Nees apresentaram menor desenvolvimento de colônia, com valores variáveis de 30 a 75%, quando cultivados em meios contendo extrato de alho nas concentrações de 1000 a 10000 ppm, respectivamente (Barros et al., 1995).

O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 7 tratamentos e 4 repetições para cada tratamento. Utilizou-se a regressão quadrática, pois os r indicam maior resposta para os tratamentos utilizados destacando-se a dose 50000 mg L⁻¹ como a mais eficiente.

O teste F foi significativo para as médias do crescimento micelial, indicando que 99% dos tratamentos explicam o comportamento dos tratamentos estudados. A concentração de 50000 mg L⁻¹ apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% nas médias das concentrações utilizadas, inibindo o crescimento do micélio com redução de até 90%, em relação à testemunha.

CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou que a dose de 50000 mg L⁻¹ de extrato de alho foi eficiente na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger* em meio BDA, sendo necessária à instalação do experimento em casa de vegetação.

Mais estudos serão necessários para observar se essa dosagem atuará no controle da espécie de *A. niger* em nível de campo, bem como o comportamento e interação com a microbiota do solo. Dessa forma, esse método de controle tornar-se-á uma alternativa economicamente viável para os pequenos produtores de sisal.

REFERÊNCIA

ABREU JUNIOR, H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura**: coletânea de receitas. Campinas: EMOPI, 1998. 115p.

AIME, M.C.; PHILLIPS-MOURA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n.5, p.1012-22, 2006.

ALVES, M.O.; SANTIAGO, E.S.; LIMA, A.R.M. **Diagnóstico socioeconômico da região nordestina produtora de sisal (versão preliminar)**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2004. 75p.

BARROS, S.T. et al. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.168-70, 1995.

BASTOS, C.N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis perniciosa* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.454-7, 1992.

BLOCK, E. et al. (E-Z) - Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. **Journal of the American Chemical Society**, v.106, p.8295-6, 1984.

BOCK, K.R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-7, 1965.

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.565-6, 1981.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Paris: Lavoisier Publishing, 1995. 915p.

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234-5, 1987.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987. v.3.

COUTINHO, W.M. et al. **A podridão do tronco do sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 12p. (Comunicado Técnico, 281).

DEFFUNE, G. Fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal: a explicação dos defensivos naturais. **Agroecologia Hoje**, v.6, p.6-7, 2001.

EJAZ, S. et al. Extract of garlic (*Allium sativum*) in cancer chemoprevention. **Experimental Oncology**, v.25, p.93-7, 2003.

HAMERSCHMIDT, I. **Manejo de pragas e doenças em sistemas orgânicos**. Curitiba: EMATER, 1999. 17p.

KURITA, N. et al. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, p.945-52, 1981.

LOCK, G.W. **Sisal**. London: Longmans, 1962. 355p.

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

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2.ed. Fortaleza: UFC, 2000. 344p.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de podridão de frutos em mamão. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-71, 1999.

SHEELA, C.G. et al. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. **Planta Medica**, v.61, n.4, p.356-7, 1995.

SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. **Cultivo do sisal**. Brasília: Embrapa algodão, Sistemas de Produção, n.5, dez 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/index.html>>. Acesso: 27 mar. 2008.

TANSEY, M.R.; APPLETON, J.A. Inhibition of fungal growth by garlic extract. **Mycologia**, v.67, p.409-13, 1975.

WILSON, C.L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, p.204-10, 1997.