

FITOQUÍMICA E BUSCA DE PRINCÍPIOS ATIVOS PARA O CONTROLE DE *Moniliophthora perniciosa* (VASSOURA-DE-BRUXA)

Gabriela Batista de FARIAS¹; Ariane da Costa MÁXIMO¹; Maria da Paz LIMA²; Solange de Melo VERAS³; Maria Geralda de SOUZA⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora INPA/COTI; ³Co-Orientadora FCA/UFAM; ⁴Colaboradora EMBRAPA

1.Introdução

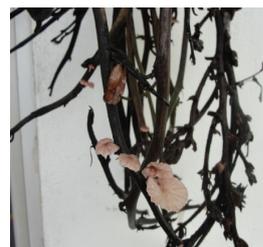
A vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K.Schum] é provocada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, 2005), um basidiomiceto da família Tricholomataceae cujo ciclo é ilustrado na figura 1. Considerada a principal doença dessa cultura, a vassoura-de-bruxa é endêmica no Amazonas e precisa ser controlada, pois o cupuaçu como é conhecido o fruto na Amazônia, é de grande importância econômica para a região. O controle de *M. perniciosa* bem como de outros fungos fitopatogênicos por meio de agrotóxicos pode propiciar o surgimento de patógenos resistentes, desequilíbrio ambiental, além de causar intoxicação humana e animal (Ghini e Kimati 2000). Desse modo, o emprego dos fungicidas naturais tem surgido como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle (Wilson e Wisniewski 1994). A literatura registra o potencial de diferentes tipos de substâncias para o controle de fitopatógenos como exemplificado pelos alcalóides de *Ruta graveolens* (Rutaceae) que apresentam inibição no crescimento dos fungos causadores de antracnose *Colletotrichum fragariae*, *C. acunata* e *C. gloeosporioides* (Oliva *et al.* 2003). Considerando que a Amazônia é uma grande fonte de recursos naturais para obtenção de princípios ativos, no presente trabalho selecionaram-se as espécies de Sapotaceae, *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev e *Chrysophyllum prieurii* A. DC. para estudos químicos e busca de atividade antifúngica dos seus extratos, bem como em substâncias isoladas de outras espécies previamente obtidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), frente a *Moniliophthora perniciosa*.



Fruto



Vassoura verde



Vassoura seca

Multiplicação e
disseminação do

Esporos do fungo

**Figura 1.** Ciclo do fungo *Moniliophthora perniciosa*

2. Material e Métodos

Preparação e fracionamentos extratos vegetais dos resíduos madeiros de *M. huberi* e *C. prieurii*

Resíduos madeiros de *M. huberi* (86,73 g) e *C. prieurii* (102,63 g) oriundos da confecção de pequenos objetos de madeira foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira. A identificação das espécies foi feita por comparação macroscópica com amostras disponíveis na Xiloteca da Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTI). Para a obtenção dos extratos, os resíduos foram submetidos a maceração à frio em hexano, seguido de metanol por um período de sete dias em cada um dos solventes em frasco Mariotte, concentrados com auxílio de evaporador rotativo. Nos extratos obtidos em hexano foram identificados com base em cromatografia em camada delgada (CCD), o lupeol em *M. huberi*, lupeol e β -sitosterol em *C. prieurii*.

Obtenção de *Moniliophthora perniciosa*

O isolamento do fungo foi feito através de basidiocarpos coletados de vassouras secas no campo experimental da EMBRAPA (AM-010, KM-29). Para a manutenção da cultura fúngica, fragmentos de micélios jovens foram preservados em tubos contendo solução de glicerol à 70% e batata-dextrose em meio líquido (1:1). Essa cultura em solução foi mantida em freezer à -80°C.

Ensaio antifúngicos frente à *Moniliophthora perniciosa*

No ensaio pelo método de difusão em Ágar foram utilizadas diferentes alíquotas de cada amostra (solubilizadas em DMSO) incorporadas individualmente em 20 mL de meio BDA fundente, a fim de se obter diferentes concentrações finais (200- 25 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente cada amostra foi vertida em placa de Petri e, após sua solidificação, discos miceliais de 8 mm de diâmetro retirados de bordas de colônias do fungo foram colocados no centro de cada placa. A incubação foi realizada em câmara de crescimento B.O.D. à temperatura de 25°C e ausência de luz. O experimento foi feito em triplicata e um controle (o qual não recebeu os produtos). A avaliação foi realizada pela observação da formação e medição do halo de inibição do crescimento fúngico nas placas de Petri quando a colônia fúngica das placas testemunhas de cada tratamento cobriram toda a superfície do meio. As medidas foram feitas no sentido ortogonal do diâmetro das colônias, onde cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica e por comparação com o crescimento da colônia nas placas testemunhas. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) (substância/concentração) foi calculada conforme expressa pela fórmula (Edginton *et al.* 1971):

P.I.C. = $\frac{\text{crescimento testemunha} - \text{crescimento tratamento}}{\text{crescimento testemunha}} \times 100$

3. Resultados e Discussão

De acordo com levantamento na base nomenclatural do Missouri Botanical Garden (MOBOT), as espécies *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev e *Chrysophyllum prieurii* A. DC apresentam as sinônimas botânicas apresentadas na lista 1.

Lista 1. Sinônimas botânicas de *M. huberi* e *C. prieurii*

<i>Manilkara huberi</i> (Ducke) A. Chev	<i>Manilkara jaimiqui</i> (C. Wright ex Griseb.) Dubard
	<i>Mimusops huberi</i> Ducke
	<i>Mimusops jaimiqui</i> C. Wright ex Griseb.
<i>Chrysophyllum prieurii</i> A. DC	<i>Chrysophyllum prieurii</i> A. DC.
	<i>Chrysophyllum cyanogenum</i> Ducke
	<i>Ecclinusa cyanogena</i> (Ducke) Aubrév.
	<i>Ecclinusa prieurii</i> (A. DC.) Aubrév.
	<i>Priurella prieurii</i> (A. DC.) Aubrév

Conforme mostra a tabela 1, o rendimento extrato metanólico de *C. prieurii* foi superior ao de *M. huberi*. Nos extratos obtidos em hexano ficou evidenciada a predominância de lupeol em *M. huberi* e de lupeol e β -sitosterol (figura 2) em *C. prieurii*. A literatura registra a ampla ocorrência deste triterpeno e esteróide no reino vegetal, no entanto esses são os primeiros registros nestas duas espécies de Sapotaceae.

Tabela 1. Teor extrativo e massas obtidas dos extratos de *M. huberi* e *C. prieurii*

Espécies	Extrato hexânico		Extrato metanólico	
	Massa obtida (g)	Rendimento (%)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
<i>M. huberi</i>	0,26	0,30	0,75	0,85
<i>C. prieurii</i>	0,18	0,17	1,33	1,29

Figura 2. Estrutura química do lupeol e β -sitosterol

A tabela 2 mostra os resultados do potencial antifúngico em substâncias disponíveis no LQPN (figura 3). O alcalóide conhecido como casimiroína forneceu resultados promissores mesmo em concentrações menores (50 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Interessante observar que o aumento na concentração da lignana (LG-1) resultou em menor inibição.

Tabela 2. Análise antifúngica *in vitro* das substâncias sobre *M. pernicioso*

Amostras	Fonte de origem das substâncias	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição Cresc. Micelial (%)
AL-2 casimiroína	<i>Spathelia excelsa</i> (Krause) R.S. Cowan & Brizicky (Rutaceae)	25	80,5
		50	83,3
		100*	100
AM-1 N-[2-(4-preniloxifenil) etil] tigliamida	<i>Hortia longifolia</i> Benth. ex Engl. (Rutaceae)	100*	51,6
		200	100
CM-2 xantiletina	<i>Brosimum rubescens</i> Taub. (Moraceae)	100*	88,3

		150	100
LG-1 cubebina	<i>Tetragastris panamensis</i> (Engl.) Kuntze (Burseraceae)	150	53,3
		100*	73,8

*Concentrações testadas no PIBIC 2010-2011

AL-2

AM-1

CM-2

LG-1

Figura 3. Substâncias submetidas a ensaio antifúngico frente à *M. perniciosa*

4. Conclusão

O ensaio antifúngico realizado em *M. perniciosa* permitiu a avaliação do potencial de substâncias de diferentes esqueletos mostrando resultados promissores para o alcalóide do tipo 2-quinolona conhecido na literatura como casimiroina, a amida *N*-[2-(4-preniloxifenil)etil]tigliamida e a cumarina xantiletina. Os estudos realizados com *M. huberi* e *C. prieurii* contribuíram para o conhecimento químico destas espécies, tendo em vista que estes são os primeiros relatos sobre seus metabólitos secundários.

5. Referências Bibliográficas

- Aime, M. C.; Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 1012 -1022.
- Edginton, L.V.; Knew, K.L.; Barron, G.L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 62:42-44.
- Ghini, R.; Kimati, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, São Paulo: Embrapa Meio Ambiente.
- Oliva, A.; Meepagala, K.M.; Wedge, D.E.; Harries, D.; Hale, A.L.; Aliotta, G.; Duke, S.O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4): 890-896.
- Wilson, C.L.; Wisniewski, M.E. 1994. *Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice*. Boca Raton: CRC Press, 465p.