

AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *OTTONIA MARTIANA* MIQ. (PIPERACEAE) SOBRE TRÊS FITOPATÓGENOS

M.M. Cunico<sup>1</sup>, J.L.S. Carvalho<sup>1</sup>, V.C. Silva<sup>1</sup>, D.P. Montrucchio<sup>1</sup>, V.A. Kerber<sup>1</sup>,  
A. Grigoletti Júnior<sup>2</sup>, C.G. Auer<sup>2</sup>, M.D. Miguel<sup>1</sup>, O.G. Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica, Av. Prof. Lothário Meissner, 3400, CEP 80210170, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: obdulio@ufpr.br

## RESUMO

*Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, arbusto comum da Floresta Atlântica, é conhecida pelos habitantes do Litoral Paranaense como "anestésia". Raízes e partes aéreas são utilizadas *in natura* pela população, no tratamento de odontalgias, na forma de alcoolaturas (bochecho) ou de fragmentos da planta (mascar), promovendo alívio imediato da sensação da dor, devido à sua ação anestésica sobre a mucosa bucal. Pela presença comprovada de amidas em sua composição, investigou-se o efeito antifúngico "*in vitro*" de extratos etanólicos e aquosos desta planta medicinal sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Rhizoctonia* sp. Comparando-se o crescimento micelial dos isolados nos meios de cultura contendo os extratos brutos, verificou-se potencial antifúngico somente sobre os fungos *F. oxysporum* e *Rhizoctonia* sp., de forma dependente da concentração, do método de extração e do órgão vegetal utilizado. O extrato bruto etanólico das raízes de *O. martiana* nas concentrações de 0,051 mg/mL, 0,102 mg/mL e 0,204 mg/mL em BDA, apresentou maior atividade, inibindo em mais de 50% o crescimento micelial dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: Amidas, plantas medicinais, fungitóxico.

## ABSTRACT

ANTIFUNGAL EVALUATION OF EXTRACTS OBTAINED FROM *OTTONIA MARTIANA* MIQ. (PIPERACEAE) ON THREE PLANT PATHOGENS. *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, a common shrub from Atlantic Forest, is popularly known as "anestésia". Roots, stems and leaves are used *in natura* in folk medicine, in treatment of odontological disorders, as extract (rinsing of mouth) or plant fragments (chewing), promoting prompt relief of pain sensation, due to its anesthetic action on mucous membrane. Due to the presence of amides, the antifungal effects "*in vitro*" of ethanolic and aqueous extracts of this medicinal plants were tested against the mycelial growth of *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* and *Rhizoctonia* sp. Comparing the mycelial growth in culture medium incorporated with crude extract, there was observed potential antifungal activity only against *F. oxysporum* e *Rhizoctonia* sp., depending on the extract concentration, extraction method and vegetal organ employed. The ethanolic crude extract from the roots of *O. martiana*, in concentrations of 0.051 mg/mL, 0.102 mg/mL and 0.204 mg/mL in BDA, showed better results, inhibiting the mycelial growth by more than 50%.

KEY WORDS: Amides, medicinal plants, fungitoxic.

## INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, buscam-se alternativas para o desenvolvimento de uma agricultura ecologicamente correta e que seja sustentável (ZADOKS, 1992; KIMATI *et al.*, 1997). Para tal, um dos aspectos é o controle de doenças de plantas com o uso de extratos de plantas medicinais ou não. As informações têm sido baseadas em inves-

tigações científicas acerca das atividades antimicrobianas, principalmente, em substâncias antifúngicas. Estes extratos de plantas apresentam em sua composição substâncias efetivas contra patógenos de plantas são praticamente inofensivos ao meio ambiente, quando comparados com derivados sintéticos e, podem superar em sua ação antimicrobiana (MIGUEL & MIGUEL, 1999; STANGARLIN *et al.*, 1999).

<sup>2</sup>Embrapa Florestas, Laboratório de Fitopatologia, Colombo, PR, Brasil.

Como estudos de bioprospecção com espécies da família Piperaceae mostraram potencial para a busca de produtos com atividade antifúngica, devido à presença, em sua composição, de uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos, principalmente as amidas (SENGUPTA & RAY, 1987; CUNICO, 2001; CUNICO *et al.*, 2002; CUNICO *et al.*, 2003a, CUNICO *et al.*, 2003b), este trabalho teve por objetivo realizar uma investigação da atividade fungitóxica de extratos de *Ottonia martiana*, planta da família Piperaceae.

Esta planta é um arbusto da Floresta Atlântica (região sudoeste e sul do Brasil), empregada popularmente "*in natura*" (raízes e partes aéreas), nas odontalgias, na forma de fragmentos da planta (mascar) ou de alcoolaturas (bochecho), promovendo alívio imediato da dor, devido a sua ação anestésica na mucosa bucal, motivo pelo qual é conhecida por "anestésia" pelos nativos do Litoral Paranaense (LOPES, 1989).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Raízes e partes aéreas de *O. martiana* foram coletadas em abril de 2000, no Município de Guaratuba, PR, (encosta da Floresta Atlântica - Serra do Mar), a uma altitude de 20 metros. A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo Botânico Dr. Gerdt Hatschbach do Museu Botânico Municipal (MBM) da Prefeitura de Curitiba, PR, e um exemplar desta espécie (exsicata) foi depositado no Herbário deste Museu, registrado sob número 259.057.

### Obtenção dos extratos vegetais

Para a obtenção do extrato bruto etanólico (EBEtOH), caules (116,05 g) e raízes (67,56 g) foram estabilizadas de *O. martiana* e macerados exaustivamente com etanol (95%), seguido de concentração a pressão reduzida (40° C) a aproximadamente 1/5 do seu volume. Os extratos brutos aquosos (EBAquosos) de folhas frescas (15 g) da *O. martiana* foram obtidos pela trituração no liqüidificador com água destilada e filtração em funil de vidro sinterizado sob vácuo.

### Ensaio biológico

Os isolados dos patógenos testados foram fornecidos pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, da Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná e pela Embrapa Florestas. Foram utilizadas culturas puras de *Fusarium oxysporum* (isolado de café), *Colletotrichum acutatum* (isolado de morango) e *Rhizoctonia* sp. (isolado de erva-mate), com sete dias de idade em meio

BDA (Batata-Dextrose-Ágar) Para a avaliação da atividade fungitóxica dos EBEtOH (raízes e caules) e EBAquosos (folhas frescas) da *O. martiana*, utilizou-se o método adaptado de AUER & BETTIOL (1986) e STANGARLIN *et al.* (1999), baseado na análise do efeito do extrato sobre o crescimento micelial do fungo que está sendo testado. Para tal, os extratos foram incorporados separadamente em BDA, cada um em uma determinada concentração de acordo com a quantidade obtida em laboratório (Tabela 1), autoclavados a 120° C e 1 atm por 15 minutos. O pH das soluções encontravam-se em torno de 5,5 (EBEtOH) e 6,4 (EBAquosos), antes da esterilização. O teor alcoólico dos EBEtOH foi analisado por meio do método de microdestilação. Após 48 horas do meio ser vertido nas placas de Petri, contendo os extratos etanólicos (caules e raízes) e aquosos (folhas frescas), foram colocados discos de micélio-ágar (com 5 mm de diâmetro) retirados de culturas puras dos fungos testados. Em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25° C no escuro. O controle conteve apenas o meio BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições. As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), após 5 dias de incubação dos patógenos. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do Teste de Tukey (limite de confiança de 95%), utilizando-se o programa SANEST (ZONTA *et al.* 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor alcoólico dos extratos etanólicos analisados por microdestilação foi considerado desprezível (< 0,01%), evidenciando a não interferência do etanol na atividade antifúngica exibida neste ensaio.

Comparando-se o crescimento micelial dos isolados de *F. oxysporum* e *Rhizoctonia* sp. nos meios de cultura contendo EBEtOH (raízes e caules) e EBAquosos (folhas frescas) com os controles, verificou-se uma atividade antifúngica dependente do método de extração, do órgão vegetal utilizado e diretamente proporcional à quantidade de extrato no meio de cultura. O mesmo não foi observado nos ensaios frente ao isolado *C. acutatum* (Tabela 1).

Os EBEtOH das raízes (0,051 mg/mL, 0,102 mg/mL e 0,204 mg/mL em BDA) apresentaram os melhores resultados, cuja inibição do crescimento micelial de cada patógeno analisado foi superior a 50% (Tabela 1). Quanto ao EBAquoso das folhas, verificou-se alto potencial antifúngico somente contra *Rhizoctonia* sp. (0,102 mg/mL e 0,204 mg/mL em meio BDA), o mesmo não ocorreu contra os outros patógenos testados (Tabela 1).



Tabela 1 - Desenvolvimento de três fitopatógenos em meio BDA acrescido de extratos de *Ottonia martiana*

| Extrato testado           | Concentração em BDA (mg/mL) | <i>Fusarium oxysporum</i> |          |                                      | <i>Colletotrichum acutatum</i> |          |                                      | <i>Rhizoctonia</i> sp.    |          |                                      |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------|----------|--------------------------------------|---------------------------|----------|--------------------------------------|
|                           |                             | Crescimento micelial (mm) |          | Inibição do crescimento micelial (%) | Crescimento micelial (mm)      |          | Inibição do crescimento micelial (%) | Crescimento micelial (mm) |          | Inibição do crescimento micelial (%) |
|                           |                             | EB                        | Controle | (%)                                  | EB                             | Controle | (%)                                  | EB                        | Controle | (%)                                  |
| EBEtOH (raízes)           | 0,204                       | 2,3 a*                    |          | 62,30                                | 1,8 c                          |          | 66,67                                | 2,0 a                     |          | 72,22                                |
|                           | 0,102                       | 2,7 a                     | 6,1 b    | 55,74                                | 1,6 c                          | 5,4 d    | 70,37                                | 2,1 a                     | 7,2 e    | 70,83                                |
|                           | 0,051                       | 2,7 a                     |          | 55,74                                | 2,5 a                          |          | 53,70                                | 2,4 a                     |          | 66,67                                |
| EBEtOH (caules)           | 2,670                       | 2,7 a                     |          | 55,74                                | 3,0 a                          |          | 44,45                                | 2,6 a                     |          | 63,89                                |
|                           | 1,335                       | 3,2 a                     | 6,1 b    | 47,54                                | 2,7 a                          | 5,4 d    | 50,00                                | 2,7 a                     | 7,2 e    | 62,50                                |
|                           | 0,667                       | 3,6 a                     |          | 40,98                                | 3,7 a                          |          | 31,48                                | 2,7 a                     |          | 62,50                                |
| EBAquoso (folhas frescas) | 2,025                       | 5,8 b                     |          | 3,33                                 | 4,6 f                          |          | 4,17                                 | 1,5 c                     |          | 76,92                                |
|                           | 1,012                       | 6,2 b                     | 6,0 b    | 0,00                                 | 4,4 f                          | 4,8 f    | 8,33                                 | 2,5 a                     | 61,54    |                                      |
|                           | 0,506                       | 6,1 b                     |          | 0,00                                 | 4,7 f                          |          | 2,08                                 | 5,5 b                     | 6,5 b    | 15,39                                |

\*Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey - 5%) - média de seis repetições casualizadas. A inibição do crescimento micelial dos patógenos testados nos extratos em estudo foi obtida pela comparação das médias das colônias fúngicas do tratamento com os controles.

Estudos similares foram realizados com EBAquosos das plantas medicinais *Ocimum basilicum* (alfavaca), *Ruta graveolens* (arruda) e *Baccharis trimera* (carqueja), as quais apresentaram atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola* (STANGARLIN *et al.*, 1999).

Os resultados desta pesquisa demonstraram a presença de princípios antifúngicos ativos contra dois dos fungos testados. A próxima etapa da pesquisa será desenvolvida no controle in vivo, para confirmar o potencial do extrato de *O. martiana* sobre *F. oxysporum* e *Rhizoctonia* sp. como um método alternativo de controle do tombamento de mudas de erva-mate. Essas informações são interessantes para pequenos produtores de erva-mate, uma vez que não existem fungicidas registrados para esta cultura.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUER, C.G. & BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. *IPEF*, n.32, p.49-51, 1986.
- CUNICO, M.M. *Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da Ottonia martiana* Miq. - Piperaceae. Curitiba: 2001, 81p. [Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Univ. Federal do Paraná].
- CUNICO, M.M.; CIRIO, G.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; MONTRUCCHIO, D.P.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.12, n.2, p.69-73, 2002.
- CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO, J.L.S.; PEITZ, C.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: Um Teste in vivo. *Visão Acadêmica*, v.4, n.2, p.77-82, 2003a.
- CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; MONTRUCCHIO, D.P.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Avaliação da atividade antibacteriana de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Rev. Cienc. Farm.*, v.24, n.2, p.141-145, 2003b.
- KIMATI, H.; GIMENEZ-FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. *Guia de fungicidas agrícolas - recomendações por cultura*. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. v.1.
- LOPES, M. *Contribuição para o estudo fitoquímico de Ottonia martiana* Miq. - Piperaceae. Curitiba: 1989. 102p. [Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].
- MIGUEL, M.D. & MIGUEL, O.G. *Desenvolvimento de fitoterápicos*. São Paulo: Robe Editorial, 1999.
- SENGUPTA, S. & RAY, A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia*, v.63, n.3, p.147-166, 1987.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA CRUZ, M.E.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotechnol. Ciênc. Desenv.*, n.11, p.16-21, 1999.
- ZADOKS, J.C. The costs of change in plant protection. *J. Plant Prot. Trop.*, v.9, p.151-159, 1992.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST) [Disquete, 3 ½ pol.]. Pelotas: UFPEL, 1984. Programa estatístico para microcomputadores.