

Efeito do extrato vegetal de *Piper callosum* sp. *in vitro* sobre *Colletotrichum* sp. agente etiológico da antracnose do pimentão

Effect of *Piper callosum* sp. plant extract *in vitro* on *Colletotrichum* sp. etiological agent of pepper anthracnose

DOI:10.34117/bjdv7n3-462

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Edriely Souza Vilamil

Discente do curso de Agronomia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia –
ICET/UFAM

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (ICET/UFAM)

Endereço: Rua Nossa Senhora do Rosário, 3836, CEP 69103-128, Itacoatiara-AM, Brasil
E-mail: edriely.vilamil@gmail.com

Liane Cristine Rebouças Demosthenes

Dra. em Agronomia Tropical pela Universidade Federal do Amazonas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (ICET/UFAM)

Endereço: Rua Nossa Senhora do Rosário, 3836 – Tiradentes, CEP 69103-128,
Itacoatiara-AM, Brasil
E-mail: liacristine@ufam.edu.br

Fernanda Fátima Caniato

Dra. em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM)

Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, CEP 69067-
005, Manaus-AM, Brasil
E-mail: fernanda_f_caniato@ufam.edu.br

Jânia Lília da Silva Bentes

Dra. em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM)

Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, CEP 69067-
005, Manaus-AM, Brasil
E-mail: jlbentes@ufam.edu.br

Pedro de Queiroz Costa Neto

Dr. em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM)

Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, CEP 69067-
005, Manaus-AM, Brasil
E-mail: senaneto16@ufam.edu.br

RESUMO

A antracnose do pimentão compromete a qualidade dos frutos pela deformidade induzida pelos sintomas da doença resultando em muitos prejuízos aos produtores desta hortaliça.

Ultimamente a exploração da atividade de compostos secundários de plantas tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos, principalmente para pequenos produtores, por meio da utilização de subprodutos de plantas medicinais como extratos aquosos ou óleos essenciais, já que apresentam, em sua composição, substâncias com propriedades fungitóxicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato vegetal de *Piper callosum*, em diferentes concentrações, sobre *Colletotrichum* sp.. Foi feito o isolamento do patógeno a partir de frutos de pimentão apresentando sintomas típicos de antracnose. Foram coletadas folhas de plantas de *P. callosum* da região amazônica, em seguida os extratos aquosos preparados foram testados, em placas de Petri, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, adicionado em meio BDA. Também foi comparada a eficiência do extrato aquoso fresco e do extrato aquoso armazenado pelo período de 12 meses, frente ao mesmo fungo. O primeiro ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e cinco repetições. O segundo ensaio foi conduzido sob o mesmo delineamento com três tratamentos e cinco repetições. As avaliações foram feitas através da medição diária do crescimento micelial e determinação da porcentagem de inibição. Os extratos de *P. callosum* apresentaram ação antimicrobiana *in vitro* contra *Colletotrichum* sp. tendo sido mais eficiente o extrato aquoso fresco de *P. callosum* na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com índice de inibição do crescimento micelial de 75,62%. O extrato aquoso, preparado a partir de material vegetal moído e armazenado durante 12 meses apresentou uma redução na eficiência de controle *in vitro* do fungo, reduzindo a inibição do crescimento micelial para 24,12%.

Palavras chave: Controle alternativo, manejo de doenças, compostos naturais, fungitóxico

ABSTRACT

Pepper anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. compromises the quality of fruits due to deformity induced by the symptoms of the disease, resulting in severe losses for pepper growers. These days, ecological sustainable disease control practices with potential to replace synthetic products has increased in interesse mainly among small farmers. In this context, the potential of plants secondary compounds activities have been explored through the use of products of medicinal plants such as aqueous extracts or essential oils, due presence of substances with fungitoxic properties in its composition. In this context, the goal of this study was to evaluate the *in vitro* effect of different concentrations of *Piper callosum* aqueous extract on mycelial growth in *Colletotrichum* sp. Isolates of *Colletotrichum* sp were obtained from sweet pepper fruits displaying anthracnose symptoms. Leaves of *P. callosum* plants were sampled in Amazon region and used to prepare the aqueous extracts at concentrations of 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ that upon evaluation were added to PDA medium. The efficiency of fresh aqueous extract and the aqueous extract stored for 12 months was also compared. A first assay was conducted to evaluate the effect of four concentrations of *P. callosum* on mycelial growth in *Colletotrichum* sp. using the fungicide Mancozeb as positive control, while the petri dishes inoculated only with *Colletotrichum* sp. served as negative control, the assay was performed on a completely randomized design with five replicates. A second assay intended to evaluate efficiency of the storage time was conducted using as treatments fresh and stored extracts, while petri dishes without extract served as control. The mycelial growth was measured on daily basis and used the calculate the percentage inhibition of the mycelial growth. Among the concentrations of fresh aqueous extract of *P. callosum* tested, the most effective was the one at concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with a mycelial growth inhibition rate of 75.62%. However, the aqueous extract, prepared from ground vegetable

material and stored for 12 months, had its antifungal activity reduced, causing the inhibition of mycelial growth of 24.12%.

Keywords: Alternative control, disease management, natural compounds, antifungal effect.

1 INTRODUÇÃO

A antracnose, que afeta pimentas e pimentões, é uma doença que compromete a qualidade dos frutos e sua comercialização gerando prejuízos aos produtores destas hortaliças, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde o clima é favorável ao patógeno (REIS et al., 2009). Os sintomas da antracnose se caracterizam por lesões redondas e deprimidas que crescem em poucos dias e apresentam o centro com pontuações pretas, evoluindo para a podridão dos frutos (REIS, et al., 2009, LOPES E ÁVILA, 2003). Em condições de elevada umidade e temperatura pode surgir a presença de uma camada cor de rosa ou alaranjada formada pela mucilagem que envolve os esporos do fungo (SILVA et al., 2018, GASPAROTTO, et al., 2014, REIS et al., 2009).

No Amazonas, a presença de uma grande diversidade genética e patogênica de espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à antracnose da pimenta-de-cheiro tornam mais difícil o controle da doença utilizando-se métodos de controle isolados (SILVA et al., 2018). Dessa forma o controle da antracnose em pimentas e pimentões pode ser melhor realizado utilizando-se o manejo integrado, com a associação de medidas tais como o uso de sementes livre do patógeno, plantios menos adensados, adubação e irrigação controladas, rouging, rotação de culturas, eliminação de restos culturais e utilização de fungicidas recomendados para a cultura (AZEVEDO et al., 2006).

Ultimamente a exploração da atividade de compostos secundários de plantas tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos, por meio da utilização de subprodutos de plantas medicinais como extrato bruto e óleo essencial, uma vez que apresentam, em sua composição, substâncias com propriedades fungicidas e fungitóxicas (DOMINGUES et al., 2020; FONSECA et al., 2015; FERREIRA et al., 2014; VENTUROSOS et al. 2011). Domingues et al (2020) avaliaram a ação de extratos de aroeira, guaco, tuia e gergelim *in vitro* sobre isolados de *Rhizoctonia* sp. e observaram que os extratos de guaco e tuia promoveram maior inibição do crescimento demonstrando a atividade antifúngica desses extratos. Fonseca et al. (2015) testaram a eficiência de óleos essenciais de plantas

medicinais brasileiras como aroeirinha, alecrim do campo e arnica brasileira no controle *in vitro* de vários fitopatógenos e constataram a eficiência dos três óleos essenciais, detectando, ainda, maior potencial para o óleo de alecrim do campo.

A pimenta-longa ou pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta aromática da família Piperaceae, nativa da região Amazônica (SILVA, 2004). O óleo desta piperácea é rico em dilapiol, com comprovada ação fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida com a vantagem de ser um produto biodegradável (SILVA, 2004). Silva e Bastos (2007) também verificaram ação inibitória com óleos essenciais de espécies de Piper sobre o crescimento micelial dos fungos *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthorapalmivora* e *Phytophthora capsici*, além de reduzir a germinação de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa*.

A busca de substitutos para os fungicidas e outros pesticidas no controle das doenças das culturas encontra nas plantas uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor (VENTUROSOSO et al., 2011). A procura por métodos alternativos para o controle de doenças que causem menos impacto ao meio ambiente e sejam mais eficientes no manejo de doenças vêm aumentando visando principalmente o mercado de produtos orgânicos e de os origem agroecológica. Nesse sentido, plantas presentes na região amazônica, que apresentam uma diversidade de substâncias em sua composição, muitas vezes com potencial fungicida ou fungistático, devem ser estudadas para serem utilizadas diretamente pelo produtor, bem como servir de matéria-prima para síntese de novos fungicidas (CELOTO et al., 2008), ou ainda serem utilizadas na indução de resistência às plantas (STANGARLIN et al., 2011; STANGARLIN, 2007). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato aquoso de *Piper callosum in vitro* sobre o fitopatógeno *Colletotrichum spp.* agente causal da antracnose no pimentão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara-AM em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Para obter o isolado do patógeno, frutos de pimenta e pimentão apresentando os sintomas típicos da doença foram coletados em feiras livres da cidade de Itacoatiara, Amazonas. Os frutos coletados foram depositados em sacos de papel esterilizados, acondicionados em caixa térmica e levados ao laboratório, onde foram higienizados em água corrente e incubados em câmara úmida até o surgimento de pontos escuros na lesão, característicos dos corpos de frutificação do patógeno.

Frutos de pimentão que apresentavam os sinais da esporulação do patógenos foram examinados ao microscópio estereoscópico para confirmação da presença das estruturas reprodutivas do patógeno. Para a realização do isolamento, esporos surgidos no centro da lesão foram cuidadosamente coletados utilizando-se uma agulha histológica e transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA com antibiótico (200 g.L⁻¹ de Batata, 20 g.L⁻¹ de Dextrose 20 g.L⁻¹ de Ágar, Cloranfenicol 250 mg.L⁻¹) e em seguida, incubados em estufa BOD à 26 °C por 48 horas. Ao final deste período, hifas surgidas no meio foram excisadas e transferidas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura utilizado anteriormente. Os isolados obtidos foram preservados pelo método Castellani (1939) para os estudos subsequentes. Para a identificação morfológica das culturas de *Colletotrichum* spp. os isolados obtidos foram reativados em meio BDA, incubados em estufa BOD na mesma temperatura utilizada anteriormente e foi realizada quando os isolados entraram em fase de esporulação avaliando-se características macroscópicas como aspecto e coloração do micélio e estruturas microscópicas como septação das hifas, formato dos conídios e apressórios (TOZZE JR et al., 2006).

COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS

Folhas de *P.callosum* utilizadas para o preparo dos extratos foram coletadas no horário de meio dia, na estação mais quente do ano, chamado verão amazônico (Agosto), no campus do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, em Itacoatiara, Amazonas. As plantas alvo das coletas ficavam em lugar sombreado, crescendo naturalmente sem a adoção de nenhum trato cultural específico, tais como regas, podas ou adubações periódicas. As folhas foram coletadas com o pecíolo, em estágios e tamanhos variados, saudáveis, sem injúrias ou manchas, levadas ao laboratório onde foram higienizadas em água corrente, secas em papel de filtro por 24 horas, desidratadas em estufa de circulação de ar forçada à 40 °C por três dias, e em seguida moídas em liquidificador doméstico até se obter um pó fino que foi dividido em duas partes iguais. Uma parte do material moído resultante

foi imediatamente utilizada para o preparo do extrato aquoso e a outra parte foi armazenada em vidro âmbar com tampa plástica rosqueável em condições de laboratório (temperatura ambiente de cerca de 25 °C), pelo período de um ano, para a avaliação do efeito do tempo de armazenamento sobre a atividade do extrato.

Para obtenção do extrato aquoso bruto (EAB), o material moído foi deixado em imersão em água destilada por 24 horas, protegido da luz, na dosagem de 100 g.L⁻¹, para liberação das substâncias presentes. O extrato obtido foi duplamente filtrado em gaze estéril, em seguida em filtro Whatman n°1, e então diluído com água destilada autoclavada para obtenção das concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg.mL⁻¹, submetidos à nova filtração utilizando filtro Milipore® 0,22 µm e adicionados ao meio de cultura BDA fundente para se obter diferentes concentrações dos extratos a serem avaliados. O meio de cultura, acrescido dos extratos foi homogeneizado, vertido em placas de Petri (90 mm de diâmetro) e após sua solidificação, discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio de *Colletotrichum* sp. com oito dias de idade foram depositados no centro das placas de Petri contendo os respectivos tratamentos. Como controle negativo foi utilizado a testemunha composto meio de cultura BDA (ausência de extrato vegetal) e como controle positivo a utilização do fungicida Mancozebe, diluído no meio cultura na concentração de 10 µg.mL⁻¹ do ingrediente ativo.

AValiação DOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da eficácia dos tratamentos foi mensurado o crescimento micelial quantificando-se as medidas do diâmetro das colônias, a cada dois dias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro digital (precisão de ± 0,001 mm), iniciadas 24 horas após o plaqueamento e encerradas 48 horas após o momento que as colônias fúngicas, do tratamento testemunha (ausência de extrato), atingiram toda a superfície do meio (chegando até a borda da placa) e posteriormente calculada uma média por placa. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (quatro concentrações do extrato, o fungicida e ausência de extrato) e cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por duas placas de Petri. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculado através da seguinte fórmula:

$$PIC \% = \left[\frac{(CM1 - CM2)}{CM1} \right] \times 100$$

Onde:

CM1 = crescimento micelial da testemunha;

CM2 = crescimento micelial do tratamento.

Os dados do crescimento micelial foram submetidos aos teste de normalidade e homocedasticidade, em seguida submetidos à análise de variância e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o pacote *agricolae v.1.3-3* (Mendiburu, 2020) do Software R (The R Core Team, 2020).

Após o período de doze meses, novos ensaios foram realizados para avaliar o efeito do tempo de armazenamento sobre a atividade do extrato sobre o crescimento micelial do patógeno. Para tanto foram preparados os extratos aquosos de *P.callosum* somente na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando o pó das folhas que ficou armazenado, denominado de Extrato Estoque (EE), e repetiu-se a coleta de novas folhas, mantendo-se inalteradas todas as condições de coleta, incluindo utilizar as mesmas plantas alvo das coletas, características e idade das folhas, mês e horário de coleta para o preparo de um extrato a partir de folhas frescas. O extrato foi preparado conforme descrito anteriormente e foi denominado Extrato Fresco (EF). O experimento foi montado e avaliado seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

O delineamento experimental utilizado no segundo experimento foi o inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos (Os dois tipos de extratos (EE e EF), e a ausência de extrato) e 5 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por duas placas de Petri. Os dados do crescimento micelial foram submetidos aos teste de normalidade e homocedasticidade, em seguida submetidos à análise de variância e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o pacote *agricolae v.1.3-3* (Mendiburu, 2020) do Software R (The R Core Team, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

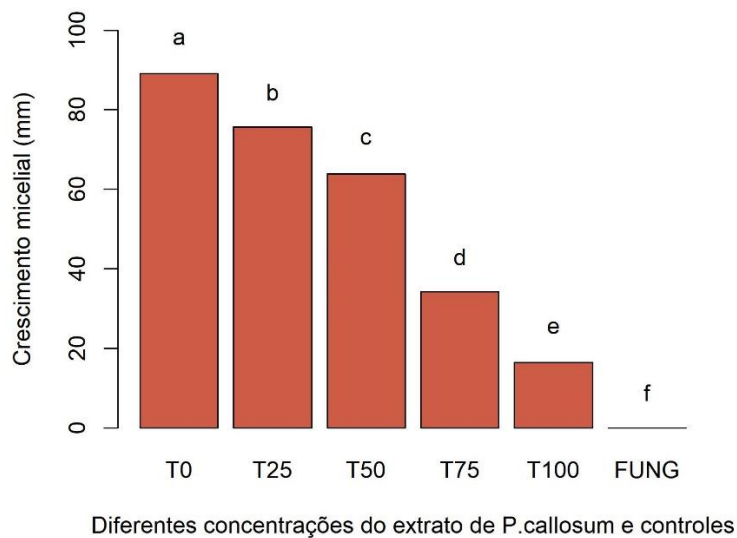
Foram obtidos 27 isolados puros que foram identificados à nível de gênero com base em suas características morfológicas e culturais em meio BDA indicando se tratarem de *Colletorichum* spp. Os conídios observados apresentaram característica típica deste gênero com formato reto, cilíndrico e apresentando as extremidades arredondadas. As características morfológicas foram sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Aspectos morfológicos das colônias de *Colletotrichum* spp. coletadas em propriedades rurais de Itacoatiara – AM.

Isolados	Cor da colônia	Cor do reverso da colônia	Aspecto do Micélio	Formato e cor do conídio
1 – 3; 22, 26	Cinza	Cinza	Aéreo e algodinoso	Reto, cilíndrico, hialino
8, 9	Cinza	Cinza	Aéreo e algodinoso	Reto, cilíndrico, hialino
10, 12, 16	Branca	Cinza	Aéreo e algodinoso	Reto, cilíndrico, hialino
4 – 7, 11, 13, 14, 15, 17, 23 – 25 e 27	Branca	Laranja	Aéreo e algodinoso	Reto, cilíndrico, hialino

O resultado da análise de variância demonstrou diferenças na atividade antimicrobiana do extrato de *P. callosum* nas variadas concentrações, sendo as concentrações mais elevadas mais inibitórias ao fitopatógenos (Figura 1) A inibição apresentada pelo extrato foi percebida a partir do terceiro dia para as concentrações 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a partir do quinto dia para as outras concentrações.

Figura 1. Efeito das diferentes concentrações do extrato vegetal de *P. callosum* no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp.



As placas que compuseram o controle negativo, conforme esperado, não apresentaram crescimento micelial, resultando em 100% de inibição. As placas que compuseram o tratamento testemunha apresentaram crescimento normal, demorando cerca de 10 dias para atingirem a borda da placa. Na Tabela 2 estão sumarizados os resultados da análise de variância.

Tabela 2. Índice de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. frente às diferentes concentrações de extrato de *P. callosum* no ano 1 do desenvolvimento do trabalho

Fontes de Variação	Índice de inibição de crescimento micelial	p-valor
Testemunha (Ausência de extrato)	0,0 f	2 ⁻¹⁶
Fungicida	100 a	
Extrato aquoso de <i>P. callosum</i> 25 µg.mL ⁻¹	16,44 e	
Extrato aquoso de <i>P. callosum</i> 50 µg.mL ⁻¹	34,25 d	
Extrato aquoso de <i>P. callosum</i> 75 µg.mL ⁻¹	63,86 c	
Extrato aquoso de <i>P. callosum</i> 100 µg.mL ⁻¹	75,62 b	
CV (%)	5,18	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No resultado do segundo ensaio experimental, onde se buscou avaliar a efetividade do extrato após um período de armazenamento, a ação inibitória do EE foi bem menor quando comparada à utilização do EF. Ao se comparar o efeito dos extratos baseados na época de coleta e preparação do extrato, observa-se que o período de estocagem das folhas secas e moídas interferiu negativamente no resultado do teste reduzindo a inibição de 62,24%, utilizando extrato fresco (EF) para 24,12% quando se utilizou o extrato feito com o material armazenado durante 12 meses, diferindo estatisticamente da utilização do EF e da testemunha. Essa redução na inibição do crescimento micelial do patógeno indica que o armazenamento realizado interferiu negativamente na presença dos compostos bioativos da planta exigindo estudos fitoquímicos para a determinação do fator que interfere na perda da ação inibitória do extrato. Comparando-se o efeito dos extratos na inibição do crescimento micelial do patógeno também foi observada uma redução na eficiência da inibição de 75,62% para 62,24% no segundo ensaio para as mesmas concentrações de 100 µg.mL⁻¹. Essa redução na inibição pode ser atribuída aos efeitos das condições ambientais que podem alterar os estímulos à planta que resultam na produção de metabólitos secundários pelas plantas. As placas que compuseram o tratamento testemunha apresentaram crescimento micelial normal, demorando cerca de 10 dias para atingirem a borda da placa. Na Tabela 3 estão sumarizados os resultados da análise de variância do segundo ensaio.

Tabela 3. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. frente ao extrato de *P. callosum* na concentração 100 µg.mL⁻¹ após 12 meses de estocagem.

Tratamento	Índice de inibição do crescimento micelial	F	p-valor
		19,77	0,024
Testemunha (ausência de extrato)	0,0 c		
EE aquoso de <i>P. callosum</i> 100 µg.mL ⁻¹	24,12 b		
EF aquoso de <i>P. callosum</i> 100 µg.mL ⁻¹	62,24 a		
CV (%)	4,87		

Legenda: EE: Extrato aquoso preparado com folhas trituradas e armazenadas por um período de 12 meses. EF: Extrato preparados a partir de folhas coletadas no mês de realização do ensaio. CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Macêdo et al. (2018) avaliaram a atividade *in vitro* de extratos etanólicos de *Piper marginatum* contra *Alternaria* sp. e *Colletotrichum musae* e observaram que quanto mais alta a concentração dos extratos maior a porcentagem de inibição do fitopatógenos. Também observaram que os extratos apresentam diferenças quanto à ação sobre os diferentes patógenos, sendo eficiente apenas o extrato na concentração de 50% para a inibição de *Alternaria* sp. enquanto que para *C. musae* todas as concentrações foram inibitórias, corroborando os resultados obtidos neste estudo onde foi observado maior inibição com as concentrações mais altas do EF de *P. callosum* sobre *Colletotrichum* sp.

Silva et al. (2020) avaliaram o controle *in vitro* proporcionado por extratos etanólicos de angico e pau-ferro na incidência de fitopatógenos associados à sementes de soja. Os autores verificaram que todas as concentrações de extrato de angico foram eficientes na redução de *Cercospora* sp. e *Cladosporium* sp. nas sementes. Também constataram que os extratos vegetais, tanto de angico quanto de pau-ferro, em todas as concentrações testadas, foram eficientes nas reduções de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Macrophomina* sp. Todas as concentrações de extrato de angico foram eficientes para controlar *Colletotrichum* sp., apresentando redução em torno de 100% na redução da incidência deste patógeno.

Andrade e Vieira (2016) realizaram um estudo onde avaliaram o efeito fungitóxico de extratos de óleos essenciais de várias espécies contra *C. gloesporioides* *in vitro* e *in vivo*. Os autores verificaram que os extratos foram efetivos na inibição do crescimento micelial e na germinação de esporos, sendo o extrato de capim limão e o de anis os que apresentaram melhores resultados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Eles também verificaram diferença quanto ao extrato utilizado e também quanto à concentração do extrato utilizada.

Ferreira et al. (2014) também obtiveram resultados semelhantes quando avaliaram a atividade de extratos aquosos de folhas de gravioleira e erva cidreira, e extratos aquosos de sementes de graviola e de nim, em diversas concentrações, contra *C. gloesporioides* *in vitro*, observando que os efeitos inibitórios dos extratos ocorreram nas diversas concentrações testadas. Essa variação da inibição em razão da concentração do extrato demonstra um relação de dependência entre a concentração do produto e a inibição do fitopatógeno. Em se tratando de espécies vegetais, quanto maior a concentração maior a presença de compostos secundários, e dentre esses compostos talvez a presença de uma molécula que tenha propriedade fungitóxica à esse gênero.

O estudo com extratos vegetais para controle de fitopatogénos são importantes pois permitem a detecção de frações vegetais com potencial antimicrobiano e por representarem uma alternativa para ser utilizada por produtores da agricultura familiar ou produtores de cultivo orgânico. A efetividade da ação inibitória do extrato de *P. callosum* sobre o desenvolvimento micelial de *Colletotrichum* spp. *in vitro*, evidenciou que os compostos presentes nesta espécie vegetal, na forma de extrato aquoso, podem representar potenciais estratégias no controle alternativo da doença causada por este fungo. Foi constatado que o tempo de armazenagem do extrato foi prejudicial ao efeito inibitório mas não podemos identificar o que pode ter acontecido para o extrato ter perdido o seu potencial inibitório, podendo a interferência ter origem na temperatura ou teor de umidade do laboratório, entre outras causas.

4 CONCLUSÕES

O extrato aquoso de *P. callosum* promoveu a inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. O extrato aquoso apresenta maior eficiência na inibição quando utilizado na forma de Extrato Fresco, ou seja, com o extrato preparado logo após a coleta das folhas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEAM pela concessão da bolsa de Iniciação Científica à discente durante a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W.P.; VIEIRA, G.H.C. 2016. **Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose *in vitro* e em frutos de mamoeiro.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.367-372.
- AZEVEDO, C.P.; CAFÉ FILHO, A.C.; HENZ, G.P.; REIS, A. 2006. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas.** Comunicado Técnico 35. Brasília: Embrapa Hortaliças.
- CASTELLANI, A. 1939. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** J. Trop. Med. Hyg., v. 42, p. 225.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J 2008. **Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*.** Acta Scientiarum Agronomy, Maringá 30(1): 1- 5.
- DOMINGUES, S. C. DE O.; MATOS, D.L. de; CARVALHO, M. A. C.; RABELO, H.O.R.; YAMASHITA, O.M.; KARSBURG, I.V. 2020. **Atividade antifúngica de extratos vegetais em *Rhizoctonia sp.* isolado de orquídea.** Research, Society and Development, v. 9, n. 8, p.1-17.
- FERREIRA, E.F.; SÃO JOSÉ, A.R.; BOMFIM, M.P.; PORTO, J.S.; JESUS, J.S. DE. 2014. **Uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.).** Revista Brasileira de Fruticultura, 36(2): 346-352.
- FONSECA, M.C.M.; LEHNER, M.S.; GONÇALVES, M.G.; PAULA JÚNIOR, T.J.; SILVA, A.F.; BONFIM, F.P.G.; PRADO, A.L. 2015. **Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, n.17, v.1, p.45-50.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; BERNI, R.F. 2014. **Antracnose da pimenta-de-cheiro.** Comunicado Técnico 104. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. DE. 2003 **Doenças do pimentão: diagnose e controle.** Brasília: Embrapa Hortaliças.
- REIS, A.; BOITEUX, L.S; HENZ, G.P. 2009. **Antracnose em hortaliças da família Solanacea.** Circular Técnica 79. Brasília: Embrapa Hortaliças.
- MACÊDO, C. G.; SOUSA, B. C. M.; FRAGA, S. S.; LOURIDO, K. A.; LUSTOSA, D. C.; SILVA, E. O.; CASTRO, K. C. F.2018. **Fitoquímica e atividade antifúngica do extrato de folhas de *Piper marginatum* no controle de fitopatógenos.** Revista ibero-americana de ciências ambientais, v.9, n.6, p.70-77.
- SILVA, A. M. DA; BENTES, J.L.S.; BEZERRA, E.J.S.; ANDRADE, M. C. 2018. **Diversidade morfológica, genética e patogenicidade de *Colletotrichum spp.* associados**

à **pimenta-de-cheiro** (*Capsicum chinense* Jacq.). Revista Agrária Acadêmica, n.1, v.4, p.39-51.

SILVA, M.G.N.; MEDEIROS, J.G.F.; DEMARTELAERE, A.C.F.; SILVA, T.B.M.; RODRIGUES, R.M.; SILVA, J.V.B. 2020. **Extratos vegetais de angico e pau-ferro no controle de fitopatógenos e na fisiologia de sementes de soja**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 8, p. 63012-63024.

MENDIBURU, F. A. 2020. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.3-3. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

R CORE TEAM. 2020. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SILVA, M. H. L. **Tecnologias para o desenvolvimento agroindustrial de *Piper aduncum* L.** 2004. 78f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. 2007. **Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici***. Fitopatologia Brasileira, Brasília, n.32, v.2, p. 143-145.

STANGARLIN, J. R. 2007. **Uso de extratos vegetais e óleos essenciais no controle de doenças de plantas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40, Maringá. Palestras. Maringá: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 94-95.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. 2011. **A defesa vegetal contra fitopatógenos**. Scientia Agraria Paranaensis, v. 10, n. 1, p. 18-46.

TOZZE JR., H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JR., N.S. 2006. **Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops**. Summa Phytopathologica, v. 32, n. 1, p. 71-79.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A.; SOUZA F.R 2011. **Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais**. Arquivo Instituto Biológico, n.78, v.1, p. 89-95.