



EXTRATO AQUOSO DE ALHO (*Allium sativum* L.) NO CONTROLE DE *Aspergillus niger* CAUSADOR DA PODRIDÃO VERMELHA EM SISAL

Liane Santos Sales Souza¹, Ana Cristina Fermino Soares¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB, Campus Universitário, s/n, 44380-000, Cruz das Almas, Brasil

*E-mail: salesliane@hotmail.com

Recebido em 29/11/2013

Aceito em 31/12/2013

RESUMO

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) tem propriedades terapêuticas, sendo muito utilizado na medicina alternativa. Este trabalho teve como objetivo identificar a concentração inibitória mínima e a ação dos compostos voláteis do extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* diagnosticando o seu potencial fungitóxico. Foram avaliados os seus efeitos sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*. A partir da concentração de 3000 µg mL⁻¹ do extrato, ocorreu inibição total do crescimento micelial e da esporulação. Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho inibiram o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*, a partir da concentração de 15000 µg mL⁻¹. Considerando a eficiência do extrato aquoso de alho no controle *in vitro* de *A. niger*, sugere-se que trabalhos em casa de vegetação e em campo sejam conduzidos para avaliação do efeito deste extrato no controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: controle alternativo, extrato vegetal, compostos voláteis.

1 Introdução

O extrato de alho (*Allium sativum* L.) pode ser usado como bactericida, fungicida, vermífugo, antiviral e antiprotozoário [1]. Até o momento, já foram identificados cerca de 30 componentes do alho com efeitos terapêuticos [2], dentre eles um aminoácido, a aliína que convertido pela enzima alinase, forma a alicina (dialil-tiosulfinato), substância que dá o aroma característico e também atua na defesa, quando a planta é atacada por patógenos.

Os efeitos da alicina se estendem contra vários microrganismos, o que justifica a diversidade de meios para sua utilização [3]. Tem sido relatada a capacidade fungitóxica do extrato de alho, diminuindo a germinação de esporos sexuados e de conídios de uma gama de fungos fitopatogênicos [4 - 5].

O uso do extrato aquoso de alho na concentração de 5000 µg mL⁻¹ promoveu a inibição de 37%, 66% e 76% no crescimento micelial de *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente [6]. O controle total de *Trichoderma* spp., 94,4% de controle de *Aspergillus* spp. e 47,2% de *Penicillium* sp. foram obtidos com o extrato de alho [7]. O crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. foi inibido com o extrato de alho na concentração de 500 µg mL⁻¹ [8].

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex. Engelm) é uma cultura com enorme importância social e econômica na região semiárida da Bahia, sendo base da agricultura familiar em muitos municípios, pela fácil adaptação desta planta à região semiárida, tornando-se muitas vezes a única espécie cultivada em grande

escala na maioria das propriedades rurais. Esta cultura permite a agregação de valores a populações de baixa renda nesses municípios, uma vez que gera renda pela venda local de produtos manufaturados, a exemplo do artesanato (bolsas, tapetes, chapéus, etc.) e pela exportação da fibra natural, que gera empregos diretos e indiretos [9].

Entretanto, a produtividade do sisal nas últimas décadas tem caído muito. Em 1989, a produção brasileira chegou a 220.000 toneladas, e atualmente é de aproximadamente 110.000 toneladas [10]. O motivo do declínio na produção anual da fibra de sisal se deve a queda do preço da fibra, falta de investimento em tecnologia para a produção de sisal e beneficiamento da fibra e a disseminação da podridão vermelha, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* [11], que causa a morte da planta e encontra-se disseminada em 100% dos plantios na Bahia, com incidência média variando de 5 a 40% [12].

O potencial antifúngico do extrato de alho deve ser estudado como uma alternativa para o controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal, visto que este tem ação inibitória comprovada sobre os mais diversos tipos de fungos, bactérias e nematóides, podendo ser utilizado pelos agricultores do nordeste brasileiro, por se tratar de um produto natural de fácil acesso, manuseio e preparo, além de não agredir o meio ambiente, a depender da forma de aplicação.

O objetivo deste trabalho foi identificar a concentração inibitória mínima e a ação dos compostos voláteis do extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *A. niger*, diagnosticando o seu potencial fungitóxico, avaliando os efeitos sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*.

2 Parte Experimental

2.1 Obtenção do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) e preparo do meio de cultivo.

Bulbilhos de alho (*A. sativum* L.), comprados em comércio local da cidade de Cruz das Almas – BA foram descascados, lavados com água destilada estéril e triturados (200g em 1000 mL de água destilada) por três minutos, em liquidificador, obtendo-se um extrato aquoso na concentração de 20000 µg mL⁻¹. O recipiente plástico do liquidificador foi previamente lavado com álcool diluído em água para a concentração de 70%. O extrato aquoso foi filtrado primeiramente em peneira plástica, depois em funil de vidro contendo algodão estéril e por último em membrana de nitrocelulose (Millipore) com poros de 0,22 µm de diâmetro, sendo este transferido para tubos de centrifuga estéreis, com capacidade de 50 mL. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar. O extrato foi mantido nos tubos de centrífuga estéreis, a 4°C, até a realização dos testes.

2.2 Efeito *in vitro* do extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento micelial de *A. niger* para determinação da concentração inibitória mínima - CIM

O meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) foi preparado com 200g de batata descascada e fatiada, 20g de dextrose, 15g de ágar e 1L de água destilada. Após a esterilização do meio BDA em autoclave a 120°C, por 20 minutos, esperou-se que o mesmo atingisse a temperatura próxima ao ponto de solidificação (45±2°C) e adicionou-se o extrato aquoso de alho, esterilizado por filtração, com leve agitação manual. Logo em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri estéreis. O fungo *A. niger* foi isolado de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, por meio da desinfestação do tecido do caule de sisal, com álcool 70%, por 1 minuto, 1% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e três lavagens consecutivas com água destilada esterilizada, seguido de semeio em meio BDA e incubação por 5 a 7 dias a temperatura ambiente (28±2°C). As colônias de *A. niger* foram repicadas para meio BDA e este foi identificado com chave de identificação de espécies de *Aspergillus* proposta por Raper & Fennell [13] e por técnicas moleculares [14]. A CIM foi determinada com uma sequência decrescente de concentrações do extrato aquoso em meio de cultura BDA e a inoculação de *A. niger*. O fungo foi multiplicado em meio BDA por sete dias a temperatura ambiente e discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos asépticamente para as placas de Petri contendo o meio BDA com as diferentes concentrações dos extratos aquosos e incubados em câmara de crescimento tipo BOD a 28°C. A avaliação foi realizada no período de 7 a 14 dias, medindo-se o diâmetro da colônia, com auxílio de um

paquímetro. A medição foi realizada diariamente até o período em que a cultura do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos nas culturas crescidas no meio BDA com extrato de alho, foram adicionadas sobre a cultura de *A. niger* na placa de Petri, 20 mL de água destilada esterilizada com duas gotas de Tween 20 e, em seguida, a colônia foi raspada com alça de Drigalski esterilizada por flambagem, para a obtenção da suspensão de esporos. A contagem de esporos foi feita em câmara de Newbauer (hemacitômetro) e microscópio ótico, calculando-se a concentração de conídios por mL de suspensão de esporos e para o volume total de 20 mL que foram adicionados a placa de Petri com a cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos: o controle (meio BDA sem extrato aquoso de alho) e as concentrações de (200 µg mL⁻¹, 250 µg mL⁻¹; 500 µg mL⁻¹; 750 µg mL⁻¹; 1000 µg mL⁻¹; 1250 µg mL⁻¹; 1500 µg mL⁻¹; 1750 µg mL⁻¹; 2000 µg mL⁻¹; 2500 µg mL⁻¹ e 3000 µg mL⁻¹) de extrato de alho, com cinco repetições por tratamento.

2.3 Efeito *in vitro* de compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) sobre o crescimento micelial de *A. niger*

Placas de Petri contendo recipientes pequenos preparados com folhas de alumínio foram esterilizadas em estufa a 180°C por duas horas [15]. Meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) foi vertido nas placas contendo os recipientes de alumínio. Foram dispensados 2 mL do extrato vegetal, nas concentrações de 1000 µg mL⁻¹; 3000 µg mL⁻¹; 5000 µg mL⁻¹; 10000 µg mL⁻¹; 15000 µg mL⁻¹ e 20000 µg mL⁻¹, nestes recipientes de alumínio, para que o extrato não entrasse em contato direto com o meio de cultura e nem com a cultura de *A. niger*. No tratamento controle foram utilizados 2 mL de água destilada esterilizada nos recipientes de alumínio. Discos de 5 mm de diâmetro da cultura de *A. niger* foram transferidos para o centro das placas, sendo estas incubadas em BOD a 28 °C (Figura 1). A avaliação foi realizada no período de 7 a 14 dias, medindo-se o diâmetro da cultura, com um paquímetro. A medição foi realizada diariamente até o período em que a cultura do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. Para a contagem de esporos, foram adicionados à cultura de *A. niger*, 20 mL de água destilada esterilizada com duas gotas de Tween 20 e a colônia foi raspada com alça de Drigalski para a obtenção de suspensão de esporos. A contagem de esporos foi feita com câmara de Newbauer (hemacitômetro) e microscópio ótico, calculando-se a concentração de conídios. mL⁻¹ na suspensão de esporos no volume total de 20 mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos: o controle positivo (contendo água destilada estéril no pote de alumínio) e os tratamentos constituídos pelas concentrações citadas acima de extrato aquoso de alho, com cinco repetições.

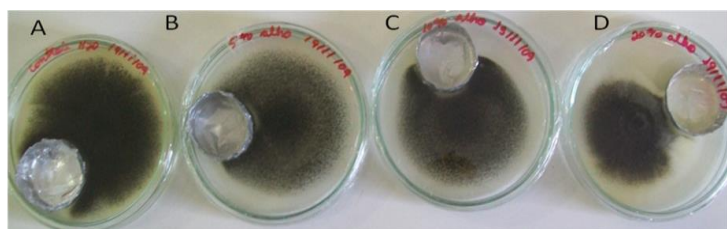


Figura 1. Bioensaio para avaliação do efeito de compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.) nas concentrações (A- Água destilada estéril; B- 5000 µg mL⁻¹; C- 10000 µg mL⁻¹ e D- 20000 µg mL⁻¹), sobre o crescimento micelial de *A. niger*.

2.4 Análise estatística dos dados obtidos

Os dados relativos à inibição do crescimento micelial e esporulação (em placas de Petri com meio de cultura) sobre o crescimento de *A. niger* foram analisados pelo teste de regressão e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o programa estatístico SISVAR [16].

3 Resultados e discussões

A concentração mínima inibitória (CIM) do extrato aquoso de alho sobre *A. niger* foi definida para a inibição total do desenvolvimento do fungo *A. niger*. Neste trabalho, a concentração de 3000 µg mL⁻¹ do extrato aquoso de alho inibiu em 100% o crescimento micelial e a esporulação de *A. niger*.

Nas concentrações de 1750 µg mL⁻¹ e 2000 µg mL⁻¹ de extrato de alho ocorreu inibição do crescimento micelial em aproximadamente 13,25% e com 2500 µg mL⁻¹ do extrato ocorreu a inibição em 44,5%. Em relação à esporulação do fungo, a partir da concentração de 500 µg mL⁻¹ do extrato aquoso de alho, ocorreu inibição de 86% da esporulação e, à medida que se aumentou a concentração, aumentou também a inibição da esporulação, chegando a 100% com a adição de 3000 µg mL⁻¹ do extrato aquoso ao meio de cultura, o que demonstra que doses menores também podem ser eficientes no controle do desenvolvimento do fungo (Tabela 1).

O extrato aquoso de alho apresenta alta atividade antifúngica sobre os fitopatógenos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani*, *Cercospora Kikuchii* e *Phomopsis* sp., sendo uma promissora alternativa no controle dos mesmos [17]. O óleo essencial obtido de bulbilhos de alho causou a inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* [18]. Para a inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp, em presença do extrato de alho, encontrou-se valor de CIM igual a 5% [19].

Tabela 1. Taxa de inibição da esporulação de *A. niger* por diâmetro de colônia, na presença de diferentes doses de extrato aquoso de alho (*A. sativum* L.), avaliada 14 dias após incubação.

Concentração do extrato aquoso de alho (µg mL ⁻¹) em meio BDA*	Taxa de inibição da esporulação (%)
250	18
500	86
750	89
1000	87
1250	88
1500	84
1750	84
2000	90
2500	95
3000	100
5000	100
10000	100
15000	100
20000	100

*BDA – meio de cultura batata dextrose agar acrescido do extrato aquoso de alho

Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho inibiram o crescimento micelial de *A. niger*. Ocorreu inibição de 43,13% e 44,81% nas concentrações de 10000 µg mL⁻¹ e 15000 µg mL⁻¹ respectivamente, atingindo 57,14% na concentração de 20000 µg mL⁻¹ (Figura 2). A taxa de esporulação do fungo diminuiu em 34,48% no meio de cultura com o extrato de alho na concentração de 15000 µg mL⁻¹ e nas concentrações de 3000 µg mL⁻¹ e 5000 µg mL⁻¹ ocorreu um estímulo na esporulação em torno de 25,86% (Figura 3).

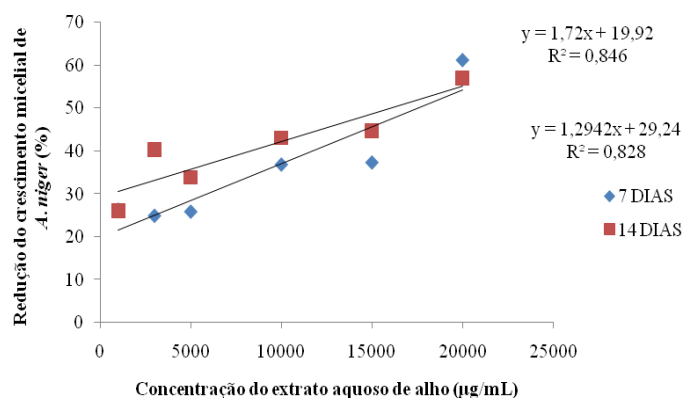


Figura 3. Crescimento micelial de *A. niger* no meio BDA em placas de Petri contendo recipientes com extrato aquoso de alho, em diferentes concentrações, sem contato direto do fungo e do meio com o extrato, evidenciando o efeito de compostos voláteis produzidos pelo extrato aquoso de alho na placa, observação com 7 e 14 dias de incubação.

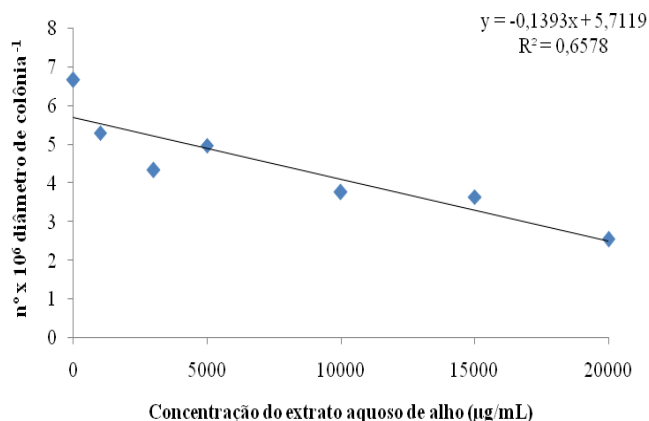


Figura 2. Esporulação de *A. niger* por diâmetro de colônia em meio BDA em placas de Petri contendo recipientes com extrato aquoso de alho, em diferentes concentrações, sem contato direto do fungo e do meio com o extrato, evidenciando o efeito de compostos voláteis produzidos pelo extrato aquoso de alho na placa. (Observação com 14 dias de incubação).

Pode-se inferir que os compostos voláteis presentes no extrato aquoso têm ação fungitóxica sobre *A. niger*, uma vez que o crescimento micelial e a esporulação foram reduzidos com o tratamento com extrato de alho, sem o contato direto com o fungo, nas concentrações acima de 10000 µg mL⁻¹.

A difusão de traços de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos [20]. Uma possível atribuição para a redução do potencial de inibição pode ser à volatilização dos constituintes dos extratos ou óleos, e/ou à instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais modificando a atmosfera no interior das placas de Petri [21]. As substâncias que representam os compostos voláteis no alho contêm enxofre e um grupo alil (CH₂CHCH₂), particularmente dialil dissulfeto, que é o sulfeto mais abundante no bulbo, embora os dialis mono, tri e tetra sulfetos possam também estar envolvidos [22].

4 Conclusões

O extrato de alho esterilizado por filtração controla o crescimento micelial e a esporulação *in vitro* de *A. niger* em 100 %, nas concentrações a partir de 3000 µg mL⁻¹.

Os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho têm ação fungitóxica sobre *A. niger*, nas concentrações acima de 10000 µg mL⁻¹.

Os testes *in vitro* indicam o potencial de uso de extrato de alho para o controle de *A. niger*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa de Pós - Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia) pelo curso de mestrado e a oportunidade de realização deste trabalho.

AQUEOUS EXTRACT OF GARLIC (*Allium sativum* L.) FOR CONTROL OF *Aspergillus niger*, THE CAUSING AGENT OF SISAL RED ROT STEM DISEASE

ABSTRACT: The extract of garlic (*Allium sativum* L.) has therapeutic properties and is widely used in alternative medicine. This study aimed to identify the minimum inhibitory concentration and the activity of volatile compounds from aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) for control of *Aspergillus niger*, and to diagnose its fungitoxic potential. The effects on mycelial growth and sporulation of *A. niger* were evaluated. Complete inhibition of mycelial growth and sporulation was obtained with the extract concentration of 3000 µg mL⁻¹. Volatile compounds present in the aqueous garlic extract inhibited mycelium growth and sporulation of *A. niger*, for extract concentrations of 15000 µg mL⁻¹ and above. Considering the effective *in vitro* control of *A. niger* with garlic aqueous extract, it is suggested that further research work under greenhouse and field conditions should be conducted to evaluate the efficiency for sisal stem red rot disease control.

Keywords : alternative control, plant extract, volatile compounds

Referências

- [1] CARRICONDE, C.; MORES, D.; De volta às Raízes, Olinda: GCL Gráfica e Editora Ltda., 1988. p.13.
- [2] KATZUNG, B. G.; Farmacologia Básica e Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.1008.
- [3] TALAMINI, V.; STADNIK, M. J.; Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: Manejo Ecológico de Doenças de Plantas, Florianópolis. SC: CCA/UFSC, 2004. p. 45-62.
- [4] BASTOS, C. N.; Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho, Fitopatologia Brasileira, Vol. 17, p. 454 – 457, 1992.
- [5] WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WINIEWSKI, M. E.; Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*, Plant Disease, Vol. 81, p. 204-210, 1997.

- [6] BOLKHAN, H. A.; RIBEIRO, W. L.; Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*., Fitopatologia Brasileira, Vol. 6, p. 565-566, 1981.
- [7] BRAND, S. C.; JUNGES, E.; MILANESI, P.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; Extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola, 2006. Disponível em: www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos. Acesso em: 23/02/2009.
- [8] BARROS, S. T.; OLIVEIRA, N. T.; MAIA, L. C.; Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* sp., Summa Phytopathologica, Vol. 21, p. 168-170, 1995.
- [9] CONSOLI, M. A.; SCARE, R. F.; PINTO, M. J. A.; MARKESTRAT; Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva. Ribeirão Preto, 2009. p. 119.
- [10] CNA; Sisal: problemas e soluções. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25/01/2012.
- [11] SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S.; *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaulo do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA. 2006.
- [12] ALVES, M. O.; SANTIAGO, E.; GIRÃO.; MOREIRA; L. A. R.. Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do nordeste brasileiro. 2005. Disponível em: http://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/livroPDF.aspx?cd_livro=11. Acesso em: 25/04/2012.
- [13] RAPER, K. B.; FENNELL, D. I.; The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1965. p. 686.
- [14] SILVA, J. R. Q. Agente etiológico da podridão vermelha do sisal / densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade. 2012. 109f. Tese (Ciências Agrárias - Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. 2012.
- [15] YU, D.; TODA, Y., KUWADA, K.; CRUZ, A. F.; ISHII, T.; Effect of volatile compounds in shoots and leaves of bahiagrass, *Vulpia myuros* and *Vulpia megalura* on the growth of several kinds of soil-borne plant pathogen and beneficial microorganisms, Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management, Vol. 16, n. 1, p. 29-35, 2009.
- [16] FERREIRA, D.F.; SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows, Versão 4.0. São Carlos. 2000.
- [17] VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C.; Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos, Summa Phytopathologica, Vol. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.
- [18] VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C.A.V.; Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*, Horticultura Brasileira, Vol. 23, n. 4, p. 915-919, 2005.
- [19] BARROS, S. T.; OLIVEIRA, N. T.; MAIA, L. C.; Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* sp, Summa Phytopathologica, Vol. 21, p. 168-170, 1995.
- [20] FRENCH, R. C.; Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores, Mycologia, Vol. 84, n. 3, p. 277-288, 1992.
- [21] SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.;
- PETROVICK, P. R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18. 1102p.
- [22] KUBOTA, N.; MIYAMUKI, M.; YAMANE, Y.; KOBAYASHI, A. Breaking bud dormancy in grapevine cuttings with garlic volatiles, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Vol. 68, n. 6, p. 927-931. 1999.