

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**EXTRATO DE FOLHAS DE JUÁ (*Ziziphus joazeiro* Mart):
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA
E CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

RAFAEL MOTA DA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2014**

**EXTRATO DE FOLHAS DE JUÁ (*Ziziphus joazeiro* Mart):
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA
E CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

RAFAEL MOTA DA SILVA

Engenheiro agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

Co-Orientador: Dr^a. Franceli da Silva

Co-Orientador: Dr^a. Karina Zanoti

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha elaborada pela Biblioteca Central - UFRB.

S586e Silva, Rafael Mota da.

Extrato de folhas de juá (Ziziphus joazeiro Mart): atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e controle da podridão vermelha do sisal / Rafael Mota da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2014. 75f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Coorientadora: Karina Zanoti Fonseca.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Sisal – Doenças. 2.Sisal – Controle biológico. 3.Extratos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.II.Silva, Francieli da. III.Título.

CDD:

633.577

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO


COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
RAFAEL MOTA DA SILVA



Dr^a Ana Cristina Fermino Soares

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

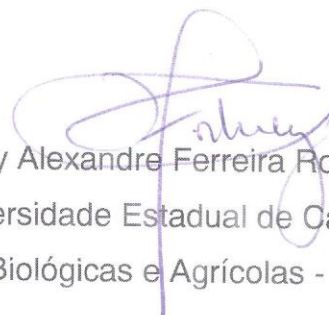
Orientadora



Dr. Paulo Juiz

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Centro de Ciências da Saúde - CCS



Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Universidade Estadual de Campinas

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola
em _____."

Aos meus queridos pais Maria Dulce e Idelval pelo amor, carinho,
incentivo, dedicação e orgulho e aos meus amados irmãos Micaela, Igor pela
confiança e carinho sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida.

À minha orientadora Prof^a Ana Cristina Fermino Soares, por ter acreditado no meu potencial, pelos ensinamentos, carinho e confiança.

À minha co-orientadora Franceli da Silva, pelos ensinamentos, carinho, paciência.

Ao minha co-orientadora, Karina Zanoti, pela paciência nos valiosos ensinamentos, carinho, amizade, e por acreditar em mim.

Ao meu amigo Jefferson Oliveira de Sá, pela ajuda e ensinamentos;

À querida amiga Jaqueline Macena, pelo incentivo e companhia a todos o momentos e por acreditar em mim;

Ao meus orientados Felipe e Cristiano por todo o auxílio.

Aos colegas de pós-graduação Camila, Marly, Carla, Irana, e Carol, por sempre um apoiar o outro, pela ajuda sempre que precisei.

Aos amigos Tony, Ângelo, Gabriel, Ricardo, Niely e Nayla pelos incentivos e companhia.

Aos eternos amigos e irmãos da República Sisaleira.

Às técnicas do laboratório, Lene, Vitória, Carol e Luana pela companhia.

Aos grandes amigos, Erasto, Adailson e Lydice pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB pela oportunidade.

À FAPESB pela bolsa do curso de mestrado.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram nesse trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“A vida nada mais é do que um momento passageiro que devemos viver para ser vivido”.

Rafael Mota da Silva

ÍNDICE

Página

RESUMO GERAL

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....13

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA.....16

Juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.)..... 16

Metabólitos secundários.....16

Fenóis17

Antioxidantes.....18

A cultura do sisal.....19

Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm).....26

Podridão vermelha do sisal.....20

Agente etiológico.....21

Extratos vegetais.....22

Referências.....24

CAPÍTULO 2

Atividade antioxidante e antimicrobiana e teor de fenóis totais do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de *ziziphus joazeiro* Mart.....29

Resumo.....30

Abstract.....31

Introdução.....32

Material e métodos.....33

Resultados.....36

Conclusão.....	40
Agradecimentos.....	41
Referências.....	41
CAPÍTULO 3	
Controle de <i>Aspergillus niger</i> e da podridão vermelha do sisal com extrato de Juá (<i>Ziziphus juazeiro</i> Mart).....	44
Resumo.....	45
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e métodos.....	49
Resultados.....	55
Discussão.....	65
Conclusão.....	70
Referências.....	70
Considerações finais.....	74

RESUMO GERAL

Silva, RM. Extrato de folhas de juá (*Ziziphus joazeiro* Mart): atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e controle da podridão vermelha do sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) tem significativa importância socioeconômica para o semiárido Baiano. A podridão vermelha do sisal, causada por *Aspergillus niger* tem sido o principal problema fitossanitário desta cultura. O *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecido popularmente como juá é muito utilizado na medicina popular e os extratos vegetais também apresentam potencial para o controle de doenças de plantas. Este trabalho teve como objetivos: quantificar os fenóis totais, avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Z. joazeiro* Mart e o seu efeito no controle da podridão vermelha do sisal. Em relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, o extrato hidroalcoólico apresentou os melhores resultados com 2.105,53 mg/EAT por grama de extrato de fenóis totais e 74,03% de atividade antioxidante, analisados pelos métodos DPPH e espectrofotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu, respectivamente. Não foi observada atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritite*, em meio TSA com o extrato e as frações nas concentrações 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L. A inibição do crescimento micelial de *A. niger* pela fração aquosa e o extrato hidroalcoólico de folhas de juá, na concentração de 400mg/L, foi de 59,4% e 56,2%, respectivamente. A fração aquosa, nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/L, foi mais eficiente na redução da esporulação de *A. niger*. Todos os tratamentos e concentrações testadas promoveram a inibição na germinação de esporos, exceto a concentração de 400 mg/L do extrato hidroalcoólico, a qual também estimulou a esporulação. O extrato aquoso de folhas de juá a 75%, aplicado na planta pelo método de pulverização, e a 50%, aplicado pelo método de irrigação, promoveram os melhores resultados na redução da severidade da doença com 74,12% e 72,16% respectivamente. Em ambos os tratamentos, a incidência da

podridão vermelha nas plantas foi de 17,65%, enquanto que a incidência no tratamento controle foi de 60%. O extrato de folhas de juá apresenta atividade antifúngica e potencial de controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: Semiárido, extratos vegetais, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Silva, RM. Juá (*Ziziphus joazeiro* Mart) leaf extracts: antioxidant, antibacterial, antifungal activity and control of sisal red rot stem disease

Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) is a crop with significant social and economic importance for the semiarid region of Bahia State, Brazil. Red rot stem disease caused by *Aspergillus niger* is the main disease problem of sisal plants in Brazil. *Ziziphus joazeiro* Mart., popularly known as *juá* is used widely in traditional medicine. Plant extracts also have the potential for controlling plant diseases. The present study aimed to evaluate the hydroalcoholic extract of *Z. joazeiro* leaves for total phenols, antioxidant, antibacterial and antifungal activity, and also for controlling sisal red rot stem disease. For phenolic compounds and antioxidant activity of the aqueous extract, the best results were 2105.53 mg / EAT per gram of extract for total phenols and 74.03% for antioxidant activity, analyzed with DPPH and by spectrophotometric method with the Folin – Ciocalteu, respectively. Antibacterial activity was not observed against *E. coli*, *S. aureus* and *S. enteritite* in TSA medium with the extract and the fractions at concentrations of 0.2, 0.4, and 0.8 mg/L. Inhibition of *A. niger* mycelium growth by the aqueous fraction and the hydroalcoholic extract of *juá* leaves, at a concentration of 400mg/L was of 59.4% and 56.2%, respectively. The aqueous fraction at the concentrations of 25, 50, 100, and 200 mg/L was more efficient in reducing sporulation of *A. niger*. All treatments and concentrations tested promoted inhibition of spore germination, except for the hydroalcoholic extract at the concentration of 400 mg/L, which stimulated sporulation of *A. niger*. The aqueous extract of *Juá* at 75%, applied to plants by pulverization, and at 50% applied through irrigation promoted the best results with 74.12% and 72.16% reduction in disease severity, respectively. For both treatments, incidence of sisal red rot stem disease in plants was of 17.65%, while the incidence in the control treatment was of 60%. Leaf extract of *juá* presents antifungal activity and a potential for controlling sisal red rot stem disease.

Key-words: Semiarid, plant extracts, *Aspergillus niger*.

INTRODUÇÃO

O juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.) pertence à família Rhamnaceae, é conhecido popularmente por juazeiro, juá ou laranjeira-do-vaqueiro e é uma das espécies vegetais mais notáveis do bioma Caatinga (LORENZI & MATOS, 2002), com resistência à seca e crescimento lento. Esta planta tem significativa importância socioeconômica para a região Nordeste, por apresentar ampla utilização popular de todas as suas partes, caule, casca, folha, fruto e raiz, devido às propriedades medicinais. Apresenta inúmeros usos medicinais tais como: antisséptico bucal, contra problemas dermatológico (caspa, sarna, dermatite, e coceiras), problemas do sistema respiratório (asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquites, inflamação de garganta e gripe) e do sistema digestório (úlceras gástricas, constipação, estomatite e má-digestão) (ALBUQUERQUE et al. 2007). Por serem ricos em saponinas, as folhas e o córtex do caule são utilizados pela indústria para fabricação de shampoo anticaspa e tônico capilar (KATO, 1998). As suas propriedades e ações são: analgésica, antifúngica, anti-inflamatória, antibacteriana, febrífuga e cicatrizante. Dentre os seus principais constituintes destacam-se os fenóis, taninos, alcaloides, triterpenos, quinonas, amfibina D e jujubogenina (OLIVEIRA & SALATINO 2000). As folhas de juá apresentam na sua composição alcaloides, saponinas, esteroides triperpenos e taninos (MELO et al., 2012).

Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI, 1995; NETO, 2013). Estes compostos compõem inúmeras classes, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos cinâmico e benzóico), estilbenos, flavonoides, cumarinas, taninos hidrolisáveis e condensados, ligninas e lignanas (NACZK & SHAHIDI, 2005). Devido ao potencial, observado em testes *in vitro*, de inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase, os compostos fenólicos naturais têm recebido atenção especial (HASLAM, 1996).

Os radicais livres são produzidos constantemente pela atividade metabólica, e reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias

oxidáveis, causando danos que auxiliam o envelhecimento e o aparecimento de doenças degenerativas, como câncer, artrite reumática e aterosclerose (MELO et al., 2006). Inúmeras substâncias naturais, advindas de plantas, caracterizam-se como captadoras de espécies reativas de oxigênio, auxiliando o corpo humano contra o efeito do mesmo, prevenindo o surgimento de doenças (GÜLCIN et al. 2003). As substâncias antioxidantes são aquelas que retardam ou previnem expressivamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação e/ou propagação da reação de oxidação em cadeia (LIMA et al., 2006). A busca por substâncias bioativas presentes nas plantas, com ação antimicrobiana e antioxidante vem crescendo na atualidade em virtude do potencial biotecnológico dessas substâncias para a síntese de novas moléculas e a produção de fármacos. As substâncias bioativas produzidas por plantas podem ser utilizadas para a fabricação de novos medicamentos, ou mesmo como substitutos de compostos ativos sintéticos, a exemplo dos antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana (AHMAD & BEG, 2001; SCHERER, 2009).

A utilização de extratos vegetais no controle de doenças vem se popularizando, em virtude do potencial dos princípios ativos de diversas espécies vegetais e a busca por alternativas mais sustentáveis de produção agrícola. A flora da região semiárida brasileira apresenta um grande potencial para a prospecção de princípios ativos e o desenvolvimento de bioprodutos, em virtude da biodiversidade presente no bioma Caatinga.

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) pertence à família Asparagaceae Juss e ao gênero *Agave*. Esta cultura desempenha um importante papel socioeconômico no semiárido baiano, na geração de emprego e renda. A Bahia apresenta uma área plantada de 265.089 hectares e 240.322 toneladas colhidas, correspondendo a 96% da produção nacional (IBGE 2012). O Brasil é líder no mercado internacional de fibra de sisal, respondendo por 47% das exportações da fibra em 2009 (SECEX, 2009). A principal utilização do sisal consiste na extração das fibras contidas em suas folhas, dando origem à principal fibra dura produzida no mundo (EMBRAPA, 2003). A fibra é utilizada na fabricação de cordas, tapetes, artesanatos entre outros (PIZARRO et al., 1999) e é essencialmente destinada à exportação, sendo os Estados Unidos, China, México e Portugal os principais importadores (SECEX, 2009).

A região semiárida da Bahia oferece condições climáticas desfavoráveis a exploração de outras culturas de importância econômica e o sisal se destaca como a principal atividade agrícola, juntamente com culturas de subsistência como mandioca, milho e feijão. O sisal é cultivado em aproximadamente 75 municípios na Bahia e estima-se que está cadeia produtiva empregue, direta e indiretamente, 700.000 pessoas em todo o estado (CONSOLI, 2009).

Entretanto, esta cultura vem sofrendo um declínio em sua produção e área plantada devido a vários fatores, dentre os quais, destaca-se a podridão vermelha do sisal, doença que está ameaçando a cultura na região (ABREU, 2010; COUTINHO et al, 2006). O agente etiológico da podridão vermelha do sisal é o *Aspergillus niger*, um fungo saprófita e cosmopolita (MORAES et al., 1997; SILVA, 2012a; SILVA, 2012b). As principais características desta doença são a murcha e amarelecimento das folhas, descoloração avermelhada dos tecidos internos do caule e base das folhas, podridão do caule, morte e tombamento da planta (COUTINHO et al., 2006).

Atualmente não existem produtos químicos registrados para o controle desta doença, que se encontra disseminada pelos plantios de sisal, com incidências variando entre 5 e 65% (ABREU, 2010). Estratégias para o controle biológico com espécies de *Trichoderma* e actinobactérias vem sendo estudadas, considerando a dificuldade de controle de patógenos que sobrevivem no solo e que são de distribuição cosmopolita, como o *A. niger*. Entretanto, ainda não existem produtos biológicos registrados para o controle desta doença. Faz-se necessário o desenvolvimento de métodos e tecnologias de manejo da podridão vermelha e da cultura do sisal para garantir a sustentabilidade e expansão desta cultura no semiárido baiano.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo quantificar os fenóis totais, avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de *Z. joazeiro* e avaliar diferentes extratos de folhas de juá no controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.)

O juá (*Ziziphus joazeiro* Mart), pertencente à família Rhamnaceae, é conhecido por juazeiro, juá ou laranjeira-do-vaqueiro, sendo uns dos representantes mais notáveis do bioma Caatinga (LORENZI & MATOS, 2002). É uma planta resistente à seca, possui crescimento lento e pode viver até 100 anos. Esta espécie tem enorme importância socioeconômica para a Região Nordeste do Brasil e apresenta uma vasta utilização popular de todas as suas partes: o caule, a casca, a folha, o fruto e a raiz. Segundo Albuquerque et al. (2007), a planta inteira apresenta inúmeros usos medicinais tais como: antisséptico bucal, contra problemas dermatológicos (caspa, sarna, dermatite, e coceiras), problemas do sistema respiratório (asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquites, inflamação de garganta e gripe) e do sistema digestório (constipação, estomatite, úlceras gástricas e má-digestão). As folhas e o córtex do caule são ricos em saponinas, que são utilizadas pela indústria para fabricação de shampoo anticaspa e tônico capilar (KATO, 1998).

As suas propriedades medicinais e ações são: analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, febrífuga e cicatrizante. Dentre os principais constituintes desta planta destacam-se os fenóis, taninos, alcaloides, triterpenos, quinonas, amfibina D e jujubogenina (OLIVEIRA; SALATINO, 2000). Em estudo realizado com folhas de *Z. joazeiro* Mart, foi constatada a presença de saponinas, esteroides, taninos e triterpenos nas folhas (MELO et al., 2012).

De acordo com Oliveira et al. (2003) a cera epicuticular das folhas de juá é rica em n-alcanos que retêm água na planta, além de triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico).

Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários podem ser definidos como uma série de compostos originados a partir da ativação de rotas metabólicas resultando na formação de compostos químicos específicos (BARROS, 2013). As substâncias químicas extraídas das plantas, normalmente são classificadas em metabólitos primários e metabólitos secundários (VIVAN, 2005). Os metabólitos

primários são substâncias necessárias para o desenvolvimento fisiológico da planta e possuem papel importante no metabolismo celular básico (TAIZ e ZEIGER, 2004). Já, os metabólitos secundários são substâncias que não tem função no metabolismo primário da planta, auxiliam a sobrevivência das mesmas devido às atividades biológicas, agindo como antibacterianos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos (FUMAGALI et al., 2008).

Os compostos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biosintética. As principais famílias são: os compostos fenólicos, terpênicos e esteroides e os alcaloides (HARBONE, 1999).

Fenóis

Os fenóis, que compreendem cerca de 8000 compostos, são estruturas aromáticas com um ou mais grupos hidroxilo. O composto fenólico está envolvido com a síntese das ligninas, atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, mas também para outros animais, os quais são atraídos para polinização e/ou dispersão de sementes. O grupo de compostos também apresenta importante papel na proteção das plantas contra vírus, fungos, bactérias, insetos e os raios ultravioletas (CROTEAU et al., 2000).

A biossíntese dos compostos fenólicos pode ocorrer por duas vias: a via do ácido xiquímico ou a via do acetato (SEIGLER, 1998). Os compostos fenólicos são classificados em várias subclasses: antocianinas, ácidos fenólicos, chalconas, cumarinas, cromonas, flavonóides menores, flavonas e flavonóides, isoflavonoides, benzofuranos, cetonas fenólicas, fenilpropanoides, estilbenoides, quinonas, xantonas e taninos (HARBORNE et al., 1999).

Os fenóis são geralmente armazenados sob formas solúveis conjugados com açúcares e/ou sulfatos nos vacúolos em virtude da sua toxicidade. Assim a maioria dos fenóis ocorre como glicósidos (Harborne, 1999). A distribuição dos fenóis na planta é variada. Os flavonóides, fenilpropanóides e os ácidos benzóicos são encontrados em quase todas as partes das plantas. Já os taninos encontram-se nas folhas e nas cascas estando restritos a essas partes da planta (HARBORNE, 1999; GERALDES, 2010).

Os flavonóides apresentam atividade antioxidante, enquanto os isoflavonoides dispõem atividade anticancerígena. Vários lenhanos possuem propriedades farmacêuticas como agentes anticancerígenos ou antivirais (PETERS & CROTEAU 2004).

Antioxidantes

Desta forma a prospecção por novos e seguros antioxidantes de fontes naturais vem crescendo, com intuito de prevenir o dano oxidativo às células vivas. A utilização de antioxidantes sintéticos vem diminuindo devido à atividade promotora de carcinogênese. Nos últimos anos, os antioxidantes dietéticos e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção, principalmente aqueles extraídos de plantas (LIMA et al., 2010; ZHENG & WANG 2001).

O estresse oxidativo proporciona danos a lipídeos, proteínas, DNA e organelas celulares, como mitocôndria, gerando alterações da estrutura e função celulares, que acarreta no desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas, neurológicas e envelhecimento precoce (LIMA et al., 2006). Substâncias antioxidantes são aquelas que retardam ou previnem de forma significativa a oxidação de lipídios ou outras moléculas que inibem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia (AL-MAMARY et al., 2002; MOREIRA et al., 2002; CHANWITHEESUK et al., 2005; WU et al., 2005; LIMA et al., 2006). Estas substâncias previnem e/ou reparam danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (CHANWITHEESUK et al., 2005). Os compostos flavonoides, tocoferol e ácidos fenólicos que apresentam núcleo fenólico, se destacam como oxidantes por atuarem como captadores eficientes de espécies reativas de oxigênio (EROs) e além de proporcionar a redução e quelação de íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (AL & MAMARY et al., 2002; NAHAR; SARKER, 2005; DELAZAR et al., 2006).

Atualmente, inúmeras plantas medicinais são consideradas importantes fontes para a extração de compostos com atividades antioxidante.

A cultura do sisal

Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm)

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) tem sua origem na região de Yucatan, no México, pertence à família Asparagaceae Juss e ao gênero *Agave*. Essa espécie é uma planta monocotiledônea com características bem peculiares. As folhas são pontiagudas com espinhos nas pontas, medindo cerca de 9 cm de largura e aproximadamente 1,5 metros de comprimento, quando a planta se torna adulta, em média com 8 anos, embora algumas espécimes possam chegar até 15 anos. Um dos aspectos inerentes do sisal é que emite apenas uma floração em todo ciclo de vida, morrendo logo em seguida (GOVERNO DA BAHIA, 2012).

Por ser uma planta semixerófita, o sisal necessita de clima quente e grande luminosidade, condições que encontrou na região do nordeste brasileiro para o estabelecimento e expansão do seu cultivo. Além disso, devido às características da planta em possuir folhas carnosas e suculentas, epiderme cutinizada e redução de estômatos, o sisal adaptou-se bem à região semiárida, onde encontrou condições favoráveis para o seu crescimento. Teve sua disseminação inicialmente no estado da Paraíba e só depois na Bahia (CNA, 2010).

Na Bahia, o Território do Sisal está localizado na Microrregião Nordeste do Estado e abrange os municípios de Araci, Barrocas, Biritinga, Candeal, Cansanção, Conceição do Coité, Ichu, Itiúba, Lamarão, Monte Santo, Nordestina, Queimadas, Quijingue, Retirolândia, Santaluz, São Domingos, Serrinha, Teofilândia, Tucano e Valente. A Microrregião Piemonte da Diamantina apresenta uma produção significativa de sisal. Nesta região, 92,8% das 29,5 mil propriedades rurais são familiares, cuja área média é de 23,73 ha. A outra Microrregião produtora de sisal é a de Paraguaçu, onde existem nove municípios com plantio significativo desta cultura (CONSOLI, 2009).

O sisal apresenta diversas aplicações, sendo que a fibra industrializada é utilizada na indústria automobilística e também na fabricação de cordas, barbante, cabos marítimos, tapetes, sacos, vassouras, estofamentos, e artesanato; além disso, tem utilização industrial na fabricação de pasta celulósica para produção do papel Kraft de alta resistência, e de outros tipos de

papel fino, como para cigarro, filtro, absorvente higiênico, fralda, etc (MARTINS, 2009).

É uma cultura importante para a região semiárida da Bahia, sendo base da agricultura familiar dos municípios da região, uma vez que gera renda pela venda local de produtos manufaturados e pela exportação da fibra natural. Contudo, nos últimos anos a cultura vem sofrendo um declínio em sua produtividade devido à podridão vermelha, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* (SOARES et al., 2006).

Podridão vermelha do sisal

A planta do sisal é considerada resistente à ação de fitopatógenos e insetos, em virtude da epiderme foliar possuir uma cutícula espessa e cerosa, conferindo uma barreira natural à penetração de micro-organismos patogênicos. No entanto, a planta pode ser afetada por doenças capazes de causar sérios prejuízos à cultura (SILVA, 2012; BOCK, 1965; MEDINA, 1954).

Até o presente momento no Brasil só foram relatadas duas doenças que afetam o sisal: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954) e a podridão vermelha do caule, capaz de provocar dano econômico à lavoura e apresenta o fungo *Aspergillus niger* como agente etiológico.

Varias são as denominações atribuídas a esta doença tais como: podridão do tronco do sisal, podridão vermelha do sisal, podridão do cepo, podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006). Lima et al. (1988) relataram que os campos de sisal brasileiros têm diminuído sua produtividade desde a década de 1970 devido a podridão vermelha e têm atingido níveis críticos a partir de 1998.

As plantas afetadas por essa doença inviabilizam as folhas para desfibramento, sendo que em plantas com estágios avançados da doença, as folhas tornam-se amareladas e o caule completamente apodrecido, levando a morte e tombamento da planta (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; COUTINHO, 2006b; ABREU, 2010).

Abreu (2010), verificou em seus estudos que a podridão vermelha do

sisal vem avançando nos cultivos Baianos, com incidências médias variando entre 5 e 40%. Observou-se nesse mesmo trabalho a presença da doença em todos os municípios produtores de sisal na Bahia.

Agente etiológico

Aspergillus niger Van Tieghem é um fungo filamentosos, pertencente à ordem Eurotiales, Família Tricomaceae e Filo Ascomycota (DEEPAKE, 2009). O mesmo foi identificado como o agente etiológico da podridão vermelha do sisal nos estados da Paraíba e Bahia (COUTINHO et al., 2006a; SOARES et al., 2006).

O crescimento *A. niger* está dentro de uma faixa de temperatura de 6 a 47 °C, sendo considerado como intervalo ótimo, a temperatura entre 35 e 37 °C, e na faixa de pH entre 1,4 e 9,8 (SCHUSTER, 2002). Adaptabilidade do *A. niger* a diferentes temperaturas e pH, além da produção de conidiósporos e sua dispersão pelo ar, viabiliza o crescimento do fungo em diversos ambientes terrestres (DEEPAKE, 2009).

Muitas espécies são encontradas na natureza, vivendo de forma saprófita causado podridão em órgãos vegetais, a exemplo de sementes armazenadas em condições de elevada umidade (FELIX, 2007).

Estudos *in vitro* realizados por Aguiar et al. (2008) apontam o *A. niger* como produtor de celulases, sob condições controladas, apresentando atividade celulolítica em condições de pH 5,0 e temperatura de 50°C. De acordo com Boaventura et al. (2004) pesquisas estão sendo desenvolvidas com este microrganismo para degradação de resíduos poluentes deixados no ambiente.

Segundo Moraes et al. (1997) o *A. niger* causa podridão do colo no amendoim, e no sisal a podridão vermelha do caule e lesões na folha (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SÁ, 2009).

O patógeno da podridão vermelha do sisal não penetra em tecidos intactos do hospedeiro, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica (WALLACE et al., 1952; LOCK, 1962; LIMA et al., 1998; COUTINHO, 2006b; SÁ, 2009).

Atualmente no mercado não se tem registro de um produto para o controle do agente etiológico da podridão vermelha do sisal. Entretanto a utilização de extratos vegetais para o controle do *A. niger* mostra-se uma ferramenta viável e promissora.

Extratos vegetais

A biodiversidade oferecida pelo bioma caatinga no nordeste brasileiro apresenta um grande potencial a prospecção de substâncias bioativas para a geração de métodos alternativos para controle de pragas e doenças. A exploração da atividade biológica de metabólitos e compostos secundários existentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais constitui-se, juntamente com a indução de resistência a fitopatógenos, em uma potencial forma de controle alternativo de doenças em plantas. Inúmeros são os compostos secundários existentes em plantas medicinais já isolados e com estrutura química conhecida. Compostos que pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcaloides, terpenos, ligninas, flavonoides, cumarinas, benzenoides, quinonas, xantonas, lactonas e esteroides, entre outras (DI STASI, 1996).

Poucos estudos foram realizados associando o efeito antifúngico de extratos vegetais ao agente causal da podridão vermelha do sisal, o fungo *A. niger*. Embora já existam relatos de estudos com este fungo e avaliação de extratos de pata de vaca (*Bauhinia forficata*), orégano (*Origanum vulgare*), boldo (*Peumus boldus*), sabugueiro (*Sambucus lanceolata*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) para o seu controle (SOUZA & SOARES, 2009a; SOUZA & SOARES, 2009b; SOUZA & SOARES, 2009c; SOUZA & SOARES, 2009d, SOUZA 2010, PEREIRA et al. 2013).

Em virtude dos problemas de contaminação do meio ambiente, animais e o homem, e resistência a pragas, existe a necessidade de diminuir a dependência por agrotóxicos na agricultura. A utilização em larga escala de produtos agrotóxicos tem gerado uma enorme demanda por trabalhos de pesquisa visando o desenvolvimento de métodos alternativos de controle fitossanitário, adotando uma nova visão de agricultura que trata a natureza como um sistema vivo que reage a toda e qualquer interferência que altere a

sua estrutura e funções (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2009). Tendo em vista a sustentabilidade ambiental, a utilização de extratos vegetais no controle de fitopatógenos tem recebido destaque, pela abundância dos recursos vegetais brasileiros e pelo fácil acesso ao produtor rural (DEQUECH et al., 2008).

A experiência da cultura popular com o uso de plantas medicinais e a facilidade de cultivar e encontrar espécies vegetais com propriedades fitoterápicas tem incentivado esses estudos. A agricultura sustentável ou alternativa é definida como agricultura que racionalmente usufrui de recursos naturais, visando garantir a sobrevivência das gerações presentes e futuras, abrange a utilização de compostos presentes nas plantas e que são resultantes do metabolismo primário e secundário (CRUZ et al., 2000). Dentre esses métodos alternativos, o uso de extratos de plantas medicinais mostra-se uma alternativa viável no âmbito econômico e ambiental (RODRIGUES et al., 2006).

Segundo Purkayastha (1995), as plantas apresentam grande potencial a ser estudado para o desenvolvimento de produtos naturais biologicamente ativos, e grande diversidade quanto à estrutura e propriedades físico-químicas de seus componentes biológicos. Extratos de plantas mostraram-se eficientes na inibição do crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo fungos, leveduras, bactérias e parasitas. Aproximadamente 75% dos 121 fármacos mais utilizadas são provenientes de informações de populações tradicionais. A literatura tem registrado a eficiência de extratos, obtidos de um grande número de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (WILSON et al., 1997; KURITA et al., 1981).

Trabalhos desenvolvidos com extratos aquosos de plantas do bioma Caatinga no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB demonstraram atividade antifúngica contra ao *A. niger*. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica bem como quantificar fenóis totais do extrato hidroalcoólico de folhas de juá, e avaliar o potencial biotecnológico de controle contra o *A. niger* e a podridão vermelha do sisal.

No primeiro capítulo avaliou-se o teor de fenóis totais, atividade antioxidante e antibacteriana do extrato hidroalcoólico de folhas de juá e das frações hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. Na avaliação da

atividade antibacteriana *in vitro* foram testadas as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*.

No segundo capítulo avaliou-se o extrato hidroalcoólico e as frações hexânicas, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila e sulfato de cobre contra *A. niger*, no crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos em laboratório. Realizou-se também a avaliação *in vivo* do extrato aquoso e métodos de aplicação do extrato no controle da podridão vermelha em mudas de sisal no campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

AGUIAR, C. M., MARGONAR, M. H. L., DE LUCENA, S. L.. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da Temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos. In: **XVI Encontro de Química da Região Sul (16SBQSul) FURB**, Resumos... 13 a 15 de novembro de 2008. p. 1 - 6.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; Melo, J. G.; Santos, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal Ethnopharmacol.** 2007; 114:325–54.

AI-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutricion Research.** V. 22, p. 1041-1047, 2002.

BARROS, P. N. **Potencial dos extratos de plantas da caatinga com atividade antifúngica e indutora de resistência.**, 59 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

BOAVENTURA, M. A. A. D., LOPES, R. F.A.P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: the biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology.** V.35, n.4, p.345-347, 2004.

BOCK, K. R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna: **EMBRAPA Meio Ambiente**, p. 279, 2003.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**. V. 92, p. 491-497, 2005.

CNA. **Sisal**: problemas e soluções. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25/01/2014.

CONSOLI, M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva**. Ribeirão Preto, p.119, 2009.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, Embrapa, 2006.

CROTEAU R., Kutchan T. M., Lewis N. G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. **American Society of Plant Biologists**: Rockville, MD, USA, p.1250-318, 2000.

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**. v. 19, 2009.

DELAZAR, A. ; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.16, p. 286-290, 2006.

DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C. G.; EGEWARTH, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v.21, n.1, p. 41-46, 2008.

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In:(Ed.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudos Multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. P.109-127, 1996b

FELIX, A. A. A. **Identificação e desenvolvimento de técnica alternativa de controle de fungos em sementes utilizadas no artesanato**. 2007. f, 88. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília, 2007.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GOVERNO DA BAHIA. Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Cultura – sisal. Salvador: **SEAGRI**, 1996. Disponível em: < <http://www.seagri.ba.gov.br/Sisal.htm> >. Acesso em: 23 Jan. 2014.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. London: Academic Press. 1988.

KATO, E. T. M.; OHARA, M. T.; NISHITAMI, M. **Evaluation of antimicrobial property of *Ziziphus joazeiro* Martius**. Lecta-USF, v.16, n.2, p.75-85, 1998.

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

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, S. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Quim. Nova**, V. 33, No. 1, p. 20-24, 2010.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; FILHO, P. R. S.; GOUVÊA, C. M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V.16, p. 531-536, 2006.

LORENZI H, MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

LIMA, E. F.; MOREIRA, J. de A. N.; BATISTA, F. A. S.; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO, A. E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LOCK, G. W. **Sisal**. London, Spottiswoode, Ballantyne. p. 355, 1962.

MARTINS, A. R. et al. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, São Carlos, v. 19, n. 1, 2009.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola. p. 286, 1954.

MELO, M. S. F.; ROCHA, C. Q.; SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 2, p. 43-51, ago./dez. 2012.

MORAES, S. A.; GODOY, I. J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**, Ed. UFV: Viçosa, Minas Gerais, p.1-43, 1997.

MOREIRA, D. L.; ENGELHARDT, R; L.; REIS, A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. V. 12(Supl.), p. 124-125, 2002.

NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. V.15, p. 279-282, 2005.

OLIVEIRA, A. F.; MEIRELLES S. T.; SALATINO A. **Ann. Brazilian Academy of Sciences**. v.75, 2003.

OLIVEIRA, A. F. M.; SALATINO A. Zeitschrift fur Naturforschung C-A **J. Bioscience**., v.55, 2000

PEREIRA, J. M.; SILVA, R. M.; DAMASCENO, C. L.; SOARES, A.C. F.; LIMA, F. C. Controle in vitro de *aspergillus niger* com água de fumo. Encontro de Biologia da UNEB Campus VII (2: 2013: Senhor do Bonfim) I Simpósio Micológico do Semiárido: Micologia no Nordeste: estudos e experiências. Senhor do Bonfim,. **Anais...** 2013.p 14.

PETERS R. J.; CROTEAU R. B. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. In: Christou P., Klee H. (eds) Handbook of **Plant Biotechnology**. John Wiley & Sons Ltd, p. 609-627, 2004.

PURKAYASTHA, R. P. (Ed.). **Hand book of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, 1995, p.1-39.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.123-127, 2006.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 65 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009a.

SÁ, J. O. de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009b.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; AND VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 59, p 426– 435, 2002.

SEIGLER D. S. Plant Secondary Metabolism. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**. 1998.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 98 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

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 pseudocaule do sisal. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Salvador, Anais... BA. 2006.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Utilização de extrato aquoso de sabugueiro (*Sambucus nigra*) para inibição in vitro de *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. **Anais...** 2009a.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F.; SILVA, F. Atividade in vitro do extrato aquoso de boldo (*Peumus boldus*) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: III Seminário de Pesquisa do Recôncavo da Bahia (III SPRB), III Seminário Estudantil de Pesquisa (III SEP) e III Seminário de Pós Graduação (III SPG), Cruz das Almas. Anais... 2009b.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: **I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA)**. Salvador. Anais... p.14-15, 2009c.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Avaliação in vitro da atividade do extrato aquoso de pata-de-vaca (*Bauhinia variegata* L.) sobre *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha em sisal (*Agave sisalana* L.). In: **I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada (ERMA)**. Salvador. Anais... p.16-17, 2009d.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro**. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2004.

VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativo aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**, 2005 72 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. p. 72, 2005.

WALLACE, M. M.; DIECKMAHNS, E.C. Bole rot of sisal. **The East African Agricultural Journal**, v.18, n.1, p.24-29, 1952.

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**, v.81, p.204-210, 1997.

WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S.Y.; SHYUR, L.F.; KUO, Y.H.; CHANG, S.T. Phenolic antioxidants from the heart wood of *Acacia confusa*. **Journal Agriculture Food Chemical**. V. 53, p. 5917-5921. 2005.

ZHENG, W.; WANG, S. Y.; **Journal Agriculture Food Chemical**. V. 49, p. 5165, 2001.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA E TEOR DE FENÓIS TOTAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* MART ¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial da Revista Brasileira de Plantas medicinais

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA E TEOR DE FENÓIS
TOTAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE
Ziziphus joazeiro MART**

Autores: Rafael Mota da Silva; Ana Cristina Fermino Soares; Karina Zanoti; Franceli Silva

RESUMO: O *Ziziphus joazeiro* Mart. é conhecido popularmente como juá. Esse vegetal é um dos representantes mais notáveis do bioma Caatinga. A espécie apresenta importância socioeconômica para a Região Nordeste do Brasil e é utilizada na medicina popular. O objetivo deste estudo foi quantificar os fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de *Z. joazeiro* Mart. A quantificação dos compostos fenólicos, foi realizada pelo método espectrofotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu. O extrato hidroalcoólico apresentou a maior quantidade de fenóis totais com 2.105,53 mg/EAT por grama de extrato. A maior atividade antioxidante, analisada pelo método DPPH, foi no extrato hidroalcoólico de folhas de juá com 74,03%. O estudo da atividade antibacteriana em meio TSA revelou que o extrato e as frações testadas não inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritite*, nas concentrações 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L.

Palavras-chave: bioma Caatinga, DPPH, Juá.

TOTAL PHENOLS, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT AND FRACTIONS OF *Ziziphus joazeiro* MART. LEAVES.

Authors: Rafael Mota da Silva; Ana Cristina Fermino Soares; Karina Zanoti; Franceli Silva

ABSTRACT: *Ziziphus joazeiro* Mart. is popularly known as juá. This plant is one of the most notable representatives of the biome Caatinga. It has social and economic importance for the Northeast Region of Brazil and is widely used in traditional medicine. The aim of this study was to quantify total phenols and to evaluate the antioxidant and antibacterial activity of the hydroalcoholic extract and fractions of leaves of *Z. joazeiro* Mart. Quantification of phenolic compounds was performed by the spectrophotometric method with Folin-Ciocalteu reagent. The hydroalcoholic extract presented the highest amount of total phenols, with 2105.53 mg / EAT per gram of extract. The highest antioxidant activity, analysed by DPPH method, was for the hydroalcoholic leaf extract of juá with 74.03%. The study of antibacterial activity on TSA medium showed that the extract and fractions tested did not inhibit growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *S. enteritidis*, at concentrations of 0.2, 0.4, and 0.8 mg / L.

Keywords: Caatinga, DPPH, juá.

INTRODUÇÃO

O juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae), conhecido também por juá ou laranjeira-do-vaqueiro é uma das espécies endêmicas do bioma caatinga. A medicina popular utiliza diferentes partes desta planta para o tratamento de dermatites, micoses, bronquite, ulcera gástricas, como expectorante, na fabricação de shampoo anticaspa, antiséptico bucal e creme dental, na alimentação animal, principalmente nos períodos de seca (MATOS 2000; LORENZI & MATOS 2002; CARVALHO 2007; CRUZ et al., 2007).

As folhas de juá apresentam na sua composição alcaloides, saponinas, esteroides triperpenos e taninos (MELO et al., 2012). Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI, 1995; NETO, 2013). Estes compostos compõem inúmeras classes, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos cinâmico e benzóico), estilbenos, flavonoides, cumarinas, taninos hidrolisáveis e condensados, ligninas e lignanas (NACZK & SHAHIDI; 2005). Os compostos fenólicos naturais têm recebido atenção especial, devido ao potencial *in vitro* de inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase (HASLAM, 1996).

Os radicais livres são produzidos constantemente pela atividade metabólica os quais reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, causando danos que auxiliam o envelhecimento e o aparecimento de doenças degenerativas, como câncer, artrite reumática e aterosclerose (MELO et al., 2006).

Gülcin et al. (2003), relatam que inúmeras substâncias naturais, advindas de plantas, caracterizam-se como captadoras de espécies reativas de oxigênio, auxiliando o corpo humano contra o efeito do mesmo, prevenindo o surgimento de doenças. As substâncias antioxidantes são aquelas que retardam ou previnem expressivamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação e/ou propagação da reação de oxidação em cadeia (LIMA et al., 2006).

Silva et al (2011), estudando a atividade antioxidante de folhas e cascas de *Z. joazeiro*, obtiveram os valores de CE₅₀ iguais a 461,88 e 1743,05 µg/mL,

respectivamente. Alviano et al. (2008) também observaram ação antioxidante no extrato aquoso da entrecasca de *Z. Joazeiro*.

A busca por substâncias bioativas presentes nas plantas, com ação antimicrobiana e antioxidante vem crescendo na atualidade em virtude do potencial biotecnológico das substâncias para a síntese de novas moléculas e a produção de novos fármacos. As substâncias bioativas produzidas por plantas podem ser utilizadas para a fabricação de novos medicamentos, ou mesmo como substitutos de compostos ativos sintéticos, a exemplo dos antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana (AHMAD & BEG, 2001; SCHERER, 2009). Ribeiro et al., (2013) identificaram a MIC de 12,5 µg/ml para *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella choleraesui* avaliando a atividade antibacteriana de saponinas de juá.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar os fenóis totais, avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de *Z. joazeiro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de juá (*Z. juazeiro* Mart.) foram coletadas na parte da manhã no mês de setembro de 2012, próximo a estrada 411, Km 0,4 no município de Conceição do Coité-Ba (latitude: 11° 33' 41" S e longitude: 39° 16' 58" W). Uma exsicata foi obtida e depositada no herbário da Universidade Federal Recôncavo da Bahia sob o número de registro (HURB 6869). A identificação botânica da espécie foi realizada pelo professora Lidyanne Yurico Saleme Aona.

Preparo do extrato vegetal e frações

As folhas de juá foram lavadas em água corrente e secas em estufa de ventilação forçada, a 45° C, aferindo-se o peso em intervalos regulares de 24 horas, até atingir peso constante. As folhas secas foram preparadas para

obtenção do extrato hidroalcoólico pelo processo de maceração (SONAGLIO et al, 2004). Em seguida foram colocadas em frascos de vidro com capacidade para 1L, submersas com solução de etanol e água (1:1 v/v) e mantidas em repouso por 72h, a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$), protegido da luz. Repetiu-se a metodologia de extração três vezes até esgotamento.

O extrato líquido obtido foi filtrado em papel filtro e em seguida concentrado em rota evaporador sob pressão reduzida com temperatura de 38°C e armazenado em frascos protegidos da luz, sob refrigeração 5°C .

Após a concentração, o extrato hidroalcoólico bruto (EHA), diluído em água destilada, foi fracionado por partição líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, de acordo com metodologia de Braga, (2008), obtendo-se as frações hexano (FH), diclorometano (FD), clorofórmio (FC), acetato de etila (FAC) e aquosa (Faq) (figura 1). Os solventes utilizados foram extraídos em rota evaporador.

Determinação do conteúdo fenólico

Para quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizado o método espectrofotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu (SINGH et al, 2002). Fez-se uma solução aquosa (1:10) de Folin-Ciocalteu e uma solução aquosa de Carbonato de sódio a 7.5%. Em seguida foram pesadas alíquotas de 4.0 mg de cada amostra seca, que foram diluídos em 2.0 mL da solução de Folin-Ciocalteu (1:10) e 1.6 mL da solução de Carbonato de sódio 7.5% e deixado em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Após essa etapa, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 765 nm, utilizando cubetas de quartzo, sendo o branco constituído pela mistura dos reagentes sem as amostras. Para quantificação, construiu-se uma curva de calibração com padrão de ácido tânico com concentrações variando de $10\mu\text{g/mL}$ até $80\mu\text{g/mL}$ e os resultados foram determinados por equivalência das absorbâncias do extrato fracionado com a absorbância do padrão de ácido tânico, sendo o processo de preparo, antes da leitura por espectrofotômetro, o mesmo utilizado para as amostras analisadas. A equação da curva de calibração obtida foi $y = 0,003 + 0,063x$, e o coeficiente de correlação $r^2 = 0.982$. As análises foram feitas com quatro repetições para cada amostra.

Os dados de quantificação dos compostos fenólicos totais correspondem à média de quatro repetições (n=4).

Todos os reagentes e solventes apresentavam qualidade grau espectrofotométrico.

Avaliação da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi utilizado o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), o princípio do teste baseado se baseia no seqüestro promovido pelos extratos estudados de acordo com a metodologia proposta por Singh et al, (2002). Preparou-se uma solução metanólica de DPPH 39,4µg/mL em balão volumétrico protegido da luz e sob refrigeração. Em seguida, fez-se a pesagem de 2,0 mg de cada amostra seca do extrato, sendo estas diluídas em 10,0 mL de metanol, resultando em soluções de 200 ppm dos extratos.

De cada solução de 200 ppm das amostras, foram retiradas alíquotas de 100 µL e adicionados 5,0 mL de solução metanólica de DPPH. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 517 nm, no tempo zero (t=0) e após 30 minutos (t=30), utilizando como branco o metanol e como controle apenas a solução de DPPH sem amostra (SINGH et al, 2002). A equação para análise da atividade antioxidante total foi a seguinte:

$$\%AA = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100}{Abs_{controle}}$$

Os dados referentes as determinações da atividade antioxidante correspondem à média de quatro repetições. Todos os reagentes e solventes utilizados eram analiticamente puros.

Atividade antibacteriana

O extrato hidroalcoólico e as frações de folhas de juá, nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL, foram avaliados frente aos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella enterentiti* IOC 10708, pertencentes a coleção de culturas

do Núcleo de Estudo em Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de difusão em disco de papel conforme descrito por Bauer et al. (1966). As bactérias utilizadas nos testes foram mantidas em meio Tryptic Soy Agar (TSA), a 5°C. Posteriormente, foi preparada uma suspensão das bactérias em solução salina estéril, a uma concentração de 1×10^5 UFC/mL, ajustada em espectrofotômetro pela densidade ótica, após terem sido repicadas com 24 horas.

As bactérias foram semeadas com uma alça de drigalsky em placas contendo meio TSA. Posteriormente os discos de papel filtro foram acondicionados e em seguida adicionou-se 5µl do extrato bruto e das frações nas concentrações 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL.

A avaliação do halo de inibição foi realizada com um paquímetro, após o período de 24 horas de incubação em B.O.D a temperaturas de 37°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compostos fenólicos

O extrato hidroalcoólico apresentou a maior quantidade de fenóis totais com 2.105,53 mg/EAT por grama de extrato, diferenciando-se estatisticamente das frações. As frações acetato de etila, clorofórmio e diclorometano não apresentaram diferença estatística entre si na avaliação de fenóis totais. No entanto, as mesmas diferiram das frações hexano e aquosa (Tabela 1).

TABELA 1: Compostos fenólicos e as frações de hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e aquosa do extrato hidroalcoólico de folhas de *Z. joazeiro*.

Amostras	(FT) mg EAT/g de extrato*
Extrato hidroalcoólico bruto	2.105,53 a
Fração acetato de etila	895,31 b
Fração clorofórmio	832,88 b

Fração diclorometano	794,73 b
Fração hexano	596,86 c
Fase aquosa	342,20 d

*Médias de compostos fenólicos totais (FT) expressas em mg equivalentes de ácido tânico (EAT) por grama das amostras analisadas. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Os valores de 596,86 mg EAT/g da fração hexano e 342,20 mg EAT/g da fração aquosa foram os menores resultados obtidos para fenóis totais e os mesmos apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 1).

Melo et al., (2012) relataram a presença de saponina, esteroide, taninos e triterpenos nas folhas de *Z. joazeiro*, o que explica os altos valores de fenóis totais encontrados no presente trabalho.

Os resultados deste trabalho foram superiores aos relatados por Lima et al (2006), com extrato hidroalcoólico de folhas de bananeira e as frações hexano e acetato de etila, com os seguintes valores, respectivamente, 7,88; 1,02 e 0,59 (m/m). Extratos etanólicos de orégano seco e manjerição *in natura* apresentaram 147,96 mg g⁻¹ e 56,55 mg g⁻¹ de compostos fenólicos totais, respectivamente (PITARO, 2011).

Atividade antioxidante

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH verificou-se que o extrato hidroalcoólico de folhas de juá apresentou a maior atividade antioxidante dentre os tratamentos avaliados, com 74,03%. As frações acetato de etila, clorofórmio e diclorometano não apresentaram diferença entre si, com valores de 57,31; 53,27e 49,19% de atividade antioxidante. As menores percentagens de atividade antioxidante foram obtidas nas frações hexano e aquosa, com 19,37 e 11,02%, sem diferença estatística entre estas, porém diferindo das demais (Tabela 2).

Estes resultados indicam o potencial desta espécie do bioma Caatinga, quando comparados com trabalhos com outras espécies na literatura. Pitaro

(2011) observou os percentuais de atividade antioxidante dos extratos etanólicos de manjeriço *in natura* e orégano seco os valores de 35,63 e 48,42% respectivamente. Silva et al., (2011), encontrou os valores de CE₅₀ iguais a 461,88 e 1743,05 µg/mL, respectivamente, para extratos de folhas e cascas de juá (*Z. Joazeiro*), na avaliação antioxidante. A atividade antioxidante do extrato etanólico da entrecasca de juá apresentou CE₅₀ de 821.4 µg/mL (ALVIANO et al., 2008).

Basile et al., (2005), relataram que a atividade antioxidante de compostos fenólicos ocorre devido as reações de oxidoredução que atuam de forma essencial na adsorção ou neutralização de radicais livres.

A avaliação pelo método DPPH demonstrou que o extrato hidroalcoólico e as frações apresentaram atividade antioxidante, com maior atividade para o extrato bruto, quando comparada aos demais tratamentos. Já na avaliação entre as frações, o acetato de etila, clorofórmio e diclorometano foram superiores na atividade antioxidante em relação à fração hexano e aquosa.

De acordo Namiki (1990), os principais e mais conhecidos antioxidantes sintéticos são o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e tercbutilhidroquinona (TBHQ).

Os valores obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato e frações de folhas de juá mostraram-se promissores quando comparado ao valor do BHA, antioxidante sintético. Fonseca (2013), avaliando atividade antioxidante do BHA pelo método DPPAH encontrou um valor de 34,44%. Sendo que o extrato hidroalcoólico e as frações acetato de etila, clorofórmio e diclorometano obtiveram valores superiores (tabela 2).

TABELA 2: Efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de *Z. joazeiro* Mart. e as frações de hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e fase aquosa, obtidas pelo método de DPPH.

Extratos	Atividade (%)
Extrato hidroalcoólico bruto	74,03 a
Fração acetato de etila	57,31b
Fração clorofórmio	53,27 b

Fração diclorometano	49,19b
Fração hexano	19,37c
Fase aquosa	11,02 c

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

O presente trabalho evidenciou uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. De acordo com Lima (2012), quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos, maiores serão as percentagens da atividade antioxidante. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é influenciada por inúmeros fatores, como, sistema oxidante, grau de glicosilação e coeficiente de partição (HASSIMATTO et al., 2005).

Atividade antibacteriana

O extrato hidroalcoólico bruto de folhas de juá e as frações de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, em todas as concentrações, não causaram a formação de halo de inibição no crescimento das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteretite*, em meio TSA, indicando não ocorrer inibição do crescimento bactérias nas concentrações 0,2, 0,4 e 0,8 mg/ml do extrato e frações (tabela 1).

Tabela 1. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de folhas de *Z. joazeiro* Mart. e as frações de hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e aquosa, obtidas pelo teste do halo de inibição (diâmetro em mm).

Tratamentos	Concentração*	Microorganismos		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteretite</i>
Extrato Bruto	0,2	0	0	0
	0,4	0	0	0
	0,8	0	0	0
Fração Aquosa	0,2	0	0	0
	0,4	0	0	0
	0,8	0	0	0
Fração Hexano	0,2	0	0	0
	0,4	0	0	0

	0,8	0	0	0
	0,2	0	0	0
Fração Clorofórmio	0,4	0	0	0
	0,8	0	0	0
	0,2	0	0	0
Fração Diclorometano	0,4	0	0	0
	0,8	0	0	0
	0,2	0	0	0
Fração Acetato de etila	0,4	0	0	0
	0,8	0	0	0

*concentração em mg/ml

O extrato hidroetanólico de folhas de juá (50 mg/ml) (Melo et al., 2012) e de folhas e casca (1mg/ml) de juá (Silva et al., 2011) não inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

Os resultados não eficazes de atividade antibacteriana neste estudo podem estar relacionados às concentrações utilizadas. Os taninos (SANCHES et al., 2005) e as saponinas (Taiz e Zeiger, 1991) apresentam potencial inibitório sobre bactérias. O juá apresenta taninos e saponinas nas folhas (MELO et al., 2012). Alviano et al. (2008) estudando o potencial do extrato aquoso de juá na atividade antibacteriana obtiveram a dose mínima inibitória (MIC) entre 1 e 16 mg/mL contra cinco bactérias da microbiota oral. Ribeiro et al., (2013) avaliaram a atividade antibacteriana de saponinas de juá e determinaram a MIC de 12,5 µg/ml contra *E. coli* e *S. aureus*.

Conclusão

A folha de juá apresentou potencial como fonte de compostos fenólicos. O extrato bruto e frações apresentaram atividade antioxidante. Entretanto, nas concentrações 0,2, 0,4 e 0,8 mg/ml, os compostos testados não apresentaram atividade antibacteriana. Este estudo indica que mais estudos são necessários para comprovar as atividades biológicas descritas, o que poderá indicar a potencial aplicação biotecnológica destes extratos para a formulação de fármacos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) e ao CNPq pelo apoio financeiro. Agradecem a Dra. Norma Barreto, do Núcleo de Pesca e Aquicultura (NEPA) da UFRB, pelas cepas bacterianas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi- drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.113-23, 2001.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D, S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO C, FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. G.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, V.53, p.545-52, 2008

SILVA, T. C. L.; ALMEIDA, C. C. B. R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AMORIM, E. L. C.; COSTA, E. P.; ARAÚJO, J. M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.2, p.193-199, 2011

BAUER A.W, KYRBY W.N.M, SERRIS J.C, TURCK M. A.M. **J. Clinic. Pathology**. v. 45, p.493, 1966.

BASILE, A.; FERRARA, D. E. L.; POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidante activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.32-36, 2005.

FONSECA, K. Z. compostos fenólicos, atividade antioxidante e antifúngica de extratos de *Vitis labrusca* L. var. *Isabel* (Vitaceae). 2013. 74f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, 95, v.1054, p.95-111, 2004.

BRAGA, T. V. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. *Jarvis subsp verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. 2008. 175p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto.

CARVALHO, P. E. R. 2007. Juazeiro - *Ziziphus joazeiro*. <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/cirtec/edicoes/Circular139.pdf> (acesso em 28/01/202014).

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, J. R.; AM, MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. **Journal Ethnopharmacology**, v.111, p. 409, 2007.

GÜLCIN, I OKTAY M, KIRECCI E, KÜFREVIÖGLU O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinellaanisun* L) seed extracts. **Food Chemical** v.83, p.371-382, 2003

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.2928-35, 2005.

HASLAM. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J Nat Prod.**, v. 59, p. 205-215, 1996.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.16, p.531, 2006.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.14, n.2, p.321-326, 2012.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; FILHO, P. R. S.; GOUVÊA, C. M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V.16, p. 531-536, 2006.

LORENZI, H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais. Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza, UFC. 2000. 346 p.

MELO, M. S. F.; ROCHA, C. Q.; SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* Mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.10, n.2, p.43-51, ago./dez. 2012.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R.J. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**.v.26, p.639, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. 2005. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**: p.95-111, 2004.

NAMIKI, M. Revista Food Science and Nutrition. v.29, p.273, 1990.

NETO, F. B. O.; MORAIS, N. R. L.; XAVIER, A. R. F.; BRILHANTE, S. E. T.; ALVES, L. A. Avaliação do teor de fenóis totais dos extratos de *Annona crassiflora* (Araticum). Congresso de iniciação científica de IFRN pag. p.0562, 2013.

PITARO, S. P.; FIORANI, L. V.; JORGE, N. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.686-691, 2012

RIBEIRO, B. D. et al. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical**. v.436, p.736-743, 2013.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. de. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T.; Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SILVA, T.C.L; ALMEIDA, C.C.B.R; VERAS FILHO, J; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S; AMORIM, E.L.C; COSTA, E.P.; ARAÚJO, J.M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32(2), p.193-199, 2011

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.50, n.1, p. 81-86, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p.289-326.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**. p.331, 1995.

CAPÍTULO 2

CONTROLE DE *Aspergillus niger* E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES EXTRAIDAS DE FOLHAS DE JUÁ (*Zeziphus juazeiro* Mart).

CONTROLE DE *Aspergillus niger* E DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE JUÁ (*Zeziphus juazeiro* Mart).

Autores: Rafael Mota da Silva; Ana Cristina Fermino Soares; Karina Zanoti;

RESUMO: O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta com significativa importância socioeconômica na região sisaleira do semiárido Baiano, responsável pela geração de emprego e renda na região. O cultivo de sisal vem sendo afetado pela podridão vermelha do caule, causada por *Aspergillus niger*. A utilização de extratos vegetais pode ser uma estratégia promissora no controle desta doença, com destaque para as espécies do bioma caatinga, a exemplo do juá que apresenta atividade antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o extrato de folhas de juá e suas frações no controle de *A. niger*, por meio de bioensaios em meio de cultura e no controle da podridão vermelha do sisal em mudas de sisal plantadas no campo, na região sisaleira da Bahia. A fração aquosa e o extrato hidroalcoólico de folhas de juá, na concentração de 400mg/L, promoveram a inibição de 59,4% e 56,2% no crescimento micelial de *A. niger*. As concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/L da fração aquosa foram as mais eficientes na redução da esporulação. Todos os tratamentos e concentrações testadas causaram inibição na germinação de esporos de *A. niger*, exceto a concentração de 400 mg/L do extrato hidroalcoólico, que estimulou a esporulação do fungo. O extrato a 75%, aplicado pelo método de pulverização, e o extrato a 50%, aplicado pelo método de irrigação, promoveram a redução da severidade da doença em 74,12% e 72,16% respectivamente, com incidência da podridão vermelha de 17,65%, em ambos os tratamentos, comparado ao controle com 60% de incidência da doença. O extrato de folhas de juá apresenta potencial para o controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chaves: atividade antifúngica; extratos vegetais; *Agave sisalana*; alternative disease control.

CONTROL of *Aspergillus niger* and SISAL RED ROT STEM DISEASE WITH LEAF EXTRACT OF JUA (*Zeziphus juazeiro* Mart).

Authors: Rafael Mota da Silva; Ana Cristina Fermino Soares; Karina Zanoti;

ABSTRACT: Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) is a crop with significant social and economic importance for the semiarid region of Bahia State, Brazil, because it generates employment and income in this region. Sisal plantations have been affected by the red rot stem disease, caused by *Aspergillus niger*. The use of plant extracts can be a promising strategy for controlling this disease, especially of plants from the biome of Caatinga, such as juá that have antifungal activity. This work aimed to study juá leaf extract and fractions for controlling *A. niger* in bioassays with culture media, and sisal red rot stem disease in plants cultivated in the field, in the semi-arid region of Bahia State, Brazil. The aqueous fraction and the alcoholic extract of juá leaves, at a concentration of 400mg/L, promoted 59.4 % and 56.2 % inhibition of mycelium growth of *A. niger*. The concentrations of 25, 50, 100, and 200 mg/L of the aqueous fraction were the most effective in reducing sporulation of *A. niger* sporulation. All treatments and concentrations tested inhibited *A. niger* spore germination, except concentration of 400 mg/L of the aqueous extract, which stimulated sporulation of this fungus. The aqueous extract of Juá at 75%, applied to plants by pulverization, and at 50% applied through irrigation promoted the best results with 74.12% and 72.16% reduction in disease severity, respectively. For both treatments, incidence of sisal red rot stem disease in plants was of 17.65%, while the incidence in the control treatment was of 60%. Leaf extract of juá presents antifungal activity and a potential for controlling sisal red rot stem disease.

Key words: antifungal activity; plant extracts; *Agave sisalana*; alternative disease control

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) desempenha importante papel sócio econômico no semiárido baiano, com uma área plantada de 265.089 hectares e 240.322 toneladas colhidas, correspondendo a 96% da produção nacional (IBGE 2012). O Brasil é líder no mercado internacional de fibra de sisal, respondendo por 47% das exportações da fibra em 2009 (SECEX, 2009). A principal utilização do sisal consiste na extração das fibras contidas em suas folhas, dando origem à principal fibra dura produzida no mundo (EMBRAPA, 2003). Utilizada na fabricação de cordas, tapetes, artesanatos entre outros (PIZARRO et al., 1999) e é essencialmente destinada à exportação, sendo os Estados Unidos, China, México e Portugal os principais importadores (SECEX, 2009).

As condições climáticas no semiárido da Bahia são desfavoráveis a exploração de outras culturas de importância econômica e o sisal se destaca como a principal atividade agrícola, juntamente com culturas de subsistência como mandioca, milho e feijão. No estado da Bahia, o sisal é cultivado em 75 municípios e estima-se que esta cadeia produtiva empregue, direta e indiretamente, 700.000 pessoas em todo o estado (CONSOLI, 2009).

Entretanto, esta cultura vem sofrendo um declínio em sua produção e área plantada devido a vários fatores, dentre os quais, destaca-se a podridão vermelha do sisal, doença que está ameaçando a cultura na região (ABREU, 2010; COUTINHO et al, 2006).

O agente etiológico da podridão vermelha do sisal é o *Aspergillus niger*, um fungo saprófita e cosmopolita (MORAES et al., 1997; SILVA, 2012a; SILVA, 2012b;). As principais características desta doença são a murcha e amarelecimento folhas, descoloração avermelhada dos tecidos internos do caule e base das folhas, podridão do caule, morte e tombamento da planta (COUTINHO et al., 2006).

Não existem produtos químicos registrados para o controle desta doença, que se encontra disseminada pelos plantios de sisal, com incidências variando entre 5 e 65% (ABREU, 2010). Estratégias para o controle biológico com espécies de *Trichoderma* e actinobactérias vem sendo estudadas,

considerando a dificuldade de controle de patógenos que sobrevivem no solo e que são de distribuição cosmopolita, como o *A. niger*, mas ainda não existem produtos biológicos registrados para o controle.

Faz-se necessário o desenvolvimento de métodos e tecnologias de manejo da podridão vermelha e da cultura do sisal para garantir a sustentabilidade e expansão desta cultura no semiárido baiano.

A utilização de extratos vegetais no controle de doenças vem se popularizando, em virtude do potencial dos princípios ativos de diversas espécies vegetais e a busca por alternativas mais sustentáveis de produção agrícola. São diversos os estudos sobre a atividade antifúngica de extratos vegetais contra o agente causal da podridão vermelha do sisal, nos quais podemos destacar o extrato de nim (ALMEIDA et al, 2009), extrato de alho (SANTOS et al, 2010), extrato de orégano (KOCIC-TANACKOV et al. 2012) e extrato de margaridão (*Tithonia diversifolia*) (LINTHOINGAMBI, 2013).

A flora da região semiárida brasileira apresenta um grande potencial para a prospecção de princípios ativos e o desenvolvimento de bioprodutos para controle de pragas e doenças, em virtude da diversidade presente no bioma caatinga.

O juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.), pertencente à família Rhamnaceae, sendo conhecido popularmente por juazeiro, juá ou laranjeira-do-vaqueiro, é uma das espécies vegetais mais notáveis do bioma Caatinga (LORENZI & MATOS, 2002). É uma planta resistente à seca, de crescimento lento, com importância socioeconômica para a região Nordeste, por apresentar ampla utilização popular de todas as suas partes, caule, casca, folha, fruto e raiz, devido às propriedades medicinais.

Segundo Albuquerque et al (2007), a planta inteira apresenta inúmeros usos medicinais tais como: antisséptico bucal, contra problemas dermatológico (caspa, sarna, dermatite, e coceiras), problemas do sistema respiratório (asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquites, inflamação de garganta e gripe) e do sistema digestório (constipação, estomatite, úlceras gástricas e má-digestão). As folhas e o córtex do caule são ricos em saponinas, sendo utilizadas pela indústria para fabricação de shampoo anticaspa e tônico capilar (KATO, 1998). As suas propriedades e ações são: analgésica, antifúngica, anti-inflamatória, antibacteriana, febrífuga e cicatrizante. Dentre os seus principais

constituintes destacam-se os fenóis, taninos, alcaloides, triterpenos, quinonas, amfibina D e jujubogenina (OLIVEIRA & SALATINO 2000).

Por ser uma planta encontrada com frequência na região semiárida da Bahia e nos plantios de sisal, e que apresenta atividade antifúngica, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes extratos de folhas de juá no controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal.

Material e métodos

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de juá (*Z. juazeiro* Mart.) foram coletadas numa propriedade rural a beira da estrada Ba 411 KM 0,4, no município de Conceição do Coité, Bahia (latitude: 11° 33' 41" S e longitude: 39° 16' 58" W), no mês de setembro de 2012, no período da manhã. A exsicata foi confeccionada e identificada pela professora Lidyanne Yurico Saleme Aona, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas, Bahia, e depositada no Herbário do Recôncavo da Bahia desta universidade (HURB 6869).

Processo de secagem

As folhas de juá foram lavadas em água corrente, colocadas na superfície de papel absorvente para retirar o excesso de água, transferidas para sacos de papel pardo com capacidade para 2 kg e colocadas em estufa de ventilação forçada (TECNAL, modelo TE- 394/3) à 45°C, até obtenção de peso constante.

Preparo e fracionamento do extrato hidroalcolico (EHA) de *Z. juazeiro* Mart.

As folhas secas foram imersas em solução de etanol e água na proporção de 1:1 por um período de 72 horas. Esse procedimento foi repetido três vezes para extração exaustiva do material vegetal. Após esse período

filtrou-se o extrato em papel filtro. Em seguida foi retirado o solvente em evaporador rotatório (QUIMIS Q344B1) à 45°C e pressão reduzida.

O extrato hidroalcolico (EHA) das folhas de *Z. joazeiro* Mart. foi fracionado através de partição líquido-líquido. O EHA foi dissolvido em água destilada. Posteriormente, com a fase aquosa iniciou-se a partição utilizando os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, formando respectivamente as frações FH, FD, FC, FA e Faq, propiciando a separação das substâncias de acordo as diferentes polaridades, conforme metodologia de Braga, (2008).

Após a obtenção das frações, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. Os extratos foram esterilizados por filtração, em membrana de nitrocelulose (Millipore) com porosidade de 0,2 µm.

Avaliação *in vitro* das frações do extrato hidroalcolico de juá sobre o crescimento micelial

As avaliações foram realizadas por meio da determinação do potencial de inibição do crescimento micelial e da esporulação de *A. niger*, em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar). Para a avaliação do efeito dos extratos no crescimento micelial de *A. niger*, o extrato foi esterilizado, conforme descrito acima, e adicionado ao meio de cultura BDA, após a esterilização do meio em autoclave, quando este apresentava a temperatura próxima ao ponto de solidificação, acrescentando-se também, 1ml/L de Tormicina® (oxitetraciclina 100 mg/mL). Em seguida, o meio de cultura foi agitado manualmente com movimentos rotativos do frasco e foram vertidos 15 ml de meio por placa de Petri. Vinte e quatro horas após a solidificação do meio, fez-se a transferência de discos de micélio da borda de culturas de *A. niger* com 7 dias de crescidas para o centro de placas de Petri com meio de cultura BDA contendo as diferentes concentrações de 25mg, 50mg, 100mg, 200mg e 400mg (mg/L) dos tratamentos EHA e frações FH, FD, FC, FA e Faq do extrato de folhas de juá. As placas foram incubadas a temperatura de 28± 2 °C e as culturas foram avaliadas a cada 24 horas, por meio da medição do diâmetro da colônia com uma régua milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos, até a colônia de um dos tratamentos atingir as bordas da placa. Para a avaliação da

esporulação, foram adicionados 20 mL de água esterilizada e uma gota de Tween 20® às placas contendo as culturas de *A. niger* do bioensaio anterior, logo após a finalização das avaliações do crescimento micelial. Em seguida, as colônias foram raspadas com uma Alça de Drigalsky, para obtenção da suspensão de esporos. A contagem de esporos de *A. niger* dessa suspensão foi feita em câmara de Neubauer, com microscópio ótico em aumento de 40X, e a concentração foi calculada para o volume de 20 mL de água, adicionados à placa com a cultura para a raspagem dos esporos, e também foi calculado por cm² de colônia, utilizando os dados da medição do diâmetro da colônia.

Os tratamentos consistiram do EHA, FH, FD, FC, FA, Faq e sulfato de cobre nas concentrações de 25mg, 50mg, 100mg, 200mg e 400mg (mg/L). O controle consistiu de meio BDA sem adição do extrato ou sulfato de cobre. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (7x5), combinando os fatores frações do extrato e concentrações, com dez repetições.

Avaliação das frações do extrato de juá na germinação de esporos de *A. niger*

O isolado de *A. niger* foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, com temperatura de 28,5 °C por 7 a 10 dias. Após o período de incubação, foram acrescentados 20 mL de água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20® em cada placa. Para obtenção da suspensão de esporos, as culturas de *A. niger* foram raspadas com uma Alça de Drigalsky e a contagem dos esporos foi feita em câmara de Neubauer, com microscópio ótico com aumento de 40X. A concentração da suspensão de esporos foi ajustada com adição de água destilada esterilizada, até atingir a concentração 10⁷ conídios mL⁻¹.

Para avaliar a inibição da germinação de esporos de *A. niger*, foram adicionadas ao meio batata dextrose (BD) as frações e concentrações citadas acima. Posteriormente adicionaram-se 150 µL do meio BD contendo as frações, em poços de placas de microtitulação (placas com 96 poços), sendo utilizados oito poços para cada tratamento, constituindo-se em oito repetições por tratamento. Cada poço recebeu 150 µL da suspensão de esporos de *A.*

niger na concentração 10^6 conídios mL⁻¹. As placas foram incubadas a 28,5 °C em câmara de crescimento tipo BOD. Os controles negativos foram constituídos de água destilada esterilizada e meio de cultura BD (Batata-destrose) sem adição das frações do extrato. A avaliação foi por meio da contagem aleatória dos esporos, registrando-se o número de esporos germinados e não germinados no total de 200 esporos, após a adição de uma gota de lactofenol azul, em todos os tratamentos, para paralisar a germinação de esporos. A adição do azul de lactofenol ocorreu no momento em que o tratamento controle apresentou 50% de esporos germinados. Foi considerado como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo apresentava o comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições.

Os dados foram analisados por regressão e pelo teste de medias Scott-Knott (1974) à 5% de probabilidade, com o programa estatística SISVAR.

Avaliação do extrato aquoso de juá e método de aplicação do extrato no controle da podridão vermelha em mudas de sisal

A avaliação do extrato aquoso de juá no controle da podridão vermelha do sisal ocorreu em área de produção de sisal, na Escola Agrícola do município de Conceição do Coité, Bahia, em mudas de sisal com 25 a 30 cm de altura, plantadas em canteiros de 1,2 x 6,0 m, com espaçamento de 15 cm entre as mudas. O extrato aquoso foi obtido após a trituração das folhas em liquidificador (10g folhas em 100 mL de água) por dois minutos, obtendo-se um extrato aquoso na concentração de 100 % (p/v). Para avaliação do método de aplicação do extrato aquoso de juá nas concentrações de 0%, 25%, 50% e 75% (v/v) foram testados os métodos de imersão por 12 e 24 horas, irrigação e pulverização com o extrato. Para o método de imersão, as mudas foram retiradas do canteiro, o caule e raízes dessas mudas foram imersos no extrato aquoso, por 12 e 24 horas e, em seguida foram plantadas novamente nos canteiros. No método irrigação, as mudas do canteiro foram irrigadas com o extrato aquoso (ao redor do caule) e no método de pulverização, as mudas do canteiro (toda a planta) foram pulverizadas com o extrato aquoso. Para a inoculação das plantas com *A. niger*, após 2 horas da aplicação do extrato,

foram feitos quatro ferimentos padronizados em pontos equidistantes ao redor do caule de cada muda, sem arrancar as mudas, apenas removendo o solo da região próxima ao caule e no local dos ferimentos, fez-se a inoculação com *A. niger*, por meio da aplicação de 2 ml da suspensão de conídios (10^7 conídios ml^{-1}) de *A. niger*, conforme descrito por Sá (2009). Plantas imersas em água foram utilizadas como controle positivo e plantas pulverizadas e irrigadas com água foram utilizadas como controle positivo do segundo experimento, sendo estas inoculadas com a mesma suspensão de *A. niger*. Plantas não inoculadas e sem o tratamento com o extrato foram utilizadas como controle negativo. Os tratamentos foram constituídos pelas diferentes concentrações (descritas acima) do extrato aquoso de juá e quatro métodos de aplicação: imersão 12hrs, imersão 24 hrs, irrigação e pulverização. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições, e uma planta por repetição.

A avaliação da incidência e severidade dos sintomas da doença foi realizada 30 dias após a inoculação das plantas, por meio da retirada das mudas dos canteiros e cortes transversais nas mudas para observação da presença de sintomas de podridão vermelha no caule, adotando-se a seguinte escala de notas: 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; 3 – Planta morta, caule totalmente destruído, descrita por Sá (2009) (Figura 1).

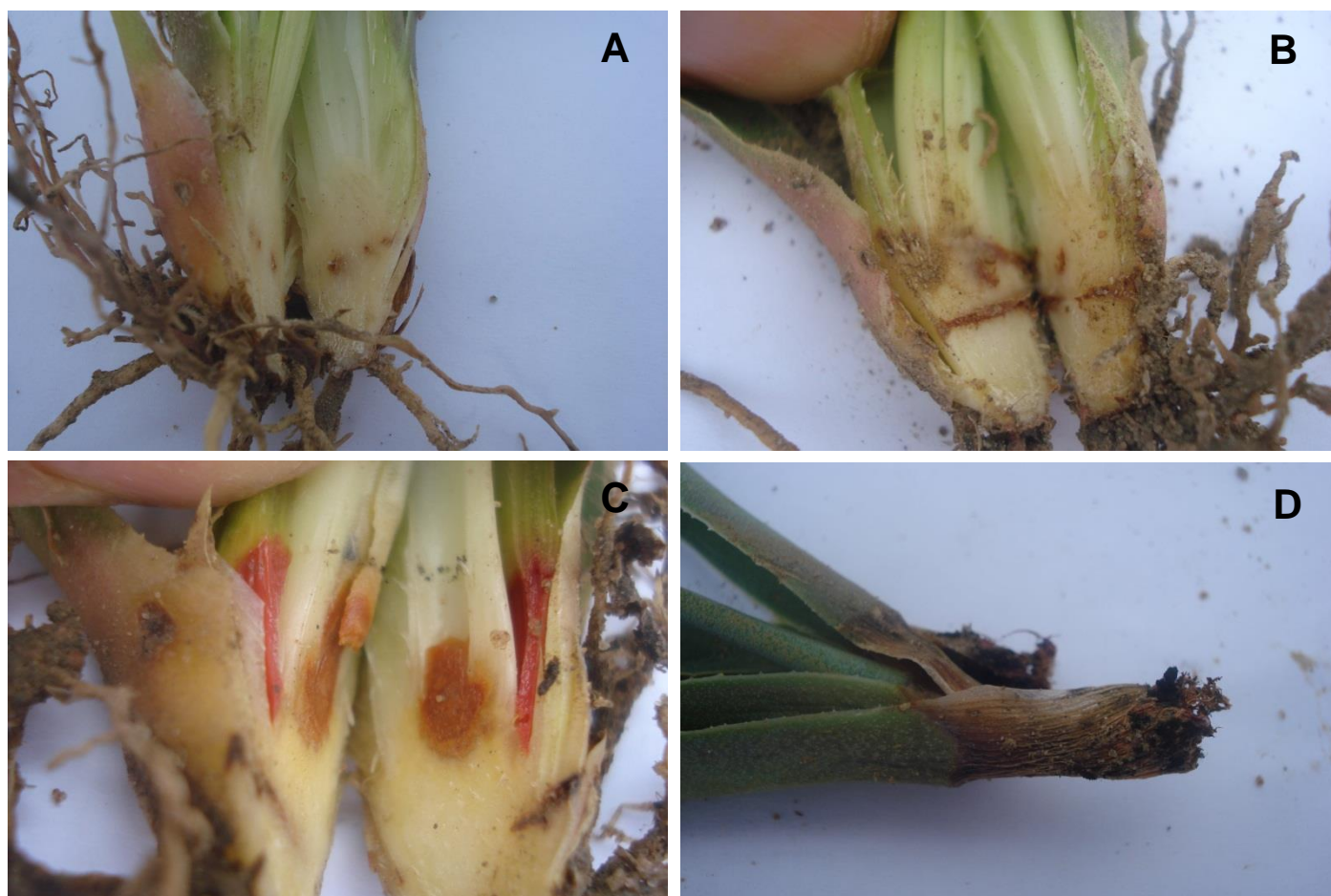


Figura 1. Escala descritiva de notas para avaliação da severidade da podridão vermelha do sisal. **(A)** 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; **(B)** 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; **(C)** 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; **(D)** 3 – Planta morta, caule totalmente destruído.

Os dados de severidade foram transformados para Índice de Severidade da Doença, conforme McKinney (1923), calculado pela fórmula:

$$\text{Índice de severidade da doença} = \frac{\sum(\text{Grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{n^{\circ} \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

Os dados foram analisados pelo teste de médias Scott-Knott (1974) à 5% de probabilidade, com o programa estatística SISVAR.

RESULTADOS

Atividade antifúngica

A fração aquosa e o extrato hidroalcoólico de folhas de juá, na concentração de 400mg/L, promoveram os melhores resultados em termos de inibição no crescimento micelial de *A. niger*, com 59,4% e 56,2% de inibição, respectivamente. O aumento das concentração da fração aquosa e do extrato hidroalcoólico promoveu o aumento da capacidade de inibição do crescimento de *A. niger*, e o potencial fungistático, mostrando ser dependente da dose. A fração de diclorometano e o sulfato de cobre causaram as menores porcentagens de inibição, respectivamente 8,9% e 4,8% (Figuras 2,3 e 4).

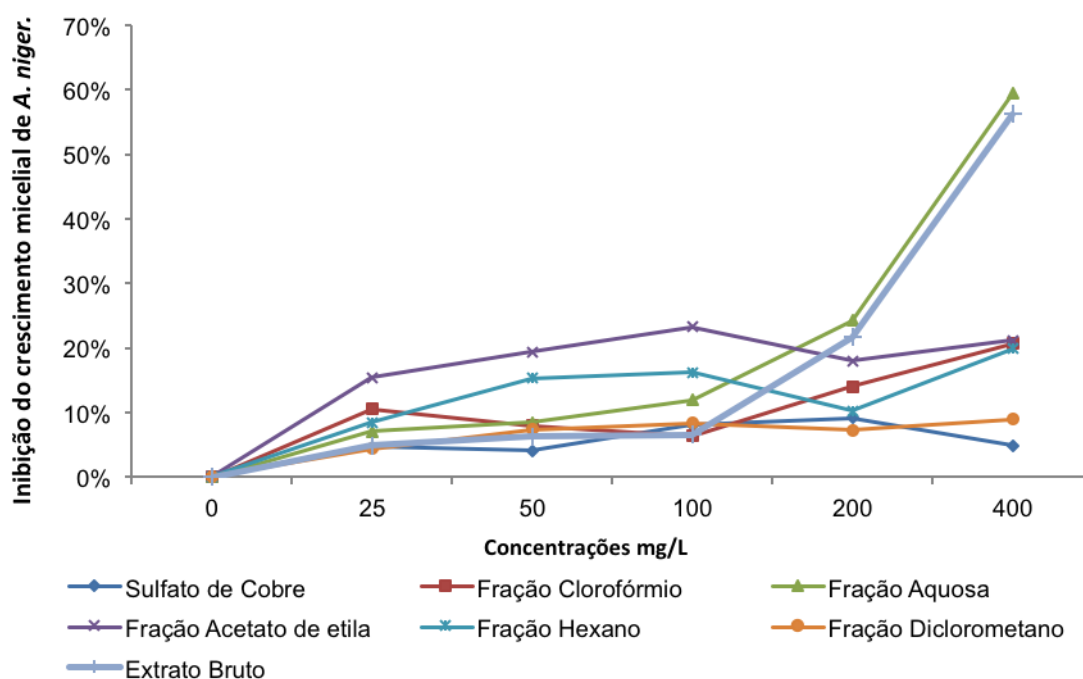


Figura 2. Percentagem de Inibição do crescimento micelial do *A. niger* em meio batata, dextrose e ágar (BDA) com Extrato hidroalcoólico, Frações (Hexano, Diclorometano, Clorofórmio, Acetato de etila e Aquosa) e sulfato de cobre em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

O sulfato de cobre, que se constitui no componente base de alguns fungicidas, no presente trabalho promoveu os menores valores de inibição do crescimento micelial do fungo, para a maioria das concentrações avaliadas. A fração acetato de etila, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L causou a inibição do crescimento do patógeno em 15,3, 19,3 e 23,2%, respectivamente, tendo se destacado nessas concentrações mais baixas.

Todos os tratamentos apresentaram colônias de *A. niger* com diâmetros inferiores ao controle (BDA sem extrato), com 7,8 cm.

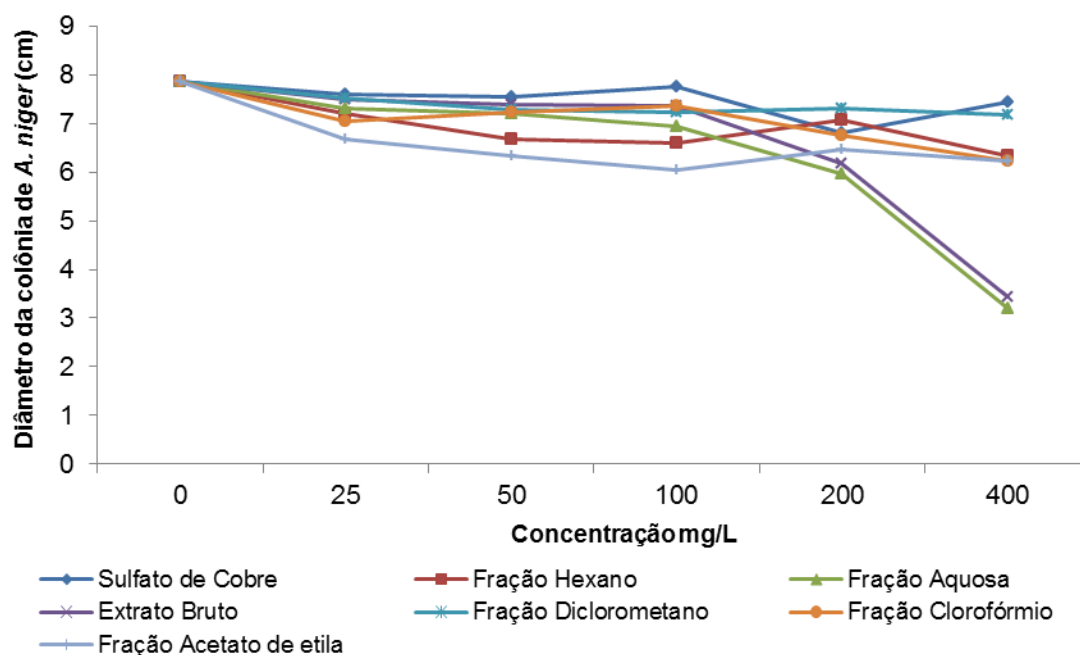


Figura 3. Diâmetro da colônia do *A. niger* em meio batata, dextrose e ágar (BDA) com Extrato hidroalcoólico, Frações (Hexano, Diclorometano, Clorofórmio, Acetato de etila e Aquosa) e sulfato de cobre em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

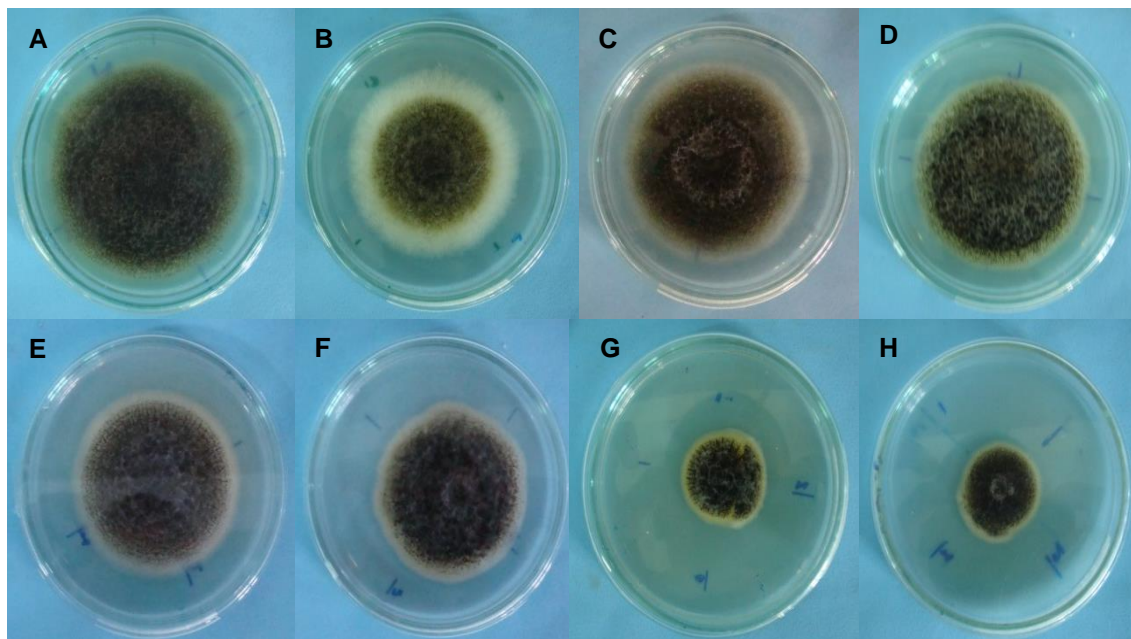


Figura 4. Diâmetro da colônia e esporulação de *A. niger* em placas de Petri em meio BDA com diferentes tratamentos na concentração de 400 mg/L⁻¹: **A)** controle (-) apenas BDA; **B)** Fração Hexano; **C)** Sulfato de Cobre; **D)** Fração Diclorometano; **E)** Fração Clorofórmio; **F)** Fração Acetato de etila; **G)** Extrato Hidroalcoólico e **H)** Fração Aquosa.

A figura 4 ilustra o crescimento micelial de *A. niger* em meio BDA com diferentes extratos e suas concentrações. Verifica-se uma similaridade no crescimento micelial em todas as doses no tratamento com sulfato de cobre. As concentrações de 200 e 400 mg/L da fração aquosa mostraram-se eficientes na redução do crescimento micelial de *A. niger*.

A fração acetato de etila apresentou um efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno, em todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle. Todas as concentrações avaliadas da fração diclorometano evidenciaram comportamento homogêneo, em relação ao efeito no crescimento de *A. niger*, distinguindo-se apenas do tratamento controle no período final da incubação. As frações de hexano e clorofórmio apresentaram desempenhos semelhantes em relação ao efeito no crescimento micelial do fungo. Todas as concentrações apresentaram efeito inibitório, no entanto a concentração de 400 mg/L proporcionou a maior ação antifúngica (Figura 5).

O extrato hidroalcoólico de folhas de juá nas doses de 25, 50 e 100 mg/L não causou inibição do crescimento de *A. niger*. Os maiores índices de inibição

por este extrato no crescimento do patógeno foram obtidos nas concentrações de 200 e 400 mg/L.

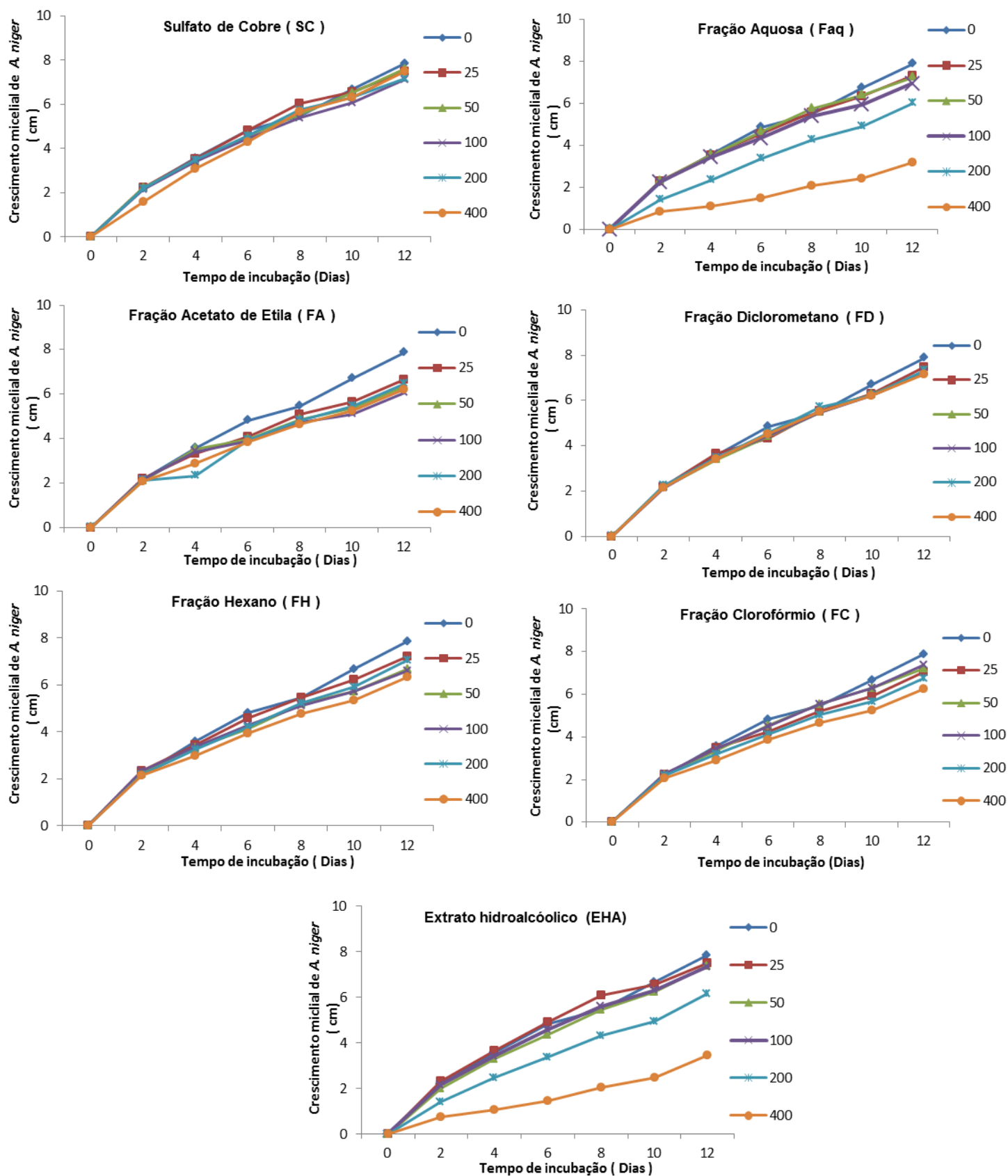


Figura 5. Crescimento micelial de *A. niger* em meio batata, dextrose e agar (BDA) com Extrato hidroalcoólico, Frações (Hexano, Diclorometano, Clorofórmio, Acetato de etila e Aquosa) e sulfato de cobre em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

Número de esporos de *A. niger* em meio BDA

A esporulação *in vitro* de *A. niger* foi afetada pelos extratos de juá. As concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/L da fração aquosa foram as mais eficientes em termos de redução da esporulação, com $9,2 \times 10^5$; $9,9 \times 10^5$; 1×10^6 e $1,1 \times 10^6$ esporos /cm² de colônia, respectivamente. Para a concentração de 400 mg/L, foram obtidos $5,3 \times 10^6$ esporos/cm², indicando o estímulo a esporulação do fungo (Figura 6).

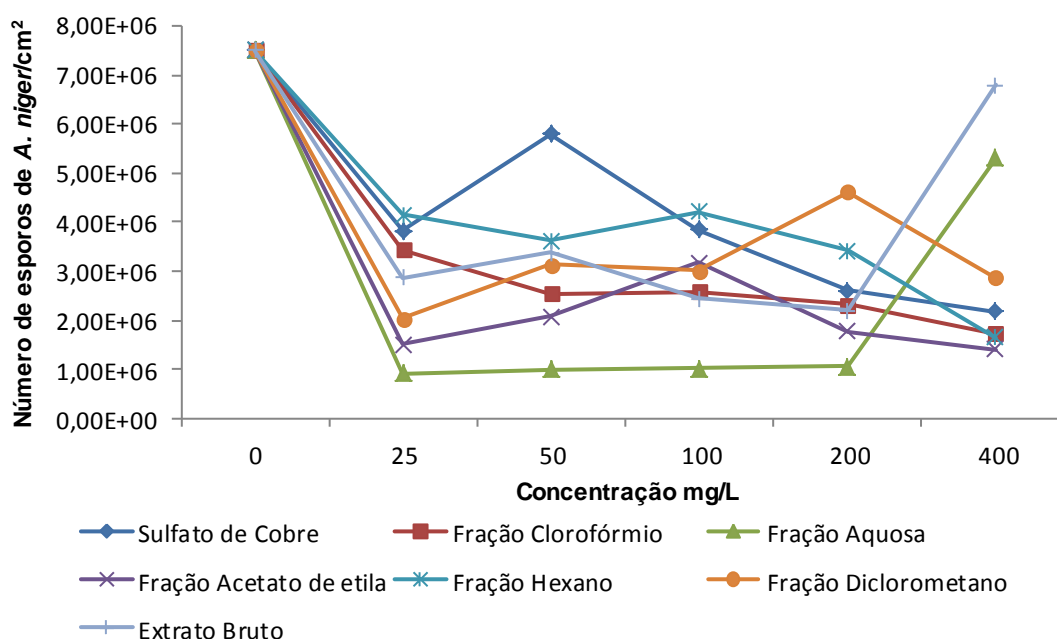


Figura 6. Número de esporos de *A. niger* por cm² de colônia em meio batata, dextrose e ágar (BDA) com EHA, FH, FD, FC, FA, Faq e sulfato de cobre em diferentes concentrações. A concentração 0 corresponde tratamento (-), apenas BDA.

A fração acetato de etila causou inibição da esporulação do patógeno, para as concentrações de 25, 50, 200 e 400 mg/L, com valores de $1,5 \times 10^6$; $2,8 \times 10^6$; $1,8 \times 10^6$ e $1,4 \times 10^6$ esporos/cm², respectivamente. Os maiores valores de esporos/cm² de colônia de *A. niger* foram observados nas colônias crescidas em meio de cultura com 50 mg/L de sulfato de cobre e no meio com 400 mg/L do extrato hidroalcoólico, com valores de $5,8 \times 10^6$ e $6,8 \times 10^6$ esporos/cm², respectivamente (Figura 6).

Avaliação da germinação de esporos de *A. niger* em meio BD.

Em relação a germinação de esporos em meio batata dextrose (BD), todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento controle, exceto para a concentração de 400 mg/L do extrato hidroalcoólico (extrato bruto), que apresentou comportamento distinto dos demais, não diferenciando-se do tratamento controle sem os extratos, mas apresentando um estímulo a germinação (Figura 7), conforme observado para a esporulação em meio BDA (Figura 6).

As frações aquosa nas concentrações 100 e 200 mg/L, hexano na concentração 200 mg/L, clorofórmio nas doses de 25 e 400 mg/L e acetato de etila na concentração de 25 mg/L não apresentaram diferença significativa entre si, em relação a percentagem de inibição da esporulação e mostraram-se eficientes no controle da germinação de esporos de *A. niger*. Estes tratamentos evidenciaram o mesmo comportamento que as concentrações 50, 100 e 200 mg/L do sulfato de cobre.

As concentrações 25, 50, 200 e 400 mg/L da fração aquosa, promoveram as inibições de 33,6; 34,3; 76,1; 73,9 e 56,6% da germinação de esporos. A fração acetato de etila proporcionou a maior inibição na germinação dos esporos do patógeno, com 77,2% de inibição, quando testado para a concentração de 25 mg/L (Figura 7).

O tratamento com sulfato de cobre apresentou a maior média em percentagem de inibição na germinação de esporos, com 59,8 %, enquanto as frações de clorofórmio, hexano e diclorometano exibiram respectivamente as médias de 54,4; 48,9 e 4,5%.

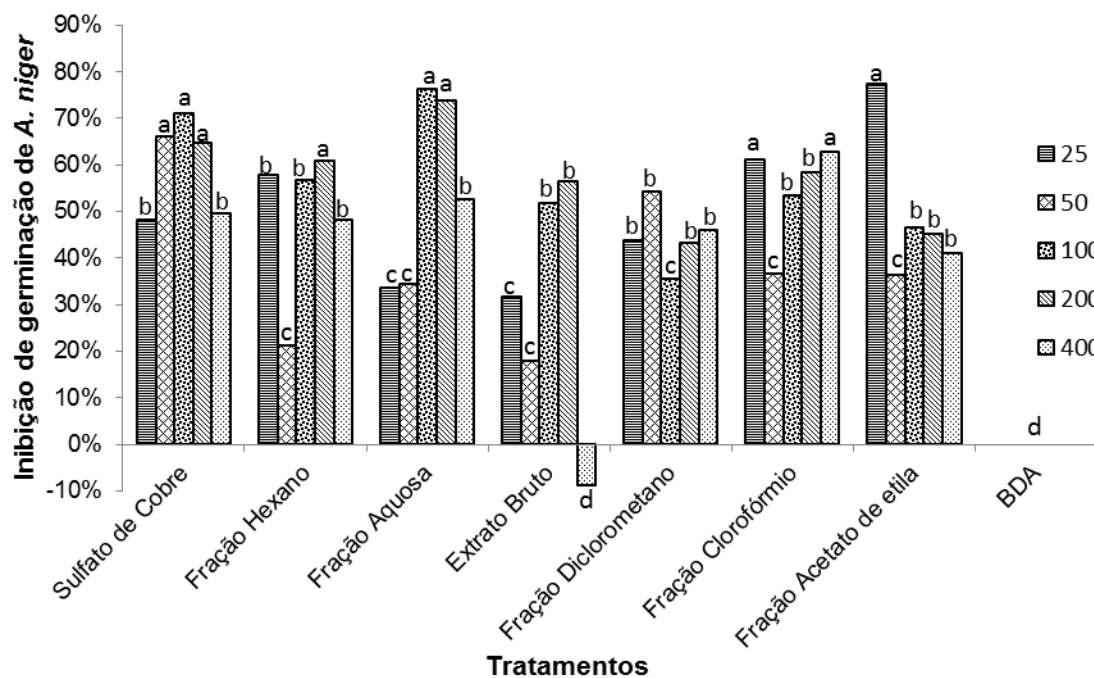


Figura 7. Percentagem de inibição da germinação de esporos de *A. niger* em meio batata, dextrose (BD) com EHA, FH, FD, FC, FA, Faq e sulfato de cobre em diferentes concentrações em 18 horas de incubação. O tratamento (-) corresponde apenas BD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Avaliação do extrato aquoso de juá no controle da podridão vermelha em mudas de sisal

O experimento de campo conduzido com mudas de sisal no município de Conceição do Coité, Bahia, avaliou o efeito do extrato aquoso de folhas de juá no controle da podridão vermelha do sisal. Observou-se que todos os tratamentos promoveram significativa redução na severidade da doença, comparados aos controles negativos 1 e 2 (Figuras 8).

O tratamento das mudas por imersão de 12 e 24 horas no extrato aquoso de juá, nas concentrações de 25, 50 e 75%, não apresentou diferença significativa em relação ao índice da doença nas mudas de sisal.

Dentre os métodos e concentrações avaliados, o extrato a 75% aplicado pelo método de pulverização e o extrato a 50%, aplicado pelo método de irrigação foram os que apresentaram os melhores resultados em mudas de sisal, apresentando resultados semelhantes ao controle positivo, não inoculado com *A. niger* (Figura 8).

Foi observada diferença significativa entre o índice de doença das mudas do tratamento controle (C-1) referente ao método de aplicação do extrato por imersão que envolveu o arranque e replantio das mudas de sisal e as mudas do tratamento controle (C-2) referente aos métodos de aplicação do extrato por irrigação e pulverização das mudas, que não envolveu o arranquio destas (Figura 8).

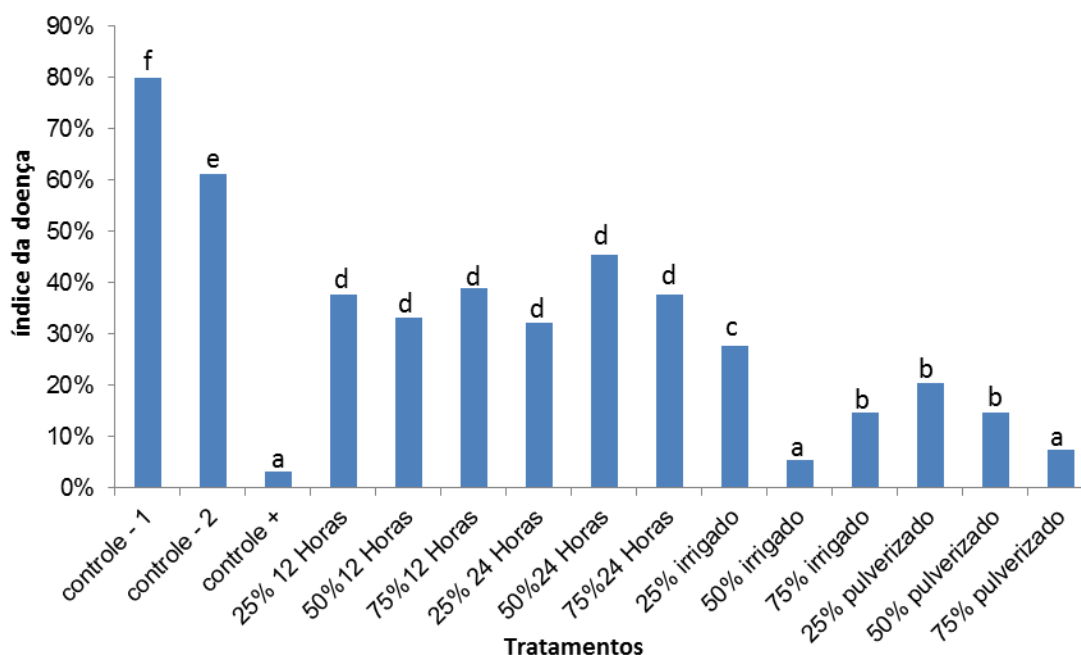


Figura 8. Representação gráfica do índice da podridão vermelha do sisal em mudas após 12 e 24 horas de imersão, irrigadas e pulverizadas nas concentrações 25%, 50% e 75% de extrato aquoso de folhas de juá, inoculadas com *A. niger*, no município de Conceição do Coité-BA. Controle (-1) corresponde mudas imersas em água (inoculado apenas com *A. niger*), Controle (-2) corresponde a mudas irrigadas e pulverizadas com água (inoculado apenas com *A. niger*), Controle + corresponde ao tratamento sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para o tratamento com 12 horas de imersão da muda na concentração de 75% de extrato aquoso, a incidência da doença foi de apenas de 50%, enquanto que no tratamento controle a incidência foi de 96,67%, ou seja, ocorreu uma redução acima de 46,67% na incidência da doença (Tabela 1). O tratamento com 24 horas de imersão das mudas em extrato aquoso de juá, nas doses de 25 e 50%, promoveu a incidência de 46,7% e 60 % respectivamente.

Os melhores resultados foram alcançados com os métodos de irrigação e pulverização das mudas de sisal com o extrato aquoso de folhas de juá. O extrato a 50% aplicado por irrigação e o extrato a 75% aplicado por pulverização, promoveram a menor incidência 17,65% (Tabela 1).

Tabela 1. Índice e Incidência da podridão vermelha em mudas de sisal inoculadas com *A. niger* e tratadas com a aplicação de extrato aquoso de folhas de juá, com diferentes métodos de aplicação e concentrações do extrato, em plantio de mudas de sisal no campo, no município de Conceição de Coité, Bahia.

Tratamentos	Índice da doença (%)	incidência da doença (%)
25% 12h de imersão	37,78	50
50% 12h de imersão	34,44	60
75% 12h de imersão	45,56	50
25% 24 horas de imersão	33,33	46,7
50% 24 horas de imersão	33,33	60
75% 24 horas de imersão	37,78	56,7
25% Irrigado	29,41	70,59
50% Irrigado	5,88	17,65
75% Irrigado	15,69	41,18
25% Pulverizado	21,57	58,82
50% Pulverizado	15,69	29,41
75% Pulverizado	7,84	17,65
Controle positivo*	3,33	3,33
Controle negativo*	80	96,67
Controle positivo**	0	0
Controle negativo**	62,75	100

Índice e incidência calculada para uma população de 30 plantas. Controle positivo (*) - plantas arrancadas e imersas em água, sem inoculação *A. niger*; Controle negativo (*) - plantas arrancadas e imersas em água, inoculadas com *A. niger*; Controle positivo (**) - plantas irrigadas e pulverizadas com água, sem inoculação *A. niger* e controle negativo (**) - plantas irrigadas e pulverizadas com água, inoculadas com *A. niger*.

Nos tratamentos com o extrato aquoso de folhas de juá, nas plantas com sintomas, observou-se que a lesão causada por *A. niger* não progrediu para os tecidos internos do caule. Os tecidos em volta de lesão secaram e a doença foi controlada, ficando restrita ao local da lesão, sem ocorrer a murcha e morte da planta (Figura 9).



Figura 9. Avaliação visual de mudas de sisal saudáveis e com sintomas da podridão vermelha. **A)** Muda saudável sem tratamento e não inoculada com *A. niger*; **B)** Muda irrigada com 75% extrato de juá e inoculada com *A. niger*; **C)** Muda irrigada com 50% extrato de juá e inoculada com *A. niger*; **D)** Muda sem tratamento com extrato e inoculada com *A. niger*, planta morta, com podridão em todo o caule e esporulação de *A. niger* no caule e base das folhas.

DISCUSSÃO

Neste estudo constatou-se que o extrato hidroalcoólico e a fração aquosa de folhas de juá, nas concentrações mais elevadas, apresentaram efeito inibitório ao crescimento micelial de *A. niger*, o que sugere que as substâncias antifúngicas e fungistáticas presentes nas folhas da planta são polares. Entretanto, para a concentração de 400 mg/L observou-se o aumento da esporulação de *A. niger*, sugerindo uma indução da esporulação do fungo, possivelmente como resposta ao estresse ocasionado pelas substâncias bioativas que causaram a inibição do crescimento micelial do fungo, podendo ser esta uma estratégia de sobrevivência do fungo em condições de estresse.

As frações aquosa nas concentrações 100 e 200 mg/L, hexano na concentração 200 mg/L, clorofórmio nas doses de 25 e 400 mg/L e acetato de etila na concentração de 25 mg/L mostraram-se eficientes no controle da germinação de esporos de *A. niger*. Estes tratamentos evidenciaram o mesmo comportamento que os tratamentos com as concentrações 50, 100 e 200 mg/L

de sulfato de cobre. Tais resultados, quando comparados aos valores obtidos no tratamento com sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), evidenciam o potencial das frações do extrato de juá para o controle de *A. niger* e da podridão vermelha do sisal. O sulfato de cobre é o componente base da calda bordalesa (PAULUS, 2011).

No presente trabalho, dentre os solventes utilizados para extração de substâncias com atividade antifúngica a *A. niger*, destacaram-se os mais polares, água e acetato de etila. Estes resultados sugerem que os compostos bioativos que atuam na inibição da esporulação do *A. niger* são polares, de acordo a metodologia crescente de polaridade (BRAGA, 2008).

Cruz et al., (2007) observaram atividade antifúngica no extrato aquoso de juá para *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi*, com concentração inibitória mínima de 6,2 a 400 mg/L.

Sumathy et al., (2013) relataram que o extrato metanólico de flores de *Cassia surattensis* apresentou 100% de inibição do crescimento micelial de *A. niger*, na dose de 12,5mg/L, em meio sólido. Em meio líquido a inibição completa ocorreu na dose de 6,25 mg/L. Este extrato causou o colapso e morte das hifas, que apresentaram perda do conteúdo citoplasmático e da integridade e rigidez da parede celular (SUMATHY et al., 2013). Estes autores não observaram alterações nos conídios de *A. niger* nos primeiros dias e concluíram que a atividade antifúngica ocorre devido ao ataque do extrato na membrana citoplasmática, causando a morte das hifas, mas após sete dias de exposição ao extrato, os esporos apresentaram arranjo alterado e estrutura distorcida e murcha. Tolouee et al., 2010 observaram que o óleo essencial de *Matricaria chamomille* causa inibição do crescimento micelial e da esporulação de *A. niger*. A inibição do crescimento micelial ocorreu a partir da dose de 15,62 ug/mL (7,5% de inibição, atingindo o máximo de inibição de 92,50% na dose de 1000ug/mL e a produção de esporos não ocorreu nas doses de 500 e 1000 ug/L. Este óleo na concentração de 250 ug/mL causou 41% de inibição, com alterações na estrutura da membrana citoplasmática. Na dose de 1000 ug/L observou-se o colapso da membrana citoplasmática, separação da parede celular, desorganização e perda do conteúdo celular, com a morte das células.

Todas as frações do extrato de juá promoveram redução na esporulação de *A. niger*. A fração aquosa do extrato de juá nas concentrações de 25 a 200 mg/L foi a mais eficiente em termos de redução da esporulação por cm² de colônia de *A. niger*.

Tolouee et al., (2010) indicaram o colapso e a não diferenciação das extremidades das hifas causadas pelo óleo essencial de flores de *M. camomille* como causas da inibição da esporulação de *A. niger*. De acordo com Magro et al., (2006) o extrato aquoso de folhas de *Roman chamomile* também inibiu *A. niger* na dose de 920 mg/L. Devappa (2012), obteve 46% de inibição no crescimento micelial de *A. niger* utilizando 86 mg/L da fração éster de semente de pinhão manso (*Jatropha curcas*) enriquecida com forbol. Souza, (2010) estudando extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) verificou que as concentrações de 1,75, 2,5 e 5% de extrato aquoso inibia o crescimento micelial de *A. niger* em 13,25, 44,5 e 100%, respectivamente. Kocic-Tanackov et al. (2012), demonstraram que o extrato de orégano aquoso apresentou forte atividade antifúngica a *A. niger* em concentração de 1,5 e 2,5 mL/100mL de meio de cultura, após 14 dias de incubação.

Óleos essenciais ou extratos brutos de plantas têm apresentado potencial para o controle de fitopatógenos, em virtude da ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (STANGARLIN et al. 2010). As substâncias atuantes no extrato vegetal como antibactericidas, antifúngicos e antivirais são provenientes do metabolismo secundário e apresentam um importante papel na adaptação dos vegetais aos ecossistemas distintos (HARBORNE, 1988; AERTS et al., 1991).

Em uma triagem fitoquímica em folhas de *Z. joazeiro*, Melo et al., (2012) descreveram a presença de alcaloides, saponinas, esteroides tripenos e taninos no extrato hidroalcoólico das folhas de juá.

Os fenóis são conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas. A ação inibitória dos compostos fenólicos no crescimento micelial está correlacionado com grupos distintos de fenóis (BARROS, 2013). As substâncias fenólicas apresentam a capacidade de complexar-se a proteínas extracelulares da membrana, provocando a morte celular (COWAN, 1999).

Sanches et al. (2005) relataram que os taninos têm efeito inibitório sobre bactérias e fungos. De acordo com Melo & Santos (2002), a ação antifúngica dos taninos é explicada por três hipóteses. A inibição das enzimas de fungos e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas é primeira hipótese pressuposta. A segunda é a mudança metabólica do micro-organismo causada pela ação dos taninos sobre as membranas celulares. A terceira hipótese baseia-se na diminuição da disponibilidade de elementos essenciais para o metabolismo microbiano, devido à complexação dos taninos com íons metálicos.

Segundo Barros (2013), os efeitos inibitórios de compostos fenólicos na germinação de esporos estão relacionados diretamente com os grupos de fenóis. Os fenóis monoterpênicos e carvacrol são ressaltados pela literatura por sua excelente atividade antimicrobiana. Esses compostos fenólicos podem atuar na perturbação das proteínas constituintes da membrana celular e inibir a respiração celular (ROMERO, 2012).

Controle da podridão vermelha

O extrato aquoso de folhas de juá mostrou-se eficiente no controle da podridão vermelha em mudas de sisal. O seu efeito positivo também foi observado no controle *in vitro* de *A. niger* para o extrato hidroalcoólico e a fração aquosa.

Os resultados com a aplicação do extrato aquoso de folhas de juá em mudas de sisal na região sisaleira da Bahia, indicam a presença de substâncias bioativas capazes de controlar a podridão vermelha do sisal.

Dentre os métodos utilizados para aplicação do extrato aquoso de folhas de juá, destacaram-se os métodos de irrigação e pulverização das mudas plantadas. Os menores índices da podridão vermelha do sisal observados nas plantas tratadas por esses métodos, em relação ao método de imersão podem estar relacionados ao estresse que as mudas são submetidas ao serem retiradas do solo para serem imersas no extrato, favorecendo a ação do *A. niger*.

Foi observada diferença significativa entre o controle do tratamento por imersão que envolveu o arranque e replantio das mudas de sisal e o controle

dos tratamentos por irrigação e pulverização das mudas, que não envolveu o arranquio destas (Figura 8). Este resultado reforça a hipótese de que condições de estresse na planta favorecem a doença. Quando submetidas a condições de estresse, as plantas de sisal ficam mais predispostas à infecção. *A. niger* não penetra em tecidos de sisal não injuriados, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica (SÁ, 2009).

Neste trabalho, o estresse causado na muda devido ao arranquio desta e replantio promoveu a podridão vermelha. Nos tratamentos com o extrato aquoso de folhas de juá, nas plantas com sintomas, observou-se que a lesão causada por *A. niger* seca na região da base das folhas, e não progride para os tecidos internos do caule, sem causar a murcha e morte da planta (Figura 9). Esta pode ser uma resposta de indução de resistência na planta a podridão vermelha causada por *A. niger*.

A ação fungitóxica direta e/ou a produção de fitoalexinas indicam a presença de compostos com características fungicidas ou de elicitores, evidenciando o potencial de extrato bruto de juá no controle deste fitopatógeno (STANGARLIN et al., 2010). Estudos futuros deverão investigar o potencial elicitador de componentes do extrato aquoso de juá e seu potencial para o controle de fitopatógenos, abrindo uma nova linha de investigação com a planta de juá e potencial de uso agrícola.

Foi demonstrado em estudo desenvolvido por Celoto (2005), que o extrato de melão-de-São-Caetano diminui a percentagem de lesão causada por *Colletotrichum musae* em frutos de banana.

A redução da incidência e severidade da podridão vermelha em mudas indica que o extrato aquoso de folhas de juá apresenta potencial para o controle da doença. Observa-se que para o tratamento com 12 horas de imersão da muda na concentração de 50% de extrato aquoso, a incidência da doença foi de apenas de 34,44%, enquanto que no tratamento controle a incidência foi de 80%, ou seja, ocorreu uma redução acima de 50% na incidência da doença (Tabela 1). O tratamento com 24 horas de imersão das mudas em extrato aquoso de juá, nas doses de 25 e 50%, proporcionou uma incidência de 33,33%.

Os melhores resultados foram alcançados com os métodos de irrigação e pulverização das mudas de sisal com o extrato aquoso de folhas de juá. O extrato a 50% aplicado por irrigação e o extrato a 75% aplicado por pulverização, ambos promoveram os menores índices de doença, correspondendo a 5,88 e 7,84% respectivamente. Os menores índices da podridão vermelha do sisal observados nas plantas tratadas por esses métodos, em relação ao método de imersão podem está relacionados com o estresse que as mudas são submetidas ao serem retiradas do solo para serem imersas no extrato, favorecendo a ação *A. niger*.

CONCLUSÕES

A espécie *Z. juazeiro* Mart apresenta um alto potencial para a descoberta e identificação de moléculas bioativas com atividade antifúngica e potencial para o controle de doenças em plantas.

O extrato aquoso de folhas de juá foi eficiente no controle da podridão vermelha do sisal em condições de campo, em mudas de sisal. A eficiência do extrato na redução da severidade da doença depende do método de aplicação, sendo mais eficiente quando aplicado por meio da irrigação e/ou pulverização nas mudas de sisal e quando utilizado nas concentrações igual ou superiores a 50%.

REFERÊNCIAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

AERTS, R. J. et al. **Allelopathic inhibition of seed-germination by Cinchona alkaloids**. *Phytochemistry*. Oxford: Pergamon press, v. 30, p. 2947-295, 1991

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; Melo, J. G.; Santos, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal Ethnopharmacol**, v.114, p. 325–54, 2007

ALMEIDA, T. F., CAMARGO, M., PANIZZI, R. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Butucatu. v, 35 (3), p. 196-201, 2009.

BARROS, P. N. **Potencial dos extratos de plantas da caatinga com atividade antifúngica e indutora de resistência.**, 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

BRAGA, T. V. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis sub sp *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante.**, 2008. 175 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

CELOTO, M. I. B. **Atividade antifúngica de extratos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx.** 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de concentração de Produção). 2005.

CONSOLI. M. A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva.** Ribeirão Preto, p.119. 2009.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, Embrapa, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology** v.12, p. 564-582, 1999.

CRUZ, M. C.S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, J. R. A.M.; MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. **Journal Ethnopharmacol.** V.111, p. 409. 2007.

DEVAPPA, R. K. et al. **Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays.** Ecotoxicology and Environmental Safety. V.78, p. 57–62, 2012.

HARBORNE, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. London: **Academic Press.** 1988.

IBGE, 2012. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Levantamento Sistemático da produção agrícola, Rio de Janeiro v.25 n.02, p.79, 2012.

KATO, E. T. M.; OHARA, M. T.; NISHITAMI, M. **Evaluation of antimicrobial property of *Ziziphus joazeiro* Martius.** Lecta-USF, v.16, n.2, p.75-85, 1998.

KOCIC & TANACKOV, S. et al. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. **Food Science and Technology.** V. 49, p.14-20, 2012.

LINTHOINGAMBI, W.; MUTUM, S. S. Antimicrobial activities of different solvent extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsely) A. Gray. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 3(5), p. 50-54, 2013.

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Fitoalaxin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.21-31, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

MAGRO, A.; CAROLINO, M.; BASTOS, M.; MEIXA, A. Efficacy of the plant extracts against stored products fungi. **Revista Iboamericana de Micologia**. v. 23, p. 97-102, 2006.

MELO, M. S. F.; ROCHA, C. Q.; SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* Mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 2, p. 43-51, ago./dez. 2012.

MELLO, C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS /Ed. da UFSC, p. 950. 2002.

MORAES, S. A.; GODOY, I. J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**, Ed. UFV:Viçosa, Minas Gerais, p.1-43, 1997.

OLIVEIRA, A. F. M.; SALATINO, A. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A J. Biosci.**, v.55, 2000.

PAULUS, G., MÜLLER, A. M.; BARCELLOS, L. A. R. **Agroecologia aplicada: práticas e métodos para uma agricultura de base ecológica**. Porto Alegre: EMATER-RS, 2001.

PIZARRO, A, P, B., OLIVEIRA FILHO, A, M., PARENTE, J, P. MELO, M.T.V., SANTOS, C. E., LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n.1, p. 23-29, 1999.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B.; SILVA, E. L.; DINIZ S. P. S. S. OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B.; **Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos**. UNOPAR Centro Ciência Biológica Saúde. v.14(4) p. 231-5, 2012.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp**. Dissertação (Mestrado em Ciências

Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas. 2009. p. 65.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. de. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.

SANTOS, M.B.et al. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12, n.1, p.13-17, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, n.30, p.129-137, 2000.

SECEX - **SECRETÁRIA DE COMÉRCIO EXTERIOR**. Exportações Brasileiras, 2009. Disponível em: www.desenvolvimento.gov.br Acesso em: 17 de janeiro de 2014.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512,1974.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

SILVA, M. H. S. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal**, 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012b.

SOUZA, L. S. S. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal**, 2010, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. V. 10, número 1 - p. 18-46, 2011.

SUMATHY, V.; ZAKARIA, Z.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; JOTHY, S. L.; VUARYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S. Evaluation or the effect of *Cassia surattensis* Burm. F., flower methanolic extract on the growth and morphology of *Aspergillus niger*. **European Review for medical and Phamacological Sciences**. v. 17. p. 1648-1654. 2013.

TOLOEE, M.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R; ESLAMIFAR, A.; ZAD, S. J.; JAIMAND, M.; GHAFAROKHI, M.; ABYANEH, M. R. Effect of *Matricaria Chamomilla* L. flower essencial oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. Inter **Journal Food Microbiology**. v,139. p. 127-133. 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O juá, uma espécie vegetal do bioma caatinga, revelou no presente estudo o potencial biotecnológico para o desenvolvimento de produtos nas áreas farmacêutica, alimentícia e agrícola. Os resultados em relação aos fenóis totais, atividade antioxidante e antifúngica do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de juá, indicam que esta espécie deve se explorada em estudos futuros. As características apresentadas pelo vegetal neste estudo oferecem a possibilidade de exploração do extrato das folhas desta planta, mediante o seu cultivo, podendo gerar renda e desenvolvimento para a região semiárida da Bahia.

Inúmeros trabalhos na literatura correlacionam o teor de fenóis totais com a atividade antioxidante e esta com a atividade antibacteriana e antifúngica. Os resultados da atividade antibacteriana não foram satisfatórios, devendo estar associados às concentrações avaliadas no estudo. Novos estudos deverão ser conduzidos com outras concentrações destes extratos.

Os testes *in vitro* para avaliação da inibição do crescimento micelial de *A. niger* com o extrato hidroalcoólico e frações revelaram que a fração aquosa e extrato hidroalcoólico foram os mais eficazes e sua ação é dependente da concentração. No presente trabalho, o sulfato de cobre, componente base de alguns fungicidas, apresentou os menores valores de inibição do crescimento micelial de *A. niger*.

A fração acetato de etila e a fração aquosa reduziram a esporulação de *A. niger*, em baixas concentrações. No entanto, o extrato hidroalcoólico na concentração de 400 mg/L estimulou a germinação de esporos.

Estes resultados indicam o potencial biotecnológico desta planta para a formulação de fungicidas a serem utilizados no controle de pragas. No entanto, faz-se necessário o isolamento e identificação dos princípios ativos presentes nos extratos e frações.

O extrato aquoso de folhas de juá promoveu o controle da podridão vermelha do sisal, mostrando-se eficiente na redução da incidência e severidade da doença.

Todos os métodos de aplicação do extrato promoveram o controle desta doença no sisal. No entanto, os métodos de pulverização e irrigação mostraram-se mais eficientes no controle da doença. Foi verificado no presente estudo que o estresse atribuído as plantas, ao serem arrancadas, favorece a atuação do patógeno e o conseqüente aumento na severidade e incidência da doença.

Novos estudos são necessários para identificar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica e o possível potencial do extrato de juá na indução de resistência a doenças de plantas. Estudos também devem ser realizados para avaliar a eficiência do extrato em relação à época e periodicidade de aplicação do extrato na planta.