

Avaliação do Efeito do Extrato Etanólico de *Piper umbellatum* L. no Controle Alternativo de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*¹

Evaluation of the Ethanolic Extract Effect of *Piper umbellatum* L. in the Alternative Control of *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*

Danielle Emanuelle Gusmão^{*a}; Patrícia Oliveira Chaves^a; Rosemary Matias Coelho^a; Denise Renata Pedrinho^a; Silvia Rahe Pereira^a; Bianca Obes Corrêa^a

^aUniversidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Produção e Gestão Agroindustrial. MS, Brasil.

*E-mail: danyegusmao@hotmail.com

Resumo

Objetivou-se, neste trabalho, investigar o potencial do extrato da planta *Piper umbellatum* (Sin. *Piper umbellata* L.) no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. Para avaliação das habilidades fungicida e ou fungistática, os fungos fitopatogênicos foram crescidos previamente em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar), tendo sido realizado o teste de crescimento micelial, em meio de cultura BDA nas concentrações de 800, 1200, 1600, 2000 e 2400 µg 100 mL⁻¹. Foram vertidos 10 mL de meio das diferentes concentrações em placas de Petri, com quatro repetições para cada concentração. A avaliação do crescimento micelial para todos os patógenos foi realizada por medidas diárias do diâmetro das colônias. Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *P. umbellatum* foi detectada a presença majoritária de compostos fenólicos (100%), seguido dos flavonoides, esteroides e alcaloides (75%), os taninos, triterpenos e açúcares redutores (50%) e com menor frequência as saponinas (25%). As concentrações testadas não inibiram o crescimento micelial dos fungos, no entanto se observou que houve interferência no desenvolvimento da colônia de *R. solani*, pois não foi observada a formação de micro escleródios, estruturas estas formadas na testemunha e em função da presença de metabólitos secundários no extrato que podem apresentar atividade antifúngica, é recomendável a continuação do estudo fitoquímico de *P. umbellatum*, para isolamento e identificação de substâncias responsáveis pela atividade e determinar suas frações ativas, visando o controle de agentes fitopatogênicos.

Palavras-chave: Plantas Fungicidas. Piperaceae. Estratos Vegetais. *Rhizoctonia solani*; *Macrophomina phaseolina*.

Abstract

The objective of this work was to investigate the potential of *Piper umbellatum* (Sin. *Piper umbellata* L.) plant extract on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. To evaluate fungicidal and or fungistatic abilities, phytopathogenic fungi were previously grown in BDA culture medium (potato dextrose agar), mycelial growth test was performed in BDA culture medium at concentrations of 800, 1200, 1600, 2000 and 2400 µg 100 mL⁻¹. 10 mL of medium of the different concentrations were poured into Petri dishes, with four replicates for each concentration. Mycelial growth evaluation for all the pathogens was performed by daily measurements of colony diameter. Phytochemical prospecting of *P. umbellatum* ethanolic extract showed the presence of phenolic compounds (100%), followed by flavonoids, steroids and alkaloids (75%), tannins, triterpenes and reducing sugars (50%) and less frequently the saponins (25%). The tested concentrations did not inhibit the mycelial fungi growth, however, it was observed that there was interference in the development of *R. solani* colony, as the formation of micro sclerodes, structures formed in the control was not observed and due to the presence of secondary metabolites. In the extract that may present antifungal activity, the continuation of the phytochemical study of *P. umbellatum* is recommended for isolation and identification of substances responsible for the activity and to determine their active fractions, aiming at the control of phytopathogenic agents.

Keywords: Fungicidal plants; Piperaceae; Plant extracts; *Rhizoctonia solani*; *Macrophomina phaseolina*.

1 Introdução

Para o auxílio no controle de doenças, o uso racional de agrotóxicos possui efeito positivo, entretanto, em longo prazo, além do surgimento de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas, esses produtos trazem efeitos nocivos como degradação dos recursos naturais e a saúde humana (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000).

Com isto, a preocupação da sociedade com o impacto das práticas agrícolas no ambiente e a contaminação com produtos fitossanitários vêm alterando o cenário agrícola, resultando na presença de segmentos de mercado, que visam aquisição de produtos alternativos, estimulando a implementação do manejo e o uso de substâncias bioativas (MORANDI; BETTIOL; 2008). Essas inquietações têm levado ao desenvolvimento de

sistemas de cultivo mais sustentáveis e, na busca de suprir as necessidades dos consumidores e produtores no desejo da redução do uso de agrotóxicos, diversas alternativas vêm sendo estudadas e indicadas para o controle de doenças de plantas (FIGUEREDO *et al.*, 2006).

Entre os principais patógenos habitantes de solo se destaca a *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* patógenos estes que atacam diversas culturas, formam estruturas de resistência para sobrevivência nas entressafras (MICHEREFF *et al.*, 2005).

A resistência destes fitopatógenos, entre outros, está ligada ao uso frequente e dosagens não indicadas para controle de doenças, além do uso de moléculas que têm abrangência sobre diferentes tipos de agentes fitopatogênicos (GARCIA *et al.*, 2012). Dessa forma, se faz necessária a busca por

métodos alternativos para o controle de doenças, tornando-se a utilização de produtos naturais, como extratos de espécies vegetais uma alternativa promissora (GONÇALVES *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2017).

A diversidade de substâncias ativas, em plantas medicinais, tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais, no intuito de explorar suas propriedades fungitóxicas e podendo ser utilizadas diretamente pelo produtor ou servir de matéria-prima para síntese de novos fungicidas. A família Piperaceae apresenta vários exemplares com estas potencialidades acima exploradas, uma dessas é a espécie *P. umbellatum* L. (CELOTO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial fungitóxico do extrato etanólico de *P. umbellatum* no crescimento micelial de *R. solani* e *M. phaseolina*.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta, obtenção do extrato de *P. umbellatum* e prospecção química

As folhas de *P. umbellatum* foram obtidas de 10 matrizes, nas primeiras horas da manhã, na horta de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Anhanguera-Uniderp, Unidade Agrárias, Campo Grande, MS, Brasil (20°26'21" Sul e longitude 54°32'27"). Após a identificação, um espécime foi catalogado e incorporado à coleção da Universidade Uniderp.

As folhas frescas foram secas em estufa circuladora de ar a 45° C (MARCONI®, MA35), durante 48 horas, trituradas em moinho elétrico (MARCONI®, MA048), tamisadas e o pó (500 g) foi extraído com etanol (99,5%) em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner®) durante 60 minutos, seguido de extração por maceração estática, durante sete dias. O material foi filtrado e o solvente evaporado, obtendo-se o extrato etanólico bruto, o qual foi submetido à análise química.

A prospecção fitoquímica foi desenvolvida utilizando o extrato etanólico, por meio de reações de caracterização, avaliando-se a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, antocianinas, cumarinas, antraquinonas, alcaloides, esteroides, triterpenos, heterosídeos cardiotônicos, heterosídeos cianogênicos, saponinas e açúcares redutores, segundo metodologia adaptada de Simões *et al.* (2017). Os resultados foram classificados, como: reação negativa (-), discreto (turvação) (\pm), fracamente positiva (+), positiva parcial ($+\pm$), positiva ($++$), fortemente positiva ($+++$) e, alta intensidade ($+++$), com frequência de 0, 5, 15, 25, 50, 75 e 100%, respectivamente.

Os grupos químicos majoritários do extrato etanólico foram confirmados pela análise no espectro na região UV-visível (Femto®, 800XI), com a determinação do comprimento de onda de máxima absorvância, na faixa de 200 a 800 nm. O etanol foi utilizado como branco e os espectros foram comparados com dados da literatura (JURASEKOVA *et al.*, 2006; KASAL *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*,

2014). As análises confirmatórias foram desenvolvidas com três repetições.

2.2 Determinação dos compostos fenólicos, flavonoides, Taninos Condensados e alcaloides

Do extrato etanólico 100 mg foram utilizados para determinação dos teores de fenóis (FT). O ácido gálico (10 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi empregado como padrão para construção da curva de calibração ($y = 0,0077x - 0,0228$; $R^2 = 0,9985$). Os testes foram realizados sendo utilizado um espectrofotômetro na região de 750 nm, cubetas de quartzo seguindo o Método Folin-Ciocalteu's (SOUSA *et al.*, 2007).

Para quantificação dos flavonoides no extrato etanólico foi utilizado o método adaptado por Peixoto *et al.* (2008) e como padrão quercetina (0,5 mg mL^{-1}) para construir a curva de calibração nas concentrações de: 0,04; 0,2; 0,4; 2; 4; 8; 12; 16; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 0,0637x - 0,0067$ $R^2 = 0,9991$). As análises foram realizadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo.

Os teores de taninos condensados foram determinados misturados 1 mg do extrato etanólico em uma solução de hidrometanólica (MeOH:H₂O: 80:20 v:v) e adicionado 5 mL de vanilina ácida (8% de HCl aquoso concentrado e 4% de vanilina em metanol). A catequina foi usada como padrão para construção da curva padrão e como branco o metanol. As misturas foram incubadas em banho-maria por 20 minutos, ao atingir a temperatura ambiente se fez a leitura em 510 nm (BROADHURST; JONES, 1978). Os resultados foram expressos como equivalentes de catequina em mg por 100 g de extrato.

O delineamento experimental foi de três repetições para cada concentração e o cálculo das médias foi acompanhado do desvio padrão.

A quantificação dos alcaloides totais foi desenvolvida utilizando 40 mL do extrato etanólico, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente, acidificado para pH entre 2,0 - 2,5 com HCl 1mol/L e 4 mL de reagente Dragendorff e centrifugado a 2400 rpm/30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo tratado com uma solução contendo 1 mL de álcool etílico; 2 mL de sulfito de sódio (1%) e novamente centrifugados (2400 rpm/30 minutos). O sobrenadante foi descartado e o resíduo tratado com ácido nítrico concentrado (2 mL). A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada. Desta solução, uma alíquota (1 mL) foi utilizada e adicionado em 5 mL de tiourea a 3% (p / v), homogeneizado e a leitura em espectrofotômetro em 435 nm. A solução de ácido nítrico e tiourea foi usada como branco e como padrão a berberina a linearidade foi obtida entre 40 e 200 $\mu\text{g/mL}$. O teor de alcaloides foi expresso em mg/100 g de peso seco do extrato (SREEVIDYA; MEHROTRA, 2003).

2.3 Obtenção dos isolados fitopatogênicos

Os isolados fitopatogênicos que foram utilizados no presente trabalho são provenientes da coleção de Microorganismos Fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS e oriundos de plantas de soja com sintomas típicos das doenças provocadas por estes patógenos, isolados no ano de 2017, que foram inseridos na plataforma do SISGen, para obtenção da autorização e registro de acesso ao patrimônio genético do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.

2.4 Atividade fungistática

Para avaliação das habilidades fungistáticas do extrato vegetal de *P. umbellatum*, os fungos fitopatogênicos foram crescidos previamente em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), apresentando sete dias de crescimento no dia do início do ensaio.

Para o teste de crescimento micelial, que foi realizado para todos os patógenos, foi preparada uma solução estoque, contendo 0,2 g do extrato etanólico de *P. umbellatum* em 100 mL de etanol (99,5%). A partir desta solução foram utilizadas alíquotas de 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4 mL, separadamente vertidas, em meio de cultura BDA fundente, até completar o volume de 100 mL, no qual foram obtidas as concentrações de 800, 1200, 1600, 2000 e 2400 $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Como controle foram preparadas duas soluções, uma contendo etanol (99,5%) adicionado ao meio BDA (2400 $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$), denominada solução etanólica e outra somente com o meio BDA (sem o extrato), a testemunha.

Foram vertidos 10 mL de meio das diferentes concentrações em placas de Petri, com quatro repetições para cada concentração. Após a solidificação do meio, foi depositado no centro de cada placa, um disco de 0,5 cm de diâmetro do micélio dos fungos, em ensaios separados, previamente repicados sete dias ao procedimento. Posteriormente, as placas foram vedadas com papel filme, e mantidas em câmara de crescimento, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial para todos os patógenos foi realizada por medidas diárias do diâmetro das colônias, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, ocorrendo até que a testemunha alcançasse os bordos da placa.

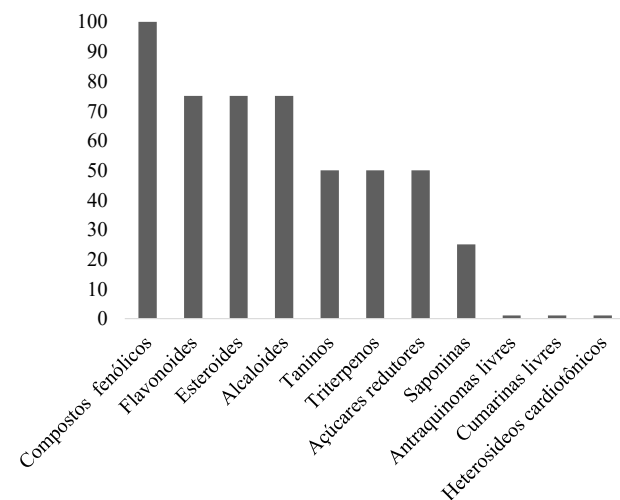
O delineamento experimental utilizado foi do tipo inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada uma das concentrações do extrato etanólico de *P. umbellatum*, a testemunha foi constituída de placas contendo meio de cultura sem adição de extrato.

3 Resultados e Discussão

Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *P. umbellatum* foi detectada a presença majoritária de compostos fenólicos (100%), seguido dos flavonoides, esteroides e alcaloides (75%), os taninos, triterpenos e açúcares redutores

(50%) e, com menor frequência (25%), as saponinas (Figura 1).

Figura 1 - Frequência (%) das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *P. umbellatum*, Campo Grande, MS.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para *P. umbellatum* foram identificados na planta cerca de 50 compostos pertencentes aos fenóis simples e derivados (ciclo-hexano oxigenado, hidroquinonas, ácido benzoico), polifenóis (flavonoides, lignanas, neolignanas), terpenos, amidas e alcaloides (PARMAR *et al.*, 1997; TABOPDA *et al.*, 2008, SILVA *et al.*, 2014), o que está de acordo com os fitoconstituintes apresentados na Figura 1 e Quadro 1.

Quadro 1 - Comprimento de onda máximo na região visível por UV-visível do extrato etanólico de *Piper umbellatum*, Campo Grande, Brasil

Classe de Metabólitos Predominantes	λ_{max} (nm)	Dados da Literatura*
Compostos Fenólicos	260,0 nm	Entre 220 – 290 (1)
Flavonoides	Entre 270 – 285 nm	Entre 240 – 285 nm (2)
	Entre 320 – 385 nm	Entre 300 – 400nm (2)
Esteroides	Entre 210 nm e 220 nm	entre 206 nm e 220 nm (3)
Alcaloides	193 nm	194 nm
	297nm	220, 380 nm

Fonte: Dados da pesquisa.

A caracterização do extrato etanólico e a confirmação das classes de metabólitos secundários, evidenciadas na prospecção fitoquímica, ocorreu também por espectrofotometria no UV/visível (Quadro 1),

Foi possível verificar a existência de similaridades entre o *screening* fitoquímico e as bandas máximas de absorção dos constituintes majoritários, os compostos fenólicos (100%), flavonoides (75%) e alcaloides (75%). O espectro UV mostra uma forte absorção em 260,0 nm, característico de compostos fenólicos (Quadro 1). O espectro se estende além dos 385

nm, região que compreende a banda de absorção UV de flavonoides (ZUANAZZI *et al.*, 2017).

É possível observar, no espectro de UvVisível 2 bandas de absorção, uma entre 270 – 285 nm ($\lambda_{\text{máx. MeOH}}$), na forma de um ombro, e uma segunda banda entre 320 – 385 nm ($\lambda_{\text{máx. MeOH}}$), característico de flavonoides (Quadro 1). Em geral, os flavonoides apresentam bandas entre 240 – 285 nm (Banda II), correspondente à absorção do anel A (hemiacetal) e uma segunda banda entre 300 – 400 nm (Banda I), que representa a absorção do anel B (ZUANAZZI *et al.*, 2010). O perfil das moléculas individuais de flavonoides depende do número de grupos hidroxilas presentes e sua localização (JURASEKOVA *et al.*, 2006).

A banda de absorção entre 206 nm e 220 nm observada no espectro para o extrato etanólico é comum para esteroides (Quadro 1), um fitohormônio com estrutura básica formada de 17 átomos de carbono, dispostos em quatro anéis ligados entre si, essa estrutura química é denominada de Ciclo-pentano-peridro-fenantreno (Anéis A, B e C), os quais estão ligados a um anel ciclopentano (Anel D) (PÉREZ; ESCANDAR, 2013). Porém, dependendo do sistema de conjugação de dieno (homo ou heteroanular) com a presença do sistema enona, caracteres hexocíclicos de ligações duplas e outras conjugações adicionais, entre outras na molécula de esterol, seu espectro pode apresentar uma absorção máxima por exemplo entre 220 e 350 nm (KASAL *et al.*, 2010).

Os achados fotoquímicos são confirmados com os teores de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides que podem ser considerados elevados (Quadro 2). Investigações fitoquímicas com gênero *Piper* (família Piperaceae), que inclui um grande número de espécies, conhecidas popularmente como Pariparoba, elucidaram vários compostos de classes típicas, tais como: amidas, terpenos, derivados do ácido benzoico, carotenos, hidroquinonas, lignanas, neolignanas e alguns alcaloides (REGASINI *et al.*, 2008, REGASINI *et al.*, 2009; COTINGUIBA *et al.*, 2009).

Quadro 2 - Resultados Perfil químico (UV visível), da quantificação de fenóis totais e flavonoides do extrato etanólico das folhas de *Piper umbellatum*, Campo Grande, MS

Extr.	Fen. Tot. (mg g ⁻¹)	Flav. (mg g ⁻¹)	Tan. (mg g ⁻¹)	Alcaloides (mg g ⁻¹)
Etanólico	325,86 ± 0,82	199,51 ± 0,132	55,45 ± 2,09	78,75 ± 2,55

*Fenóis totais (mg de EAG g⁻¹ ± DP). Flavonoides (mg de Querc. g⁻¹ ± DP). Taninos Condensados (mg de cat. g⁻¹ ± DP). Alcaloides (mg de berberina g⁻¹ ± SD). * Mean ± SD.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os constituintes típicos ainda do gênero *Piper* estão os alcaloides e amidas, a maioria dos compostos conhecidos são as piperidinas, pirrolidinas ou isobutilaminas e tem como o principal representante a piperina. Para *P. umbellatum*, a classe citada são N-benzoilmescalina (ISOBE *et al.*, 2002), piperumbelactanas (TABOPDA *et al.*, 2008), este último pertence ao grupo das piperolactamas, não são comuns, mas

espécies do Gênero, sendo classificadas como aporfinoídes, uma vez que seus esqueletos são semelhantes aos alcaloides aporfínicos (KUMAR *et al.*, 2003). As piperolactamas possuem absorção em UvVisível (MeOH) entre 194 nm e 380 nm, valores similares também encontrados no extrato etanólico das folhas de *P. umbellatum*, uma banda intensa em 193 nm e uma segunda banda em 297nm.

O extrato etanólico de *P. umbellatum* apresentou percentuais expressivos de fenóis totais 325,86 ± 0,82 mg de ácido gálico/100g ($Y = 0,078x - 0,031$ fenóis $R^2 = 0,9959$) em quantidades superiores a outras espécies do Gênero, como para as três variedades de *Piper betel* os valores obtidos mostraram teores entre 820,53 ± 10,8 e 72,25 ± 1,42 µg de ácido gálico/g (RATHEE *et al.*, 2006), os teores de fenóis totais também foram inferiores para *Piper cubeba* (123,1 ± 0,05 µg de ácido gálico/g) e *Piper nigrum* (62,3 ± 0,08 µg de ácido gálico/g) (NAHAK; SAHU, 2011), assim como para as folhas de *Piper nigrum* 0,36 mg ácido gálico/mL GAE (SAPAM *et al.*, 2018).

Para os teores de flavonoides totais, os valores obtidos foram de 199,51 ± 0,132 mg de quercetina/100g e foram superiores aos obtidos por Silva Junior *et al.* (2014), 165mg quercetina/g ($Y = 0,132x + 0,0353$ $R^2 = 0,9949$), para as folhas de *P. umbellatum*. Não foram encontrados valores para os taninos nas fontes pesquisadas, porém podem ser considerados expressivos em relação aos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides.

Os resultados dos teores de fenóis e flavonoides obtidos para a espécie em estudo e em comparação para outras do gênero *Piper* demonstram uma variabilidade dos teores de fenóis e flavonoides, o que estimula a continuidade de estudos fitoquímicos com esta espécie.

O extrato etanólico de *P. umbellatum* possui predominância de polifenóis e derivados (fenólicos e flavonoides). Os flavonoides, glicoflavonoides, terpeno glicosilado e lignanas foram isolados das folhas da planta em estudo (BALDOQUI *et al.*, 2009). Esses grupos apresentam, em sua estrutura, o grupo carboxila (OH), que têm a capacidade de se ligar a receptores enzimáticos de micro-organismos, inibindo a síntese de proteínas e favorecem modificações metabólicas de patógenos, inibindo a síntese de ácidos nucleicos durante a formação da membrana citoplasmática e o metabolismo energético. Enquanto os triterpenos têm um esqueleto lipofílico básico, o que facilita a quebra da membrana celular e com sua parte polar dentro da célula, esses atuam desabilitando os receptores residuais de aminoácidos de fungos (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Os metabólicos secundários produzidos pelas plantas têm sido objeto de estudos e por apresentarem atividade antimicrobiana se mostram promissores para o controle de fitopatógenos (BALBI-PEÑA *et al.*, 2006). Esses compostos provocam a interrupção na membrana plasmática, inibindo a ação das enzimas fúngicas, ocasionando desorganização no conteúdo celular de diferentes espécies de fungos (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000).

Da mesma forma, os compostos fenólicos e taninos são considerados inibidores de enzimas hidrolíticas produzidas por patógenos e responsáveis pela resistência dos tecidos vegetais. Assim como os flavonoides e taninos também atuam como elicitores e/ou mecanismos químicos de defesa contra vírus, bactérias e fungos sua toxicidade depende da quantidade de grupos metilados e do número de substituintes na formação do anel aromático, o que os torna mais tóxicos, interferindo na constituição das membranas celulares de fungos (ANDRADE *et al.*, 2017).

Os resultados dos teores de fenóis e flavonoides obtidos para a espécie em estudo e em comparação para outras do gênero *Piper* demonstraram variabilidade dos teores de fenóis e flavonoides, o que estimula a continuidade de estudos fitoquímicos com esta espécie.

Para o teste *in vitro* se observa no Quadro 3, que as concentrações testadas não proporcionaram inibição do crescimento micelial do fungo *M. phaseolina*, já para *R. solani* se observa que a concentração de 1200 µg/100 mL do extrato etanólico de *P. umbellatum* reduziu o crescimento micelial deste fungo, em relação à testemunha e outras concentrações testadas. No entanto, após o término das avaliações com o fungo *R. solani*, em todas as concentrações do extrato não houve observação de micro escleródios, quando comparados à testemunha, que apresentou início de formação destas estruturas dois dias após o término das avaliações do ensaio *in vitro*. Para o fungo *M. phaseolina* não foram observadas peculiaridades com relação à morfologia da colônia.

Quadro 3 - Crescimento micelial de *M. phaseolina* e *R. solani* sob diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *P. umbellatum*

Crescimento micelial (mm)		
Tratamentos	<i>M. phaseolina</i>	<i>R. solani</i>
Testemunha	2.57a*	2.25a
800 µg/100 mL	2.60a	2.31b
1200	2.60a	2.19c
1600	2.54a	2.30b
2000	2.57a	2.35b
2400	2.52a	2.34b

*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si segundo Tukey (5%).

Fonte: Dados da pesquisa.

Avaliações *in vitro* sobre o crescimento micelial de fungos, em relação às diferentes concentrações de extratos vegetais, são usados para selecionar e reduzir o número de tratamentos que poderão ser testados *in vivo*, no entanto, as concentrações testadas *in vitro* não proporcionam o controle esperado. As concentrações testadas no presente trabalho estão entre as testadas e indicadas para fitopatógenos, variando de 125 a 3000 µg/100 mL, conforme metodologias de diferentes autores (ARAÚJO *et al.*, 2014; BRITO; NASCIMENTO, 2015; PANSERA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2018).

Para as concentrações 800, 1600, 2000 e 2400 µg/100 mL, nota-se efeito estimulador para o fungo *R. solani*. É

possível levantar a hipótese de que embora os alcaloides sejam produtos naturais típicos de plantas, e por apresentarem nitrogênio em sua cadeia, é possível haver interferência no processo, uma vez que o elemento químico nitrogênio é essencial para constituição molecular e celular de micro-organismos (SANTOS *et al.*, 2011).

Além disso, no gênero *Piper* é comum a presença de micro-organismos endofíticos que podem produzir toxinas e alterar a composição dos metabólitos secundários, aumentando a taxa de alcaloides das plantas, aumentando a quantidade de açúcares e outros metabólitos, que ao invés de interferirem negativamente no crescimento micelial, podem estimular o crescimento fúngico (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Esta pode ser uma das interferências observadas sobre as concentrações testadas, uma vez que não foi observada redução dos patógenos. Sangeetha e Rawal (2008) relatam que meios com elevadas concentrações de açúcar favorecem o desenvolvimento dos fungos e monossacarídeos por serem uma fonte de carbono para os fungos, um componente importante para o crescimento e esporulação está relacionado ao seu processo de nutrição.

Este fato fica comprovado pela avaliação de açúcares redutores do extrato, com frequência de 50%, o que comprova que a presença destes como fonte de carbono pode ter influenciado diretamente o crescimento micelial dos fitopatógenos e, dependendo do tipo de açúcar há influência positiva no crescimento micelial, como já foi relatado por Andrade *et al.*, (2017). Segundo Sangeetha e Rawal (2008), os monossacarídeos são fonte de carbono para fungos, componente essencial para seu crescimento e esporulação, uma vez que estão relacionados ao seu processo de nutrição.

Uma perspectiva para aplicação dos resultados deste trabalho está na elaboração de produtos fitossanitários naturais para o manejo integrado de doenças de plantas. Em função da presença de metabólitos, que podem apresentar atividade antifúngica, é recomendável a continuação do estudo fitoquímico de *P. umbellatum*, para isolamento e identificação de substâncias responsáveis pela atividade e determinar suas frações ativas. Contudo, novas pesquisas devem ser realizadas, tendo em vista que tais estudos ainda são escassos, visando investigação fitoquímica de extratos vegetais, no controle de agentes fitopatogênicos.

4 Conclusão

O extrato etanólico de *P. umbellatum* testado teve efeito fungistático *in vitro* sobre o crescimento micelial do fungo *R. solani*.

Foram identificados onze metabólitos secundários (açúcares redutores, taninos, esteroides, antraquinonas, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, triterpenos, compostos fenólicos, saponinas, alcaloides e flavonoides).

Referências

- ANDRADE, B. S. *et al.* Fitoquímica, potencial antioxidante e antifúngico de *Byrsonima crassifolia* no controle de fitopatógenos de solo. *Braz. J. Biology*, v.78, n.1, 2017. doi: 10.1590/1519-6984.166532
- ARAÚJO, E. R. *et al.* Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.49, n.49, p.88-94, 2014.
- BALDOQUI, D.C. *et al.* Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). *Química Nova*, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.
- BALBI-PÉÑA, M. I. *et al.* Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e *curcumina* – I. avaliação *in vitro*. *Fitopatol. Bras.*, v.31, n.3, p.310-314, 2006. doi: 10.1590/S0100-41582006000400012.
- BRITO, N.M.; NASCIMENTO, L.C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.17, n.2, p.230-238, 2015. doi: 10.1590/1983-084X/10_057.
- BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, v.29, n.9, p.788-794, 1978. doi: 10.1002/jsfa.2740290908.
- CELOTO, M. I. B. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Sci. Agronomy*, v.30, n.1, p.1-5, 2008. doi: 10.4025/actasciagron.v30i1.1104.
- COTINGUIBA, F. *et al.* Piperamides and their derivatives as potential antitrypanosomal agents. *Med. Chem. Res.*, v.19, n.1B, 2009. doi: 10.1007/s00044-008-9161-9.
- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antim. Agents*, v.26, n.5, p. 343-356, 2005. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- FIGUEREDO, M.L.C.; MARTINS-DIAS, A.M.P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 41, n. 12, p.1693-1698, 2006.
- GARCIA, A. *et al.* Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ricceley*, v. 28, n.1, p.48-57, 2012.
- GONÇALVES G.G.; MATTOS L. P. V.; MORAIS LAS. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. *Horticul. Bras.*, v.27, p.S102-S107, 2009.
- ISOBE, T.; OSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *helicobacter pylori* of *Bras. Med. Plant*, v.122, n. 4, p.291-294, 2002.
- JURASEKOVA, Z. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids. *J. Raman Spectroscopy*, v.37, n.11, p.1239-1241, 2006. doi: 10.1002/jrs.1634.
- KASAL, A.; BUDESINSKY, M.; GRIFFITHS, W. J. Spectroscopic methods of steroid analysis. In: *Steroid analysis*, 2010. p. 27-161.
- KUMAR, S. *Spectroscopy of organic compounds*. New Delhi: New Age International, blishers, 2006.
- KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxaporphines and their biological activities. *Nat. Prod. Reports*, v.20, n.6, p.565-583, 2003. doi: 10.1039/B303648K.
- MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, 2005.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiências em plantas ornamentais e medicinais. *Trop. Plant Pathol.*, v.33, p.31-34, 2008.
- NAHAK, G.; SAHU, R. K. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *J. Appl. Pharm. Scie.*, v.1, n.8, p.153, 2011.
- PANSERA, M. R. *et al.* Utilização de tinturas vegetais e óleo essencial no controle do mofo-branco em alface. *Rev. Bras. Agroecol.*, v.10, p.87-91, 2015.
- PARMAR, V. S. *et al.* Fitoquímica do gênero *Piper*. *Elsevier Scie.*, v.46, n. 4, p.597-673, 1997.
- PÉREZ, R. L.; ESCANDAR, G. M. Spectrofluorimetric study of estrogen-cyclodextrin inclusion complexes in aqueous systems. *Analyst*, v.138, n.4, p.1239-1248, 2013.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, n.44, p.683-689, 2008. doi: 10.1590/S1516-93322008000400015.
- RATHEE, J. S. *et al.* Antioxidant activity of Piper betel leaf extract and its constituents. *J. Agricul. Food Chem.*, v. 54, n. 24, 9046-9054, 2006. doi: 10.1021/jf061679e.
- REGASINI, L. O. *et al.* Atividade tripanocida de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev. Bras. Farm.*, v.19, p.199-203, 2009.
- REGASINI, L. O. *et al.* Radical Scavenging Capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Latin Am. J. Pharm.*, v.27, n.6, p.900-903, 2008.
- RODRIGUES, E. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium sp.* *Acta Scie. Agron.*, v.28, n. 1, p.123-127, 2006.
- RODRIGUES, E. R. *et al.* *Pothomorphe umbellata*: antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. *J. Mycol. Méd.*, v.22, p.265-269, 2012. doi: 10.1016/j.mycmed.2012.05.005.
- SANGEETHA, C. G.; RAWAL, R. D. Nutritional Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. the incitant of mango anthracnose. *World J. Agricul. Scie.*, v.4, n.6, p.717-720, 2008.
- SANTOS, J. O. *et al.* Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de lipases pelo fungo *Fusarium oxysporum* ATCC 48112 por fermentação submersa. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 63, 2011, Anais eletrônicos. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/5742.htm>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina Ciênc. Biol. Saúde*, v.32, n.2, p.199, 2011. doi: 10.5433/1679-0367.2011v32n2p199.
- SAPAM, R. *et al.* Screening of phytochemicals and determination of total phenolic content, anti-oxidant and antimicrobial activity of methanolic extract of *Piper nigrum* leaves. *Pharm. Res.*, v.8, n.2, p.1354-1360, 2018.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Rev. Floresta*, v.30, n.12, p.129-137, 2000. doi: 10.5380/rev.v30i12.2361.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SILVA JUNIOR, I. F. *et al.* Evaluation of acute toxicity,

antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. *J. Ethnopharmacol.*, v.151, n.1, p.137-143, 2014. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.011.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. *Química Nova*. LCT: Rio de Janeiro, 2014.

SOUSA, I. et al. Atividade fungitóxica de extratos de *Piper* sp. Contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Rev. Am. Ciênc. Amb.*, v.9, n.3, p.50-56, 2018. doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2018.003.0005.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de

cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*, n.30, p.351-355, 2007. doi: 10.1590/s0100-40422007000200021.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with dragendorff's reagent in plant materials. *J. AOAC Int.*, v.86, n.6, p.1124-1127, 2003.

TABOPDA, T. K. et al. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 8, p. 1726-1731, 2008. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.018.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, 2010. p.577-614.