

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO “in vitro” de FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.

ROZANE APARECIDA DA SILVA

2000

ROZANE APARECIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO “in vitro” DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

ORIENTADOR

Prof. Dr^a. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Rozane Aparecida da

**Avaliação de extratos vegetais na inibição "in vitro" de fungos
fitopatogênicos/ Rozane Aparecida da Silva. –Lavras: UFLA, 2000**

44p.: il.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

**1. Alecrim, Maria-sem-vergonha, Malva branca, Trevo peludo,
Cipó-de-São-João. 2. *Pyrostegia venusta*, *Thunbergia alata*, *Oxalis
hirsutissima*, *Waltheria indica*, *Baccharis dracunculifolia*. 3. Planta
medicinal. 4. Abordagem fitoquímica 5. Fungitoxidade. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-6333.88

-632.952

ROZANE APARECIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO “in vitro” de
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 29 de fevereiro de 2000

Prof. Paulo Estevão de Souza UFLA
Prof. Manuel Losada Gavilanes UFLA
Prof. Celeste Maria Patto de Abreu UFLA

Maria das Graças Cardoso
Prof.^a Dra. Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

DEDICO

*Aos meus Pais,
Pedro Alves da Silva Filho e
Iolanda Rodrigues da Silva*

OFEREÇO

*Ao meu querido irmão Robson.
Ao meu marido Marcelo e ao nosso Vinícius, que está chegando.*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, por traçar-me um caminho tão especial!

À Professora Maria das Graças Cardoso pela amizade, estímulo, orientação e paciência, que com seu coração enorme e com a sua grande vontade de ajudar ao próximo, me estendeu a mão, fez espelhar-me no seu trabalho, crescer, e conduziu-me ao término deste.

Ao Professor Manuel Losada Gavilanes (DBI-UFLA), pela co-orientação, amizade e sugestões botânicas.

À Professora Celeste Maria Patto de Abreu pela amizade, carinho e orientação na análise estatística.

Ao Professor Paulo Estevão de Souza (DFP-UFLA), pela co-orientação e sugestões.

Ao meu marido Marcelo Augusto Mendes da Silva, pelo amor, amizade, ajuda e acima de tudo pela paciência durante a fase final deste trabalho.

Ao Chefe do Departamento de Química, Professor Custódio Donizete dos Santos, pela atenção e amizade.

Ao Professor Mário Guerreiro (DQI) pela amizade e apoio científico.

Ao Departamento de Química (DQI), Funcionários e Professores, pela convivência, amizade e oportunidade da realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, Mário Lúcio e Edson Pozza, pela atenção.

Aos Colegas de Curso, Suzan (Coleguinha), Alan, Joerley e Renato, pela amizade, convivência e apoio.

Aos Amigos Queridos do Laboratório de Química, Luciano, Andréa, Ana Paula, Cleusa, Renata, Fábio, Fred, Goiano, Gustavo, Carolina, Marvin, Ana Cláudia, Vanisse e Ana Ilda.

Aos amigos, Juliano e Ellen, pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, Marcos, Ana, Heloisa, Zé Marcos, Cássia, Jurema, Alessandra, Mauro e Viviane, pela amizade.

As laboratoristas do Departamento de Sementes Angela e Terezinha ,pelo apoio.

Aos Pesquisadores da EPAMIG, Sára Maria Chalfoun, Vicente Luis de Carvalho, Elifas Nunes de Alcântara, Gabriel Ferreira Bartholo e Francisco Dias Nogueira, pela ajuda e amizade.

Aos amigos Marcelo Cláudio Pereira e Carol (EPAMIG).

Às amigas, Tatiana C. Grossi Vieira e Flávia Dionízio Pereira, pela amizade, apoio e carinho.

A Maria Cristina Rios, pela análise estatística, e ao Professor Daniel Furtado (DEX-UFLA), pelas sugestões.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Aspectos biológicos fúngicos.....	8
2.2 Óleos essenciais.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material botânico.....	10
3.1.1 Botânica das espécies vegetais.....	10
3.1.2 Obtenção dos extratos, empregando-se diferentes solventes.....	13
3.1.3 Purificação dos extratos obtidos em clorofórmio do caule e folha de <i>Thumbergia alata</i>	15
3.1.4 Obtenção do óleo essencial das plantas.....	16
3.2 Avaliação do efeito sobre o crescimento micelial dos extratos sobre os fitopatógenos.....	18
3.3 Avaliação do efeito dos extratos brutos de caules e folhas de <i>Thumbergia alata</i> sobre a germinação de esporos de <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	19
3.4 Identificação química dos extratos.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Avaliação da inibição micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum dematium</i>	21
4.1.1 Utilização dos extratos brutos de caules na inibição micelial de <i>Colletotrichum dematium</i>	21

4.1.2 Utilização dos extratos brutos de caules na inibição micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
4.1.3 Utilização dos extratos brutos de folhas na inibição micelial de <i>Colletotrichum dematium</i>	27
4.1.4 Utilização dos extratos brutos de folhas na inibição micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	30
4.2 Fracionamento químico	33
4.3 Avaliação da germinação de esporos de <i>Fusarium oxysporum</i> para <i>Thumbergia alata</i>	38
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS	45

LISTA DE ANEXOS

TABELA A1. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com <i>Colletotrichum dematim</i> com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.	45
TABELA A2. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com <i>Fusarium oxysporum</i> com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.....	45
TABELA A3. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com <i>Colletotrichum dematim</i> com extratos brutos de folhas 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.....	46
TABELA A4. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com <i>Fusarium oxysporum</i> com extratos brutos de folhas de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.....	46

RESUMO

SILVA, R. A. da. Avaliação de extratos vegetais na inibição "in vitro" de fungos fitopatogênicos. Lavras: UFLA, 2000, 44p. (Dissertação - Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)*

Na natureza, a grande maioria das plantas, especialmente àquelas com potencialidades medicinais, dispõe de mecanismos secundários de interesses diversos. Partindo deste princípio, 5 plantas de ação medicamentosa, *Thunbergia alata*, *Oxalys hirsutissima*, *Waltheria indica*, *Baccharis dracunculifolia* e *Pyrostegia venusta*, foram submetidas à extração química, visando uma aplicação no controle biológico como um antifúngico natural, sem causar danos ao meio ambiente. Os extratos foram obtidos a partir dos caules e das folhas de cada planta em estudo, através de extrações químicas a frio, e submetidos a um processo de extração líquido-líquido, com solventes de polaridades crescente. Posteriormente, foram purificados através de cromatografia de camada líquida, monitorados por CCD, utilizando a metodologia para cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de camada líquida (CCL). Foram avaliados os efeitos dos extratos de caules e folhas das 5 plantas sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum dematium* nas concentrações de 100 e 500 ppm. Também avaliou-se a germinação de esporos dos fungos utilizando os extratos brutos de *Thunbergia alata* e *Oxalys hirsutissima*. O crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum dematium* foi inibido pelos extratos brutos das 5 plantas; entretanto, *Thunbergia alata* e *Oxalys hirsutissima* apresentaram uma redução micelial significativa entre as demais plantas. A germinação de esporos foi inibida em 100% nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 ppm para folha e caule de *Thunbergia alata* no extrato

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientador), Paulo Estevão de Souza-UFLA e Manuel Losada Gavilanes-UFLA (Co-orientador)

clorofórmio. Pode-se concluir que entre os solventes químicos utilizados, clorofórmio foi o ideal para extrair as substâncias que provocaram a inibição. Quanto ao efeito das aplicações das concentrações de 100 e 500 ppm, estas não interferiram nos resultados de inibição no crescimento micelial. Pelos dados obtidos, conclui-se que os extratos brutos vegetais das 5 plantas foram eficientes no controle dos fitopatógenos estudados.

ABSTRACT

SILVA, R.A. Evaluation of plants of extracts "in vitro" inhibition of phytopathogenic fungi. Lavras: UFLA, 2000. 44p. (Dissertation – Master in Agrochemistry/ Agrobiochemistry)*

In nature, the vast majority of plants, mainly those with medicinal potentialities possesses secondary mechanisms of varying interests. Starting from this principle, 5 (five) plants of medicamentous action, *Thunbergia alata*, *Oxalys hirsutissima*, *Waltheria indica*, *Baccharis dracunculifolia* and *Pyrostegia venusta*, were submitted to chemical extraction, aiming at application in biological control as a natural antifungic without causing damage to environment. The extracts were obtained from the stems and leaves of each plant under study by means of cold chemical extractions and submitted to a liquid-liquid partition process with growing polarity solvents. After, they were purified by utilizing thin layer chromatography (TLC) and liquid layer chromatography (LLC). The effect of the stem and leaf extracts of the 5 (five) plants upon the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum dematium* at the concentrations of 100 and 500 ppm. Also, the germination of spores of the fungi was evaluated by utilizing the crude extracts of *Thunbergia alata* and *Oxalys hirsutissima*. The mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum dematium* was inhibited by the crude extracts of the 5 (five) plants; nevertheless, *Thunbergia alata* and *Oxalys hirsutissima* presented a significant mycelial reduction among the others. Spore germination was inhibited by 100% at the concentrations of 10, 50, 100 and 500 ppm for the stems and leaves of *Thunbergia alata* in the chloroform extract. It can be ended that enters the used chemical solvents, chloroform went the ideal to extract nourish that provoked inhibition. With relations to the effects of the applications of the

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Major Professor), Paulo Estevão de Souza-UFLA e Manuel Losada Gavilanez – UFLA (Co-advisers).

concentrations of 100 and 500 ppm, these ones did not interfere in the inhibition results of the mecelial growth. From the data obtained it follows that the crude plant extracts of the 5 (five) plants were efficient in the control of the phytopathogens studied.

1 INTRODUÇÃO

As plantas, pela sua pureza de vida, pela fidelidade em seguir a Lei Maior que as rege, guardam em si potenciais de cura, de fitotoxicidade, propriedades estas que até o momento, são quase totalmente ocultas e inacessíveis. Uma porta agora se abre aos que se dedicam a conhecer tal realidade, a fim de que esse reino possa prestar, ainda mais amplamente, seu serviço ao mundo. Consideradas ou não seres espirituais, as plantas, por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquirirão fundamental importância na medicina popular.

Canalizar recursos públicos para a pesquisa de fitoterápicos é conveniente, uma vez que a utilização das plantas tidas como medicinais está diretamente atrelada à questão econômica, como atividade agrícola e industrial, à questão social, por ter um menor custo de obtenção, à questão iatrogênica, no sentido de possuir efeitos colaterais reduzidos ou mesmo inexistentes, e ainda à questão da soberania nacional, pela exploração e conhecimento dos seus recursos naturais.

Os estudos fitoquímicos tradicionais com espécies brasileiras conduziram, até o momento, ao isolamento de grande número de moléculas, no entanto, a grande maioria continua sem qualquer aplicação devido à falta de biotestes preliminares eficientes para serem triadas. Balandrim et al. (1985).

Segundo Balandrim et al. (1985), estima-se que existam cerca de 500.000 espécies de plantas na terra, com aproximadamente 250.000 espécies conhecidas, sendo que apenas uma pequena parcela foi investigada fitoquimicamente e uma fração ainda menor foi submetida a ensaios para verificação de atividades biológicas ou farmacológicas. Assim, a pesquisa de novos compostos

biologicamente ativos vem a ser uma das maiores tarefas dos fitoquímicos em todo o mundo. O processo que vai da escolha da planta até a obtenção de uma substância biologicamente ativa é longo e requer uma visão multidisciplinar. Portanto, a descoberta de extratos promissores, e o subsequente fracionamento biomonitorado para o isolamento das substâncias ativas, requer bioensaios simples, rápidos, reprodutíveis e baratos, que sejam compatíveis com o grande número de amostras a serem analisadas.

Sabe-se que da última década para cá, a conscientização química sobre o uso indiscriminado e incorreto de defensivos agrícolas no ambiente rural e urbano, causando prejuízos aos ecossistemas e ao homem, tem motivado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas.

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividades e qualidade de produção visadas pela agricultura moderna. Procura-se, cada vez mais, usar fungicidas específicos para se evitar a contaminação do meio ambiente, os quais inibem seletivamente os processos metabólicos específicos, compartilhados apenas por grupos restritos de fungos, atuando tão somente contra os patógenos visados. A alta especificidade de ação leva à alta fungitoxicidade inerente aos fungos sensíveis e à baixa fitotoxicidade.

A seletividade permite a um fungicida atuar sistematicamente, aumentando a sua eficiência, que é; ao mesmo tempo, a causa de sua vulnerabilidade. Os fungos, como todos os organismos vivos, são geneticamente maleáveis e podem, através de mutações, tornarem-se resistentes a fungicidas específicos que atuam em um ou em poucos processos metabólicos vitais. A pesquisa constante e a procura de novos grupos químicos com efeitos fungicida tornam-se de fundamental importância. Na natureza, a grande maioria das plantas

são resistentes aos diferentes patógenos, e esta resistência pode estar relacionada à existência de fungicidas naturalmente produzidos. Portanto, espera-se que a descoberta de substâncias naturais com efeito fungicida possa contribuir com o controle das doenças das plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fungitóxico de extratos de plantas medicamentosas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os vegetais possuem aspectos comuns no seu metabolismo, sintetizando substâncias que são vitais a todos, como a celulose, o amido, os lipídeos e aminoácidos; estes são os constituintes do metabolismo primário. No metabolismo secundário, a síntese bioquímica varia de espécie para espécie produzindo substâncias particulares, cujas funções ainda não foram definidas na maioria dos casos. Segundo Thorpe (1990), os metabólitos secundários das plantas constituem princípios ativos de diversos produtos químicos orgânicos que são de interesse farmacêutico e industrial.

Algumas substâncias produzidas pelos vegetais têm funções de adaptação ao meio e são armas da competição biológica. Sabe-se que, de uma forma geral, vegetais cultivados em condições ideais de fertilidade e ambiente e sem exposição à competição por espaço com outros vegetais, produzem uma quantidade mínima destas moléculas. Já, aqueles sujeitos às adversidades do meio e à competição com outras plantas muitas vezes produzem muito destas substâncias (Thorpe, 1990).

Para Botsaris (1995), os princípios ativos sintetizados por vegetais são uma função de defesa contra agressões de parasitas biológicos. Os vegetais também podem ser agredidos por fungos, bactérias, protozoários e vírus. Segundo Agrios (1988), estes podem causar lesões em plantas, podendo ser localizadas em folhas, caules, flores, frutos, e em um estágio mais avançado, pode ocorrer a expansão e a coalescência.

A ciência fitoterápica tem sido progressista. Antigamente sabia-se que certas ervas curavam algumas doenças, mas não se sabia o porquê. Hoje explicam-se os efeitos pelas causas. As virtudes das plantas consideradas medicinais devem-se, em grande parte, às moléculas nelas contidas, como

alcalóides, terpenos, fenóis e derivados, flavonóides, ácidos carboxílicos e seus derivados, etc. (Baladrim et al.1985).

Para Korolkovas e Burckhalter (1995), agentes fúngicos são drogas empregadas contra infecções causadas por fungos. Podem ser fungistáticos ou fungicidas. Agentes fungitóxicos são também utilizados no tratamento de plantas, sementes, solos e pinturas, bem como protetores foliares, conservadores de produtos industriais (polpa, couro) e conservadores de madeira, entre outras finalidades. Estima-se que os fungicidas sejam empregados no cultivo de metade da safra mundial de alimentos. O valor da produção de fungicidas chega a 50 milhões de dólares, representando cerca de 10% das vendas mundiais de agrotóxicos.

Segundo este mesmo autor, alguns agentes antifúngicos são conhecidos há muito tempo, embora a maior parte tenha sido introduzida recentemente. McCallan (1967) dividiu a história desses agentes em três eras distintas: a era do enxofre (até 1882); a era do cobre (1882 a 1923) e, finalmente a era dos fungicidas orgânicos. Na primeira era, séc. VIII a.C., Homero menciona o emprego do enxofre como purificante. Desde esta época, surgiram alguns compostos com propriedades fungicidas: arsênio, cloreto de zinco, glicerídios, mercúrio e sulfato de cobre. Já a segunda teve início com a introdução de calda bordalesa. A procura por formas de cobre menos tóxicas resultou nos assim chamados fungicidas de cobre fixo, constituídos por quatro grupos: sulfatos básicos, cloretos básicos, óxidos e diversos grupos de silicatos de cobre, fosfatos e zeólitos. Em 1934 iniciou-se a terceira era, que se caracterizou pelo desenvolvimento de fungicidas orgânicos muito eficientes e, em alguns casos, altamente específicos.

De acordo com Cardoso (1995), diversos compostos com átomos de N, O e S, separados por um ou mais átomos de carbono, têm sido estudados e descritos

na literatura como compostos que apresentam atividade fungicida. Segundo Schwinn (1983) e Schwinn e Staub (1982), a partir de 1970, o desenvolvimento de fungicidas antioomicetos teve um grande avanço. Nesta década, com o advento e com o uso de fungicidas sistêmicos, o controle químico de fungos problemáticos, como os oomicetos, sofreu grandes mudanças. Esses fungicidas são seletivos e específicos e atuam contra os patógenos alvos sem serem fitotóxicos às culturas.

Trabalhos de Oliveira et al. (1992) mostraram a eficiência de extratos de *Mimosa scabrella* sobre o fungo *C. lagenarium*. Nestes, foram identificados e comprovadas a presença de compostos fenólicos e derivados.

Posteriormente, Laranjeira et al. (1995a,b), utilizando extratos de caroá e sisal sobre culturas de *Fusarium oxysporum* F. sp. *phaseoli*, observaram a presença de substâncias alelopáticas. Depois de vários testes, concluíram que dependendo das concentrações adicionadas ao meio de cultura, os extratos foram capazes de inibir o crescimento micelial e a produção de esporos dos fungos referidos anteriormente. Em outro estudo, Laranjeira et al. (1995b) utilizaram extratos obtidos da raspa do caule de juazeiro e de folha de sisal no controle do fungo *Botryoploidia theobromae*, agente casual da morte da mangueira. Usaram, como meio de cultura, BDA acrescido de diferentes concentrações de extratos de juazeiro e sisal. Concluíram que os extratos testados apresentaram alterações no crescimento micelial, produção e fertilidade de picnídios de *B. theobromae*.

Rodrigues et al. (1995), estudando extratos de duas espécies vegetais *Lonchocarpus* sp e *Pilocarpus* sp sobre o fungo *Sclerotium rolfsi*, um importante patógeno do solo, avaliaram a germinação, crescimento micelial (medido ortogonalmente) e a produção de escleródios (por contagem). Concluíram que não houve influência das concentrações e espécies vegetais sobre a germinação e

crescimento micelial do fungo em estudo, mas para a produção de escleródios, estes dois fatores foram significativos.

A eficiência da erva medicinal *Cymbopogon citratus* (capim limão) no controle de fitopatógenos e de plantas daninhas em feijoeiro foi estudada por Valarini, Frighetto e Spadotto (1995). Estes comprovaram que o óleo essencial da planta a 10%, obtido das folhas, inibiu totalmente o crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *phaeseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Além disto, observaram a inibição total da germinação de sementes de *Digitaria horizontalis* (capim colchão), *Sorghum halepense* (capim massambará), *Bidens pilosa* (picão preto), *Euphorbia heterophylla* (amendoim bravo, leiteiro) e *Raphanus raphanistrum* (nabiça).

Pesquisas desenvolvidas por Pinto (1992), visando o controle do fungo *S. cepivorum*, foram realizadas com extratos de *Braquiaria humidicola* (braquiaria); *Crotalaria paulinea* (crotalaria) e *Eucalypto citriodora* (eucalypto); os quais foram testados em diferentes concentrações como inibidores do crescimento micelial e da germinação de escleródios do microorganismo. Entretanto, para altas concentrações (até 1000 ppm) não foram observadas nenhuma influência.

Faria et al. (1997), trabalhando com plantas do cerrado de Goiás-Go, (*Hyptidendrum* sp, *Hypenia* sp, *Hyptis* sp, *Solanum* sp e *Annona* sp), conhecidas da medicina folclórica como fontes alternativas de compostos antifúngicos sistêmicos, observaram um perfil biológico indicando potencial da atividade antifúngica quando aplicadas na concentração de 2000 g.mL⁻¹.

Recentemente, trabalhos de Benevides, Young e Bolzam (1998) mostraram que extratos de plantas *Petiveria alliaceae* apresentavam, entre outras, atividades fungicidas. Identificaram alcalóides e derivados fenólicos presentes.

Trabalhando com extratos aquosos de matéria orgânica, Nakasone, Bettiol e Souza (1999) avaliaram os efeitos destes extratos sob diferentes fungos fitopatogênicos. Os extratos foram obtidos misturando-se vermicomposto e composto orgânico com água na proporção de 1:1. Não foi verificada correlação significativa entre a concentração dos extratos aquosos de composto orgânico e vermicomposto e a porcentagem de germinação; entretanto, com o aumento da concentração dos extratos, ocorreu redução na germinação.

2.1 Aspectos biológicos fúngicos

Estudos realizados por Russomano et al. (1987) em 298 amostras de 17 gramíneas forrageiras constataram a ocorrência de 23 gêneros de fungos. Nestes foram incluídos fungos patogênicos às forrageiras e às culturas de importância econômica, bem como de produtores de toxinas prejudiciais aos animais.

Posteriormente, Goulart (1990) constatou 26 doenças, causadas por fungos, em hortaliças, na região Norte de Minas Gerais, destacando a importância do trabalho de levantamento na região para a realização de um programa de manejo integrado de doenças.

Em trabalho de Pozza (1994) sobre a ocorrência de doenças da parte aérea de diversos hospedeiros, Deuteromicotina foi uma das classes estudadas encontradas na cidade de Lavras-MG. Segundo este autor, o agente etiológico de maior ocorrência foi *Fusarium* sp., seguido de *Colletotrichum dematium*. Estes foram encontrados, em razão do grande número de podridões pós-colheita catalogadas, em que 72 espécies são do gênero *Fusarium*, responsável por 59 (12,1%) das enfermidades, seguido de *Colletotrichum*, com 56 espécies (10,5%). Para o autor, a alta frequência de *F. oxysporum* encontrada deve-se à produção de clamidosporos, estruturas de resistência com capacidade de sobrevivência no

solo, por longo período de tempo, causando o maior número de sintomas de murcha.

Para o gênero *Colletotrichum* sp. este fato se explica por este ser encontrado com ampla distribuição em vários hospedeiros, predominando nas gramíneas, leguminosas e solanáceas, representando 70% dos sintomas causados por este, sendo também o patógeno causador de maior número de lesões locais.

2.2 Óleos essenciais

Segundo Gottlieb e Salatino (1987), óleos essenciais constituem uma grande categoria de princípios ativos produzidos por vegetais, caracterizados por serem separáveis por arraste com vapor de água e produzidos em estruturas anatômicas e celulares definidas e também por conferir em aroma aos organismos que os produzem, ressaltando que esta é uma característica de muitos outros produtos vegetais.

De acordo com Waterman (1993), óleos essenciais são misturas complexas, contendo, muitas vezes, mais de 100 compostos, dos quais os mais utilizados são quimicamente constituídos por terpenos ou terpenóides e fenilpropenos ou fenilpropenóides.

Segundo Lopes (1997), existem de várias técnicas empregadas para extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, extração com solventes orgânicos ou com CO₂ líquido. Segundo Mancini (1984) e Martins (1996), o processo mais utilizado para realizar as extrações é o arraste com vapor d'água, que além de apresentar bom rendimento, apresenta a facilidade de execução e de baixo custo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

As espécies aqui estudadas foram coletadas no mês de abril de 1998, segundo o quadro abaixo. A identificação das espécies trabalhadas foi realizada através de comparação com material existente no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras-UFLA). Uma excisata de cada espécie foi incorporada ao acervo do referido herbário, com os seguintes registros: 15863; 15862; 15860; 15864 e 15861.

TABELA 1- Classificação, uso, local de coleta das plantas em estudo utilizadas para extração. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Nome Vulgar	Nome Científico	Família	Uso Terapêutico	Local de Coleta
Maria-sem-vergonha	<i>Thunbergia alata</i>	Acanthaceae	Antiespasmódica	Cidade de Lavras-MG
Trevo-peludo	<i>Oxalis hirsutissima</i>	Oxalidaceae	Anti-séptica	Estrada que liga a cidade de Itumirim-MG e Itutinga-MG
Malva-branca	<i>Waltheria indica</i>	Sterculiaceae	Antiespasmódica	Estrada que liga a cidade de Itumirim-MG e Itutinga-MG
Cipó-de-são-jão	<i>Pyrostegia venusta</i>	Bignoniaceae	Antidiarréica	Br 265, Km 19
Alecrim do campo	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Asteraceae	Febrífugas	Campus Universitário/UFLA

3.1.1 Botânica das espécies vegetais

1. *Thunbergia alata* Bojer (Maria-sem-vergonha)

Pertencente a família Acanthaceae, é uma planta trepadeira, perene, herbácea, medindo 1-3 m de comprimento, com reprodução por sementes. Suas folhas são pubescentes, opostas, 5-10 cm de comprimento, sustentadas por longo

pecíolo alado. Apresenta flores solitárias, longo-pedunculadas, cores variáveis entre alaranjado, amarelo e branco, com a face interna do tubo da corola castanho escura ou preta. É originada da África Oriental, sendo naturalizada no Brasil e em toda a América Tropical (Lorenzi, 1992). É uma planta daninha medianamente freqüente, infestando principalmente pomares, lavouras anuais em geral, beira de cercas e terrenos baldios. Apresenta propriedades medicinais antiespasmódica, sendo empregada através de infusão e decocto. (Lorenzi, 1982; Gavilanes, Cardoso e Brandão, 1998).

2. *Pyrostegia venusta* Miers. (Cipó-de-são-joão)

Da família Bignoniaceae, é uma planta perene, trepadeira, lenhosa, medindo 2-4 m de comprimento, com reprodução por sementes; possui folhas opostas, compostas de 2 folíolos e uma gavinha trifida, eventualmente com 3 folíolos, de 3 cm de comprimento e 2 cm de largura. Inflorescências axilares, em forma de panículas, constituídas de muitas flores vistosas com corola tubulosa de 5-7 cm de comprimento. Originária da América do Sul, é uma infestante muito comum em pastagens, beira de cercas e ao longo de estradas, principalmente em terrenos arenosos (Lorenzi, 1982). É, por outro lado, uma planta muito ornamental, prestando-se admiravelmente para revestir caramanchões, colunas e muros. É também utilizada na farmacopéia caseira. Suas folhas encerram o glicosídeo "pyrostegina". É considerada tônica e antidiarréica, porém suspeita-se que seja venenosa, tendo sido já registrados casos de envenenamento de bovinos. (Lorenzi, 1982; Gavilanes, Cardoso e Brandão, 1998).

3. *Baccharis dracunculifolia* DC. (Alecrim-do-campo)

Da família Asteraceae (Compositae), é uma planta arbustiva, perene, medindo 2-3 metros de altura, com reprodução por sementes. Possui folhas

alternas, sem pecíolos, membranáceas, lanceoladas, densamente pontuadas de glândulas, medindo 1 a 3 cm de comprimento e 3 a 5 mm de largura. Apresenta inflorescência axilar, em capítulos contendo somente flores femininas ou contendo somente flores de ambos os sexos (Lorenzi, 1982). É uma planta daninha de pastagem largamente distribuída pelas principais regiões de pecuária do país. O aumento demasiado de sua infestação leva à inutilização total do pasto. Suas folhas são utilizadas como remédio caseiro. Propriedades medicinais; tônica, eupéptica e febrífuga, sendo também muito útil nos embarços gástricos. (Lorenzi, 1982; Gavilanes, Cardoso e Brandão, 1998).

4. *Waltheria indica* L. (Malva-branca)

Pertencente à família Sterculiaceae, é uma planta perene, herbácea, ereta, ramificada, base lenhosa, caule denso-pubescente, medindo 50-120 cm de altura, com reprodução por sementes. Possui folhas alternas, pecioladas, denso-pubescentes em ambas as faces, medindo 4-8 cm de comprimento e 3-5 cm de largura. Inflorescência axilar, em glomérulos sésseis; apresenta flores pequenas, de coloração amarela e protegidas por bractéolas lineares e com densa pilosidade, que confere à inflorescência um aspecto de veludo (Lorenzi, 1982). É uma planta daninha bastante frequente, infestando lavouras anuais e perenes, pomares, pastagens, beira de estradas e terrenos baldios. Apresenta nítida preferência por solos arenosos e ácidos. É uma das mais sérias infestantes de lavouras situadas em cerrados. Apresenta propriedades medicinais como antiespasmódica, emoliente, antiblenorrágica e anti-sifilítica. Considerada também útil contra coqueluche, hemorragia, hemoptise, bronquite, eczemas e afecções da laringe. (Lorenzi, 1982; Gavilanes, Cardoso e Brandão, 1998).

5. *Oxalis hirsutissima* Mart. & Zucc (Trevo-peludo)

A família Oxalidaceae apresenta é uma planta anual, herbácea, caules pubescentes, medindo 20-30 cm de comprimento, com reprodução por sementes. Apresenta folhas alternas, longamente pecioladas, compostas, trifoliadas; folíolos membranáceos, quase sésseis, densamente pilosos nas duas faces, medindo 2-3 cm de comprimento. Inflorescências axilares, em grupo de 2-6 flores de coloração amarela. Fruto: cápsula subcilíndrica com muitas sementes; sementes elípticas. É uma planta daninha medianamente frequente, infestante principalmente cafezais em áreas de cerrado. Segundo Kissmann e Groth (1995), uma característica da família Oxalidaceae é que as plantas apresentam, geralmente, altos teores de ácido oxálico. Em medicina popular é citada como sendo anti-séptica, usada externamente. (Gavilanes, Cardoso e Brandão, 1998).

3. 1. 2 Obtenção dos extratos, empregando-se diferentes solventes

As extrações foram feitas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram pesados 500 g das folhas e caules das plantas frescas, as quais foram trituradas com o auxílio de um triturador tipo Politron. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração a frio em 2,0 L de hexano, durante 8 dias, e em seguida foram filtradas a vácuo em funil de Buchner. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50 °C, em banho-maria, até completar a evaporação do solvente, obtendo-se o extrato bruto hexanólico. O resíduo vegetal, após filtração, foi levado à secagem em estufa ventilada a 25 °C. Após seco, o procedimento acima foi repetido com

clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se, assim, os respectivos extratos, como representados pela Figura 1.

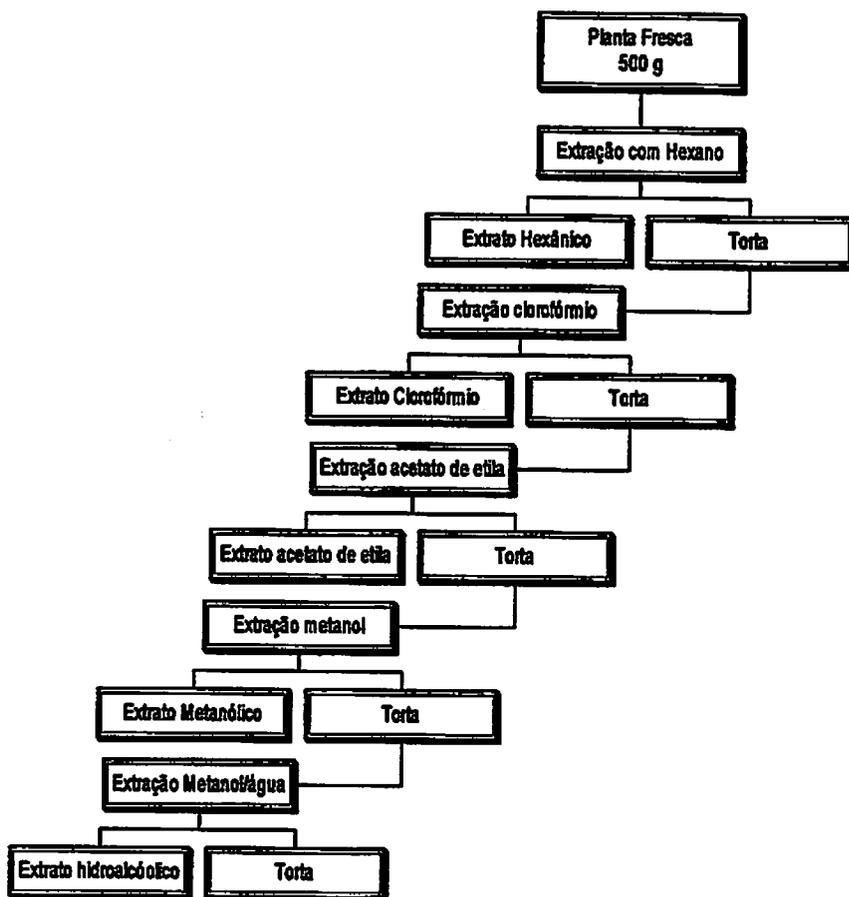


FIGURA 1. Cronograma de extração para obtenção dos extratos brutos das folhas e caules das espécies vegetais, modificado por Matos (1988). UFLA/DQI, Lavras-MG, 2000.

3.1.3 Purificação dos extratos obtidos em clorofórmio a partir dos caule e folhas de *Thunbergia alata*

Os extratos obtidos por extração a frio foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes. Inicialmente, realizou-se cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa em sílica gel 60 G da marca Merck, que com base na série eluotrópica de diversos solventes, possibilitou-nos, após algumas tentativas, encontrar uma combinação binária de eluentes: clorofórmio/metanol (1,0:7,0), metanol/clorofórmio (1,0:2,0), hexano/metanol (1,0:1,0), com separação nítida das manchas. Posteriormente, cada extrato foi submetido a uma cromatografia líquida de coluna (CCL), recheada com mais ou menos 32 g de sílica gel 70-230 mesh da marca Merck, cujos eluentes de polaridade crescente foram selecionados com base nos dados da cromatografia de camada delgada (CCD), a saber: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol, ácido acético e água. Coletaram-se frações de 30 ml no tempo de 16 minutos, totalizando 75 frascos para cada extrato. As frações de cada eluente foram reunidas, levadas a um evaporador rotatório, concentradas, e a seguir, levadas a estufa a 25°C. Os resíduos obtidos foram solubilizados no respectivo eluente e analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se as seguintes combinações binárias: hexano/metanol (1,5:2,0), hexano/metanol (2,0:1,0) e metanol/hexano (1,0:2,0). Diante dos resultados, observou-se a necessidade de outra CCL e posterior CCD, em que se obtiveram manchas semi-puras. O melhor resultado foi a fração obtida com o eluente clorofórmio (amostra 25) utilizando-se clorofórmio/metanol (1,0:2,0) para CCD e iodo como revelador. Os R_fs obtidos foram calculados a partir da média dos resultados de quatro placas.

3.1.4 Obtenção do óleo essencial das plantas

Para obtenção dos óleos essenciais das plantas, utilizou-se a metodologia de arraste de vapor descrita por por Martins (1996) e Lopes (1997), representada pelos equipamentos da Figura 2.

Coletaram-se aproximadamente 20g de folhas frescas das plantas e procedeu-se a extração por quatro horas, obtendo-se, assim, 2 L de hidrolato. Este foi colocado em um funil de separação e a extração do óleo foi realizada pela adição de 100 mL de diclorometano. Separaram-se a fase orgânica e aquosa. Repetiu-se a operação por três vezes. Desprezou-se a fase aquosa e à fase orgânica adicionou-se sulfato de magnésio anidro. Deixou-se em repouso por 30 minutos. Após, filtrou-se, evaporou-se o solvente em rotavapor, sob pressão reduzida, obtendo-se o produto desejado.

Os dados da Tabela 2 mostram o rendimento dos óleos para cada espécie vegetal estudada.

TABELA 2- Determinação do rendimento de óleo essencial das cinco espécies de plantas medicinais.

Plantas	Peso do Balão com Óleo	Peso do Óleo Obtido	Rendimento %
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	120.35 g	1,12 g	5,6
<i>Oxalis hirsutissima</i>	107.36 g	1,90 g	9,5
<i>Pyrostegia venusta</i>	135.77 g	2,65 g	13,3
<i>Thunbergia alata</i>	135.69 g	2,65 g	13,25
<i>Waltheria indica</i>	103.40 g	1,20g	6,0

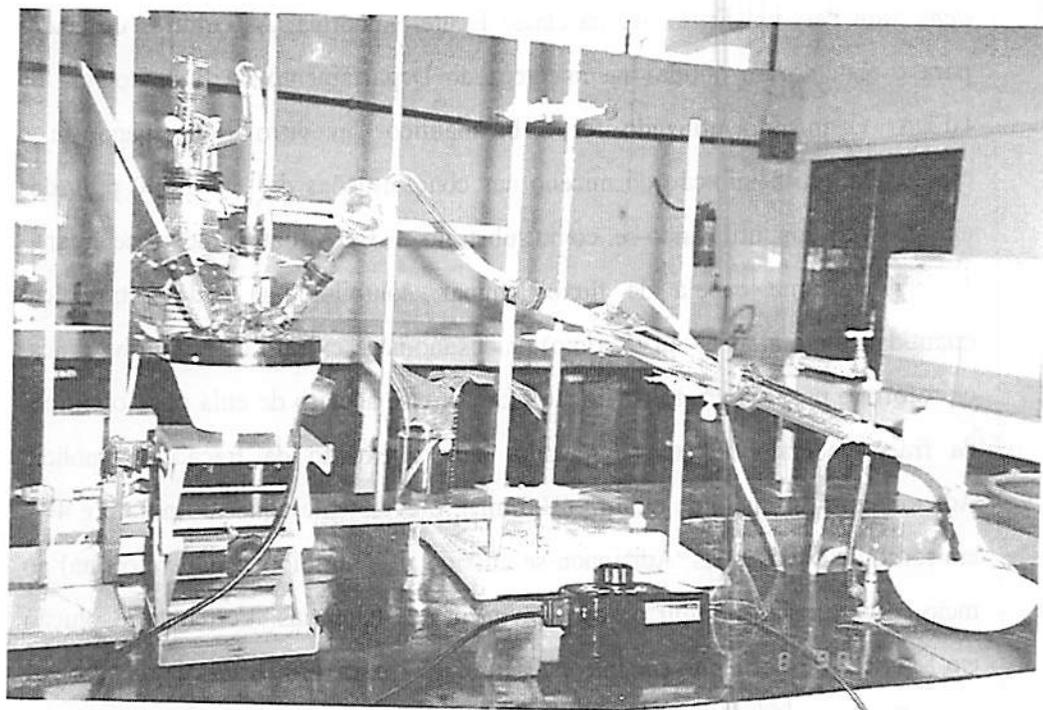


FIGURA 2. Representação do equipamento utilizado na extração de óleo essencial pelo sistema de arraste a vapor. UFLA/DQI, Lavras/MG, 2000.

3.2 Avaliação do efeito sobre o crescimento micelial dos extratos sobre os fitopatógenos

A atividade fungitóxica dos extratos de caules e folhas em estudo foi avaliada sobre os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* e *Colletotrichum dematium* Pers ex. Fr. Grove da classe Deuteromicotina. As culturas utilizadas para o teste foram obtidas na micoteca do Departamento de Fitopatologia da UFLA. O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro”, observando-se o crescimento ou a inibição do micélio nas concentrações de 100 e 500 ppm dos extratos vegetais, utilizando-se, como substrato, o BDA (batata, dextrose, ágar).

Em uma capela de fluxo laminar, solubilizou-se cada extrato em quantidades mínimas (5 ml máximo) de hexano para extrato da fração hexânica, clorofórmio para o extrato da fração clorofórmio, acetato de etila para o extrato da fração acetato de etila e metanol para o extrato da fração metanólica. Adicionou-se, ao meio de cultura (100 mL), previamente aquecido por 2'e 40'' em forno de microondas. Adicionou-se uma gota de antibiótico (Quemisetina) ao meio de cultura para inibir o desenvolvimento de bactérias. Verteu-se a solução em 8 placas de Petri previamente esterilizadas, 4 para *Fusarium oxysporum* e 4 para *Colletotrichum dematium*. Após o resfriamento, esperou-se o semeio do fungo colocando-se um disco de 8 mm de diâmetro de meio no meio de cultura, de forma invertida, no centro de cada placa. Paralelamente, prepararam-se placas padrões: uma com o BDA e sem os extratos em estudo; outra sem o composto, mas com os respectivos solventes adicionados ao meio de cultura. Estas foram vedadas e levadas a uma câmara de incubação a 23-25°C por 10 a 15 dias. Durante este período de crescimento, foram efetuadas medições diárias ortogonais do diâmetro das colônias, tendo como referência o crescimento da placa testemunha preenchida com diâmetro de 9,0 cm.

Adotou-se o esquema fatorial com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado. O índice de crescimento micelial (ICM), também denominado taxa de crescimento micelial, foi calculado pela fórmula modificada de Nakagava (Maguire, adaptada por Oliveira, 1991), na qual se observou o crescimento micelial das colônias em avaliações diárias.

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \frac{C_n}{N_n}$$

Onde:

ICM = índice de crescimento micelial

C_1, C_2, C_n = crescimento micelial das colônias na primeira, segunda e última avaliação.

N_1, N_2, N_n = número de dias

3.3 Avaliação do efeito dos extratos brutos de caules e folhas de *Thumbergia alata*, sobre a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum*

Adotou-se o método bioanalítico "in vitro" de inibição de germinação de esporos. Foram utilizadas colônias jovens dos fungos fitopatogênicos. Para estes testes, utilizou-se o extrato bruto de caules e folhas, obtido da fração clorofórmio das plantas. Para a avaliação da germinação de esporos, foram utilizadas lâminas escavadas (25 x 75 mm) utilizadas em microscopia. Sobre cada lâmina, adicionou-se uma gota de 20 µl de uma suspensão na concentração de 3×10^5 esporos/mL, obtendo-se, assim, a concentração desejada e 20 µl do extrato bruto clorofórmio a 50, 100 e 500 ppm. A avaliação foi realizada após 6 horas de incubação, em câmara úmida a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, para *Fusarium oxysporum*. Determinou-se a porcentagem de germinação em microscópio ótico (aumento 250 x), em 10 campos por gota. A porcentagem de germinação foi determinada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de germinação} = \frac{\text{número de esporos germinados}}{\text{número de esporos observados}} \times 100$$

Para a avaliação de germinação de esporos, nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 ppm do extrato de caule e folha de *Thumbergia alata*, foram considerados esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo; independente do seu comprimento. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

3.4 Identificação química dos extratos

Segundo Wagner, Bladt e Zgainsky (1984), obtendo os perfis cromatográficos, o próximo passo envolve a cromatografia em coluna para purificação dos produtos. Há vários métodos para verificação da pureza dos compostos, entre os quais, os mais utilizados são ponto de fusão, CCD, recristalização, índice de refração, etc. Com os resíduos puros, a identificação das moléculas foi obtida através de métodos espectrométricos convencionais, como Infravermelho (IV), Ultra-violeta (UV.), espectrometria de massa (CG/EM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da inibição micelial de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum dematium*

4.1.1 Utilização dos extratos brutos de caules na inibição micelial de *Colletotrichum dematium*

Através dos resultados da Tabela 3, na aplicação de extratos brutos vegetais de caules obtidos com 4 diferentes extratores, na redução micelial de *Colletotrichum dematium*, observa-se que os extratos obtidos em hexano e acetato de etila não apresentaram uma inibição satisfatória entre os demais. Porém, o melhor resultado de inibição micelial ocorreu com o extrator clorofórmio, nas concentrações de 100 e 500 ppm. Provavelmente, a inibição está sendo provocada pela presença de grupos químicos presentes nos extratos obtidos de caule obtidos em clorofórmio.

Ao observarmos os extratos dos caules das 5 espécies vegetais, podemos verificar que a redução micelial do fitopatógeno ocorreu com os extratos de *T. alata* e *O. hirsutissima* nas concentrações aplicadas de 100 e 500 ppm. Entretanto, nota-se também que na concentração de 100 ppm, *P. venusta* e *B. dracunculifolia* também apresentaram uma resposta de inibição significativa entre os demais extratos em estudo.

TABELA 3. Médias dos diâmetros (cm) das colônias de *Colletotrichum dematium* submetidas aos extratos brutos dos caules de 5 espécies vegetais nas concentrações de 100 e 500 ppm com 4 extratores. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Conc. - ppm -	Extratores	Extrato Bruto do Caule					Total
		<i>Walteria indica</i>	<i>Pyrostegia venusta</i>	<i>Thunbergia alata</i>	<i>Baccharis Dracunculifolia</i>	<i>Oxalis hirsutissima</i>	
100	Acetato de etila	4,90 aA	6,09 aB	6,07 aB	5,46 aAB	5,40 aB	5,58 B
	Cloroformio	4,67 bA	4,02 abA	3,87 abA	4,37 abA	3,20 aA	4,03 A
	Hexano	8,62 cB	7,72 bcC	6,32 aB	6,69 abB	7,31 abcC	7,33 C
	Metanol	5,50 abA	5,12 abAB	4,42 aA	6,09 bB	4,45 aAB	5,11 B
	Total	5,92 b	5,74 ab	5,17 a	5,65 ab	5,09 a	5,52 A
500		7,50 a	7,32 aB	7,41 aC	6,60 aB	6,45 aB	7,06 C
		4,42 abA	5,55 bA	3,42 aA	4,80 bA	5,40 bB	4,72 A
		6,37 abB	5,55 aA	6,10 abB	7,27 bB	6,45 abB	6,35 B
		6,41 bB	6,36 bAB	7,06 bBC	7,01 bB	3,42 aA	6,05 B
	Total	6,18 b	6,20 b	6,00 ab	6,42 b	5,43 a	6,04 B

** Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Jácome, Oliveira e Raslan (1999), naftoquinonas são descritas como principais constituintes do gênero *Tabebuia* da família Bignoniaceae por serem freqüentes e algumas vezes abundantes em várias espécies deste gênero. Embasados nesses conhecimentos científicos, podemos afirmar que a presença dos grupos orgânicos presentes podem ter influenciado na inibição.

Comparando estes dados com aqueles encontrados por Cardoso (1995), podemos inferir que átomos eletronegativos (N,O,S), separados por 2 ou mais átomos de carbono, podem provocar a inibição de determinados gêneros de fungos. Não podemos ainda elucidar a estrutura das moléculas presentes nos extratos, mas de acordo com os dados obtidos, trata-se de um composto com alto grau de inibição, tanto para *Thunbergia alata* como para *Oxalis hirsutissima*. Através da Figura 3, observam-se os testes biológicos com os extratos da planta *Oxalis hirsutissima* e *Thunbergia alata*.

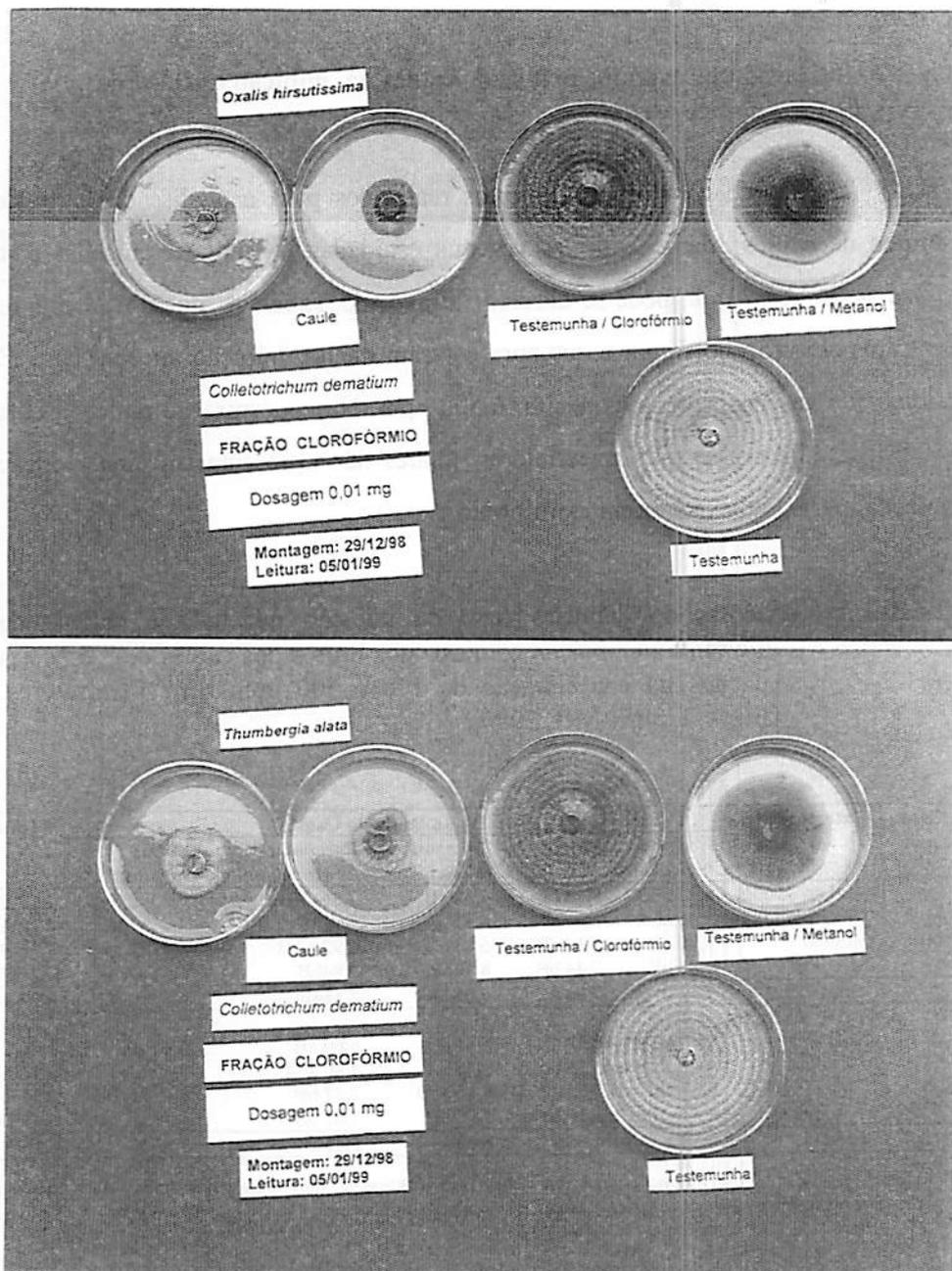


FIGURA 3. Bioensaios com os extratos brutos obtidos em clorofórmio do caule de *Oxalis hirsutissima* e *Thunbergia alata* na inibição micelial de *Colletotrichum dematium*. UFLA/DFP, Lavras-MG, 2000.

4.1.2 Utilização dos extratos brutos de caules na inibição micelial de *Fusarium oxysporum*.

De acordo com os experimentos realizados para a análise dos extratos brutos de caules das 5 espécies vegetais estudadas na inibição micelial com *Fusarium oxysporum*, pode-se observar através da Tabela 4, que novamente os extratos clorofórmio foram o que apresentaram melhor inibição micelial para *F. oxysporum* nas concentrações de 100 e 500 ppm. Na concentração aplicada com 500 ppm, observa-se que os extratores polares não apresentaram uma redução micelial perante o extrator em clorofórmio.

TABELA 4- Médias do diâmetro (cm) da inibição micelial da colônia de *Fusarium oxysporum* com extratos brutos dos caules de 5 espécies vegetais na concentração de 100 e 500 ppm com 4 extratores. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Conc. -ppm-	Extratores	Extrato Bruto do Caule					Total
		<i>Walteria indica</i>	<i>Pyrostegia venusta</i>	<i>Thunbergia alata</i>	<i>Baccharis Dracunculifolia</i>	<i>Oxalis hirsutissima</i>	
100	Acetato de etila	8,27 abB	8,85 bC	7,32 aB	7,86abB	7,35 aB	7,93 B
	Clorofórmio	5,46 abA	5,55 abA	4,35 aA	5,97 bA	4,60 abA	5,19 A
	Hexano	7,70 aB	7,14 aB	6,83 aB	6,92 aAB	8,21aB	7,36 B
	Metanol	7,85 bB	7,44 bB	8,10bB	7,84bB	5,81 aA	7,41 B
	Total	7,32 b	7,24 b	6,65 ab	7,15ab	6,49 a	6,97 A
500		7,50 aB	7,32 aB	7,41 aB	6,60 aB	6,45 aA	7,06 C
		4,42 abA	5,55 bA	3,42 aA	4,80 abA	5,40 bA	4,72 A
		6,37 abB	5,55 aA	6,10 abB	7,27 bB	6,45 abA	6,35 B
		6,41abB	6,36 abAB	7,06 bB	7,01 bB	5,50 aA	6,47 BC
	Total	6,18 a	6,20 a	6,00 a	6,42 a	5,95 a	6,15 A

** Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com base nos dados apresentados na Tabela 4, observa-se que entre os extratos obtidos dos caules das 5 espécies vegetais aplicados na concentração de 100 ppm, *O. hirsutissima* apresentou melhor resposta de inibição micelial com *F.*

oxysporum, seguida de *T. alata* e *B. dracunculifolia*. Para os extratos aplicados na concentração de 500 ppm, observa-se uma equivalência entre os extratos.

De acordo com Soares et al. (1996) em estudos com o gênero *alata*, foram detectados taninos, polifenóis e compostos antracênicos livres.

Segundo Lorenzi (1982) na família Oxalidaceae, uma das características é que as plantas apresentam geralmente altos teores de ácido oxálico nas células. Estes resultados de inibição micelial, encontrados com *O. hirsutissima*, podem ser confirmados com os testes biológicos apresentados na Figura 4.

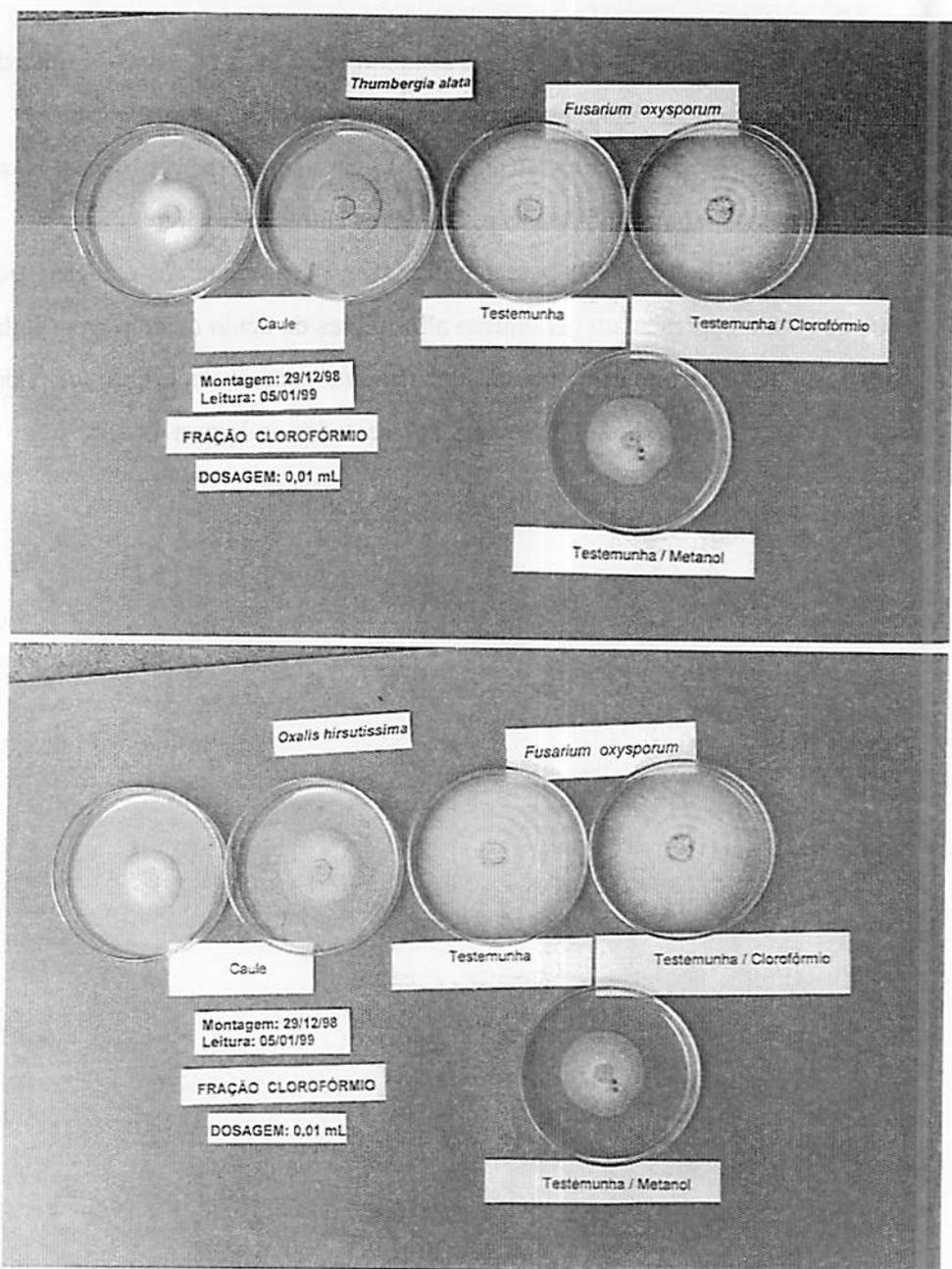


FIGURA 4- Bioensaios com os extratos brutos obtidos em cloroformio do caule de *Oxalis hirsutissima* e *Thunbergia alata* na inibição micelial de *Fusarium oxysporum*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.1.3 Utilização dos extratos brutos de folhas na inibição micelial de *Colletotrichum dematium*

De acordo com dados apresentados na Tabela 5, observa-se que o melhor extrator em que ocorreu a redução micelial foi o clorofórmio nas concentrações de 100 e 500 ppm, entretanto, na concentração de 500 ppm, o extrator metanol também apresentou uma significância entre os demais. Portanto, podemos inferir que as moléculas que conferem atividade biológica estão presentes nos extratores clorofórmio e metanol.

TABELA 5- Médias dos diâmetros (cm) das colônia de *Colletotrichum dematium* com extratos brutos das folhas de 5 espécies vegetais nas concentrações de 100 e 500 ppm com 4 extratores. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Conc. ppm	Extratores	Extrato Bruto do Caule					Total
		<i>Waltheria indica</i>	<i>Pyrostegia venusta</i>	<i>Thunbergia alata</i>	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>Oxalis hirsutissima</i>	
100	Acetato de etila	5,92aAB	4,70 aA	7,57 bC	5,10 aAB	5,92 aAB	5,84 B
	Clorofórmio	4,95 abA	4,64 abA	3,51 aA	3,85 aA	5,51 bAB	4,49 A
	Hexano	6,01aAB	6,09 aA	6,02 aB	5,80 aB	6,67 aB	6,12 B
	Metanol	6,51 bB	5,60 abA	5,60 abB	6,49 bB	4,56 aA	5,75 B
	Total	5,85 a	5,26 a	5,68 a	5,31 a	5,67 a	5,55 B
500		5,12 aBC	4,39 aB	5,96 aB	4,95 aB	4,54 aAB	4,99 B
		4,41 bB	3,92 abAB	3,39 abA	2,66 aA	3,65 abA	3,61 A
		5,98 aC	5,16 aB	5,34 aB	5,36 aB	5,24 aB	5,41 B
		2,82 aA	2,69 aA	3,16 aA	1,95 aA	4,82 bAB	3,09 A
	Total	4,58 b	4,04 ab	4,46 ab	3,73 a	4,56 b	4,28 A

** Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observada na Tabela 5, com a aplicação dos extratos das 5 espécies vegetais, uma redução micelial com os extratos de *P. venusta*, *T. alata* e *B. dracunculifolia* na concentração de 500 ppm. Entretanto, na concentração de 100 ppm, todos os 5 extratos apresentaram uma equivalência na redução micelial do fitopatógeno.

ppm, todos os 5 extratos apresentaram uma equivalência na redução micelial do fitopatógeno.

Provavelmente, a diferença dos grupos orgânicos funcionais presentes nestes extratos e ausentes nos anteriores é que está provocando a inibição. Neste caso, os metabólitos secundários com atividade biológica para este gênero de fungo estão sendo metabolizados nas folhas e não nos caules. É interessante ressaltar que muitas vezes a quantidade destas moléculas é ínfima em determinadas partes das plantas, ou muitas vezes sua produção é limitada a diferentes épocas do ano, horário de coleta, tipos de solos e outros fatores. (Martins, 1996 e Matos, 1988). Estes resultados podem ser observados através de testes biológicos apresentados na Figura 5.

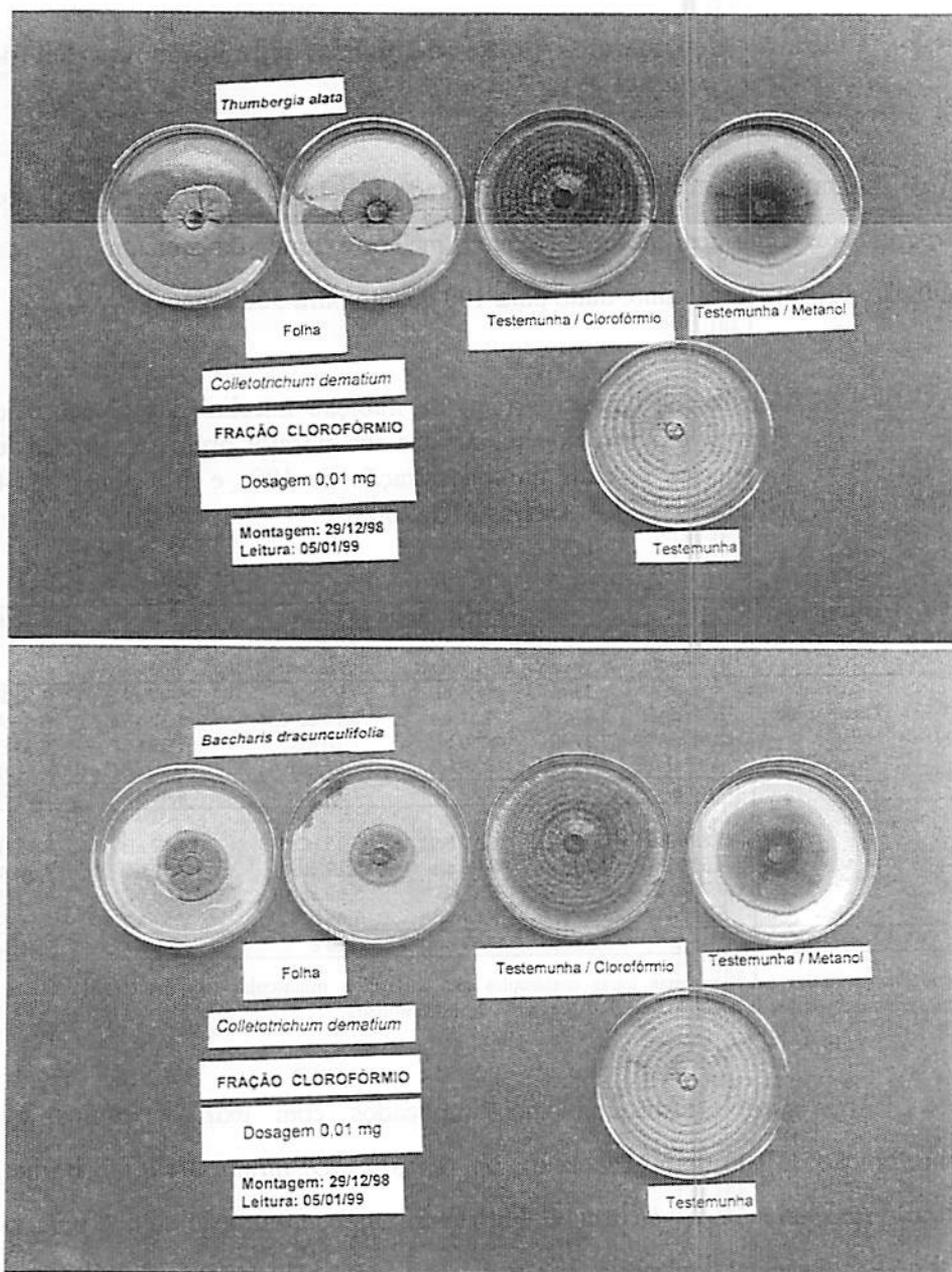


FIGURA 5. Bioensaios com os extratos brutos obtidos em clorofórmio da folha de *Baccharis dracunculifolia* e *Thunbergia alata* na inibição micelial de *Colletotrichum dematium*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.1.4 Utilização dos extratos brutos de folhas na inibição micelial de *Fusarium oxysporum*

Através dos resultados apresentados pela Tabela 6, como nos experimentos anteriores, observa-se que o melhor extrator do princípio ativo da inibição foi em clorofórmio, tanto para 100 quanto para 500 ppm.

TABELA 6- Médias dos diâmetros (cm) da inibição micelial das colônias de *Fusarium oxysporum* submetidas aos extratos brutos das folhas de 5 espécies vegetais na concentração de 100 e 500 ppm com 4 extratores. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Conc. -ppm-	Extratores	Extrato Bruto do Canle					Total
		<i>Waltheria indica</i>	<i>Pyrostegia venusta</i>	<i>Thunbergia alata</i>	<i>Baccharis Dracunculifolia</i>	<i>Oxalis hirsutissima</i>	
100	Acetato de etila	8,85 bC	6,51 aB	8,06 bB	7,90 bB	6,17 aAB	7,50 B
	Clorofórmio	6,96 cAB	4,84 aA	4,51 aA	6,14 bcA	5,32 abA	5,55 A
	Hexano	5,95 aA	7,37 bB	8,60 bB	7,70 bB	7,39 bC	7,40 B
	Metanol	8,01 abBC	7,05 aB	8,39 bB	7,81 abB	6,96 aBC	7,64 B
	Total	7,44 b	6,44 a	7,39 b	7,39 b	6,46 a	7,02 B
500		5,89 bBC	6,09 bcB	6,10 bcB	7,35 cC	4,17 aB	5,92 B
		4,60 abA	4,20 aA	3,96 aA	5,19 abA	5,52 bC	4,69 A
		4,76 aAB	5,66 abB	6,10bB	5,69 abAB	6,06 bC	5,65 B
		6,55 bC	5,35 bAB	6,39 bB	6,44 bBC	2,87 aA	5,56 B
	Total	5,45 b	5,32 b	5,69 bc	6,16 c	4,66 a	5,46 A

** Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Através dos testes biológicos aplicados com extratos brutos na concentração de 100 ppm (Tabela 6), *P. venusta* e *O. hirsutissima* mostraram inibição micelial superior às demais. Entretanto, na concentração de 500 ppm, o extrato bruto vegetal da espécie *O. hirsutissima* apresentou redução significativa, seguido de *P. venusta* e *W. indica*.

Os dados estão de acordo com aqueles encontrados por Ferreira e Alves (2000). Estes realizaram uma investigação fitoquímica através do extrato bruto

obtido com raízes em etanol, isolaram e caracterizaram substâncias como alantoína, esteróides e flavonas, moléculas presentes em vários fungicidas orgânicos. Fazendo uma comparação entre os dados obtidos e aqueles encontrados, justifica-se a grande inibição do extrato bruto das folhas de *Pyrostegia venusta*, representada na Figura 6.

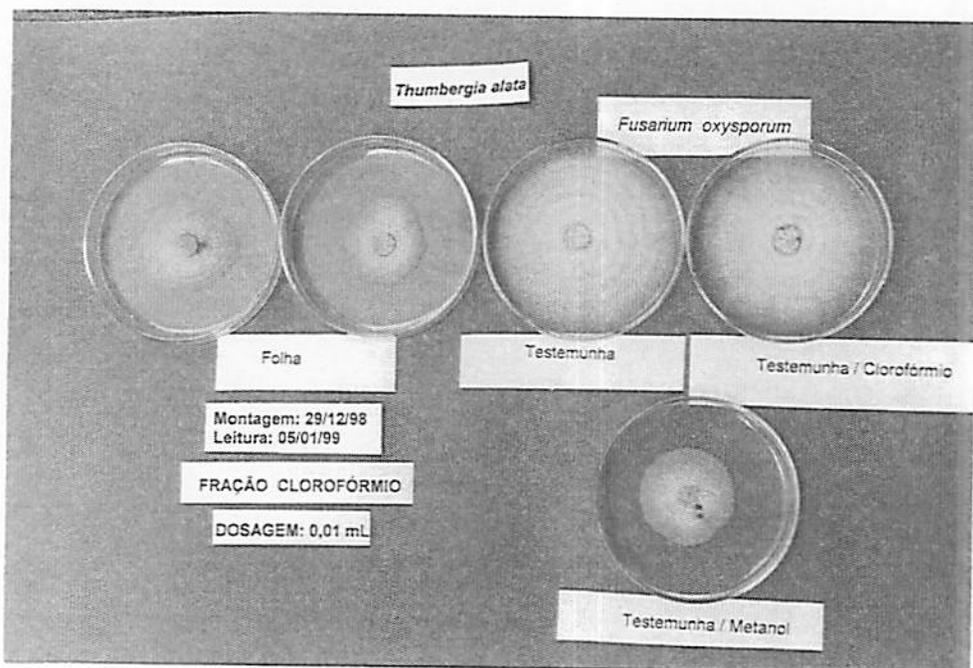


FIGURA 6. Bioensaios com os extratos brutos obtidos em cloroformio das folhas de *Thunbergia alata* na inibição micelial de *Fusarium oxysporum*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

4.2 Fracionamento químico

O processo de fracionamento através do sistema líquido-líquido submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel, com solventes de polaridades crescentes, foi realizado com folhas de extrato bruto de *Thunbergia alata* por esta espécie apresentar uma redução micelial em testes biológicos, com os seguintes resultados: na fração obtida em clorofórmio do caule, as amostras de número 24 e 25 apresentaram cristais de coloração rósea eluídos em ácido acético, com rendimento de 0,34 %. O ponto de fusão foi de 73,5 e as amostras foram solúveis em clorofórmio. Diante de tais características físico-químicas, pode-se inferir que trata-se de um composto de baixo peso molecular.

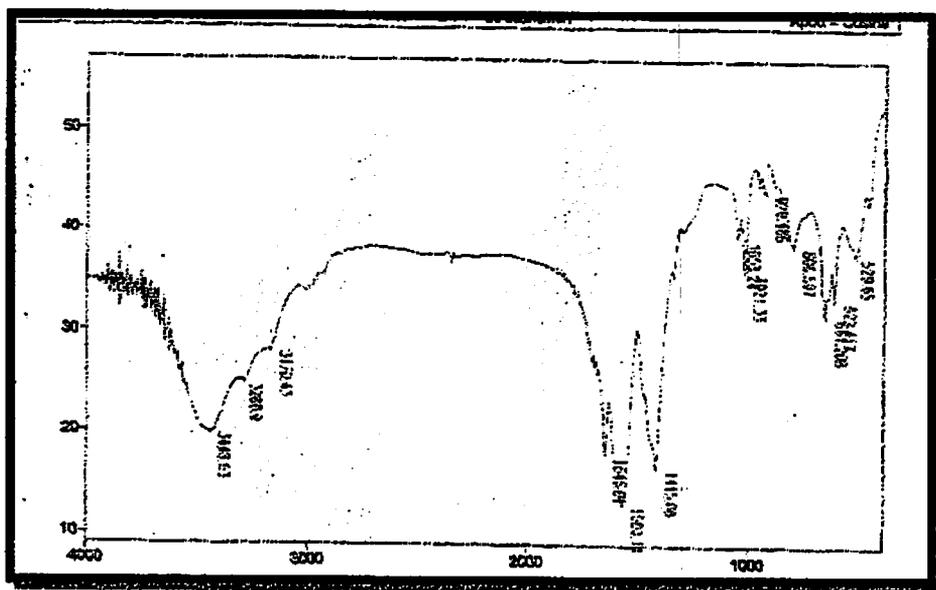


FIGURA 7- Espectro de infravermelho da amostra 24 (extrato das folhas de *Thunbergia alata*), obtido da fração clorofórmio, eluído ácido acético. UFLA/DQI, Lavras/MG, 2000.

Observando o espectro de infravermelho, registrado em espectrofotômetro Mattson FTIR-8201 A/Shimadzu, utilizando pastilhas de KBr como suporte, apresentado pela Figura 3, nota-se a presença de uma banda larga, situada entre $3600-2900\text{ cm}^{-1}$, que é característica de estiramentos simétricos do grupo O-H sobreposto com grupos metilas ($-\text{CH}_3$); metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$). Em torno de 1565 cm^{-1} , aparece um sinal que pode ser atribuído às duplas ligações de um composto aromático. Isto pode ser confirmado pelas três bandas que aparecem nitidamente em 929 , 806 e 661 cm^{-1} , características de anel benzeno substituído na posição meta. Nota-se também a presença de um sinal centrado em 1053 cm^{-1} , o qual é atribuído ao estiramento assimétrico da ligação C-O, representado pela Figura 7. (Silverstein, 1995).

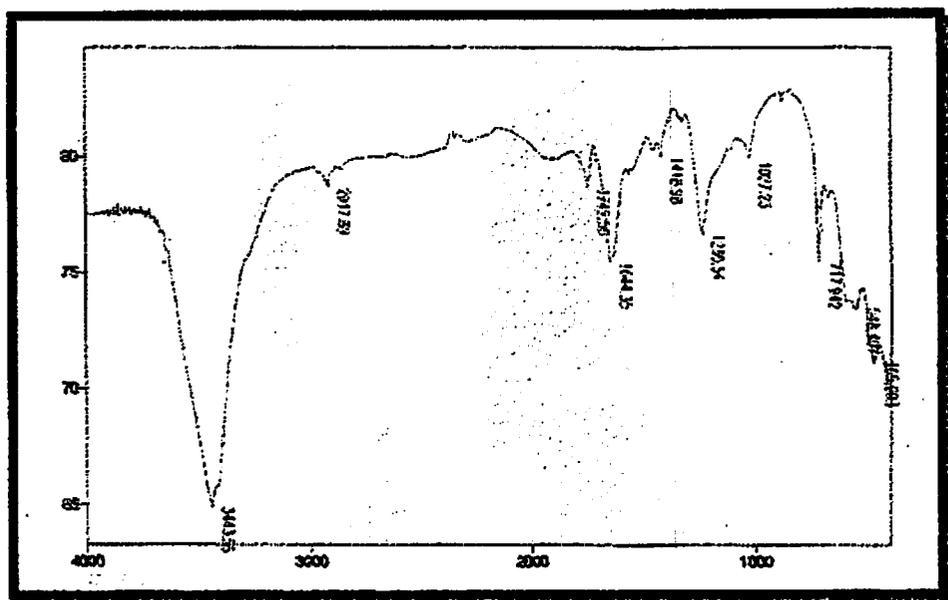


FIGURA 8- Espectro de infravermelho da amostra 19 (extrato dos caules de *Oxalis hirsutissima*), obtido da fração hidroalcoólica, eluída em metanol. UFLA/DQI, Lavras/MG, 2000.

O espectro de infravermelho da amostra resultante da rescristalização da fração metanol/água (Figura 8) forneceu cristais hialinos, com ponto de fusão em 233,6 °C. Neste, observa-se uma banda compreendida entre 3600-3443 cm^{-1} , que é característica de absorções devidas à deformação axial do estiramentos de O-H. Esta aparece como um sinal largo, devido a presença de pontes de hidrogênio. Sinais característicos de estiramento simétricos e assimétricos dos grupamentos CH_3 , CH_2 e CH podem ser observados aproximadamente nas regiões de 3000-2917 cm^{-1} . A presença de uma absorção compreendida em 1644 cm^{-1} evidencia a presença do grupo carbonila $\text{C}=\text{O}$.

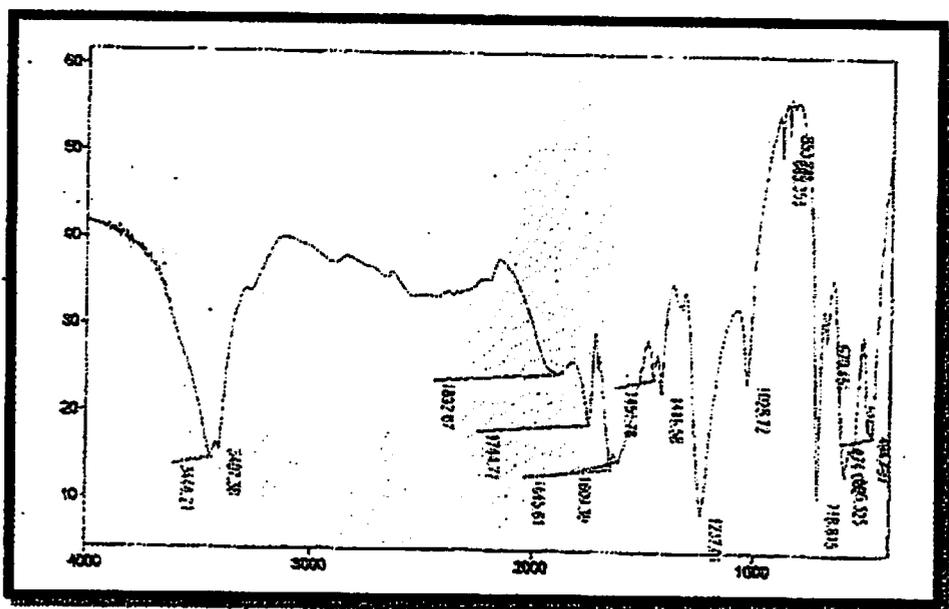


FIGURA 9- Espectro de infravermelho da amostra 28 (extrato das folhas de *Oxalis hirsutissima*), obtido da fração metanol/água, eluída em metanol. UFLA/DQI, Lavras/MG, 2000.

O espectro de infravermelho, obtido através da recristalização da fração metanol/água do extrato vegetal da folha de *Oxalis hirsutissima*, apresentou cristais hialinos com ponto de fusão em 276,4 °C (Figura 9). Destacam-se, na região compreendida entre 3400-2800 cm^{-1} , sinais de absorções de estiramento da ligação O-H, sobrepostos com sinais de absorções de estiramento da ligação CH dos grupos metila, metilênicos e metínicos. Estas absorções se apresentam como um sinal largo devido à ocorrência de pontes de hidrogênio. Próximo a 1645-1609 cm^{-1} , encontram-se bandas de absorções que podem ser atribuídas ao estiramento simétrico da ligação C=C (Silverstein, 1995). Entre 1892-1744 cm^{-1} , observa-se um sinal, característico da ligação C=O de um composto que apresenta o grupo carbonila.

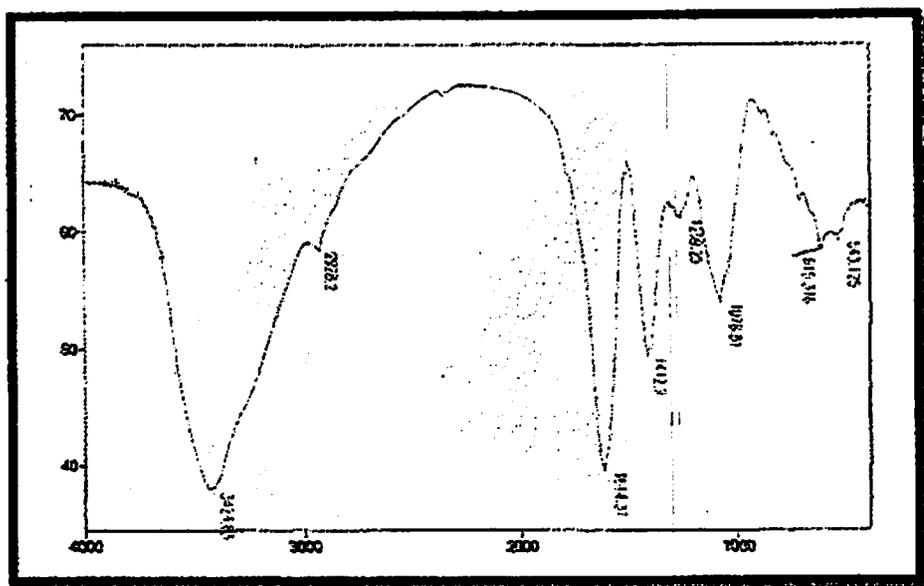


FIGURA 10- Espectro de infravermelho da amostra 23 (extrato dos caules de *Waltheria indica*) da fração etanol/clorofórmio/metanol, eluída em metanol. UFLA/DQI, Lavras/MG, 2000.

Analisando os dados do espectro da Figura 10, correspondente ao extrato clorofórmio obtido do caule de *Waltheria indica* eluído em metanol (amostra 23), observa-se uma banda larga de 3600-2800 cm^{-1} , que é atribuída ao estiramento O-H. Esta aparece com um sinal largo, provavelmente devido a formação de dímeros sobrepostos com os estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H de grupos metilas ($-\text{CH}_3$), metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$). Em 1614 cm^{-1} , aparece uma banda fina, que corresponde aos estiramentos da ligação C=C. A deformação da ligação C-O, característica de grupos hidroxilas primários, secundários ou terciários, pode ser observada pela presença do sinal, aproximadamente entre 1259-11078 cm^{-1} (Silverstein, 1995).

4.3 Avaliação da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* para *Thunbergia alata*

Para os testes de germinação de esporos com *Thunbergia alata* nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 ppm, observou-se uma inibição de 100%. Pode-se inferir que tais resultados possam estar ocorrendo partindo do princípio de que em estudos realizados por Soares et al. (1996) com *S. alata*, foi detectada a presença de taninos, polifenóis e compostos antracênicos livres, grupos estes que poderão estar atuando no extrato clorofórmio de *T. alata*.

5 CONCLUSÕES

- ❖ Os extratos obtidos por extração a frio mostraram efeito fungitóxico pela redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum dematium*.
- ❖ O extrato das plantas em clorofórmio, que se destacaram entre as demais no controle dos fitopatógenos, foi *Thunbergia alata* e *Oxalis hirsutissima* nas concentrações de 100 e 500 ppm.
- ❖ Dos extratos obtido em hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol, o que apresentou melhor resultados de inibição foi o clorofórmio, para as duas concentrações utilizadas.
- ❖ Para as avaliações de crescimento micelial realizadas com extratos de caule das 5 espécies vegetais em estudo, *Thunbergia alata* e *Oxalis hirsutissima* apresentaram melhor resposta para *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum dematium*.
- ❖ Para a inibição micelial de *Fusarium oxysporum*, os extratos das folhas das espécies vegetais de *Oxalis hirsutissima* e *Pyrostegia venusta*, apresentaram maior atividade nas concentrações estudadas. Para os testes com extratos das folhas no controle de *Colletotrichum dematium*, *Baccharis dracunculifolia* apresentou efeito na redução do crescimento micelial.
- ❖ A avaliação de inibição de germinação de esporos, avaliada para o extrato em clorofórmio de caules e folhas de *Thunbergia alata*, nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 ppm, resultou em 100 % de inibição.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. New York: Academic Press, 1988. 803p.
- BALANDRIM, M.F.; KLOCKE, J.A.; WUATELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plants chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, Washington, v. 228, n. 7404, p.1154-1160, June 1985.
- BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; BOLZAM, V.S. Atividade antifúngica e potencial antineoplásico de polissulfetos obtidos por fracionamento biomonitorado de extratos de *Petiveria alliaceae*. L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA; REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 21., 1998, Poços de Caldas. *Anais... Poços de Caldas: SBQ*, 1998. v.2,
- BOTSARIS, A.S. *Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras*. São Paulo: Icone, 1995. p.37.
- CARDOSO, M.G. *Correlações entre a estrutura química e a atividade biológica de ácidos aminoalcanotiossulfúricos e derivados sobre o fungo *Phytophthora capsici**. Belo Horizonte: UFV, 1995. 140p. (Tese - Doutorado em Química).
- X FARIA, E.A.; LEMES, G.F.; TEIXEIRA, G.T.; MIRANDA, E.G. de; AZEVEDO, N.R.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; CAMPO, F.C.; SILVA, D.A.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A.; JESUÍNO, R.S.A.; FERREIRA, H.D.; SILVA, M.R.R.; SILVA, S.. *Plantas do cerrado como fonte de compostos antifúngicos sistêmicos*. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3., 1997, Campinas. *Resumos... Campinas: UNICAMP*, 1997. p.34-35.
- FERREIRA, T.D.; ALVARES, P.S.M. *Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal*. *Química Nova*, Belo Horizonte, v.23, n.1, p. 42-46, fev. 2000.
- GAVILANES, M. L.; CARDOSO, C.; BRANDÃO, M. *Plantas daninhas como medicamentosas de uso popular*. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.13, n.150, p.21-29, out. 1988.

- X ↓
GOTTlieb, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.39, n.8, p. 707-716, ago. 1987.
- GOULART, A.C.P. Levantamento de doenças fúngicas em hortaliças na região norte de M.G. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, n.1, p.110-112, mar. 1990.
- JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-pastor). *Química Nova*, Belo Horizonte, v.22, n.2, p. 175-177, fev. 1999.
- KISSMANN, G.K., GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. São Bernado do Campo-SP: BASF S.A, 1995.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. *Química farmacêutica: agentes anti-sépticos, antifúngicos e antibacterianos*. 1988. p.531-540.
- LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Efeito de extratos de caroá (*Neoglaziovia variegata*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Fusarium oxysporum* F. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.289, ago. 1995a. Suplemento.
- LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Efeito de extratos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p. 321, ago. 1995b. Suplemento.
- LOPES, R.C. *Caracterização isozimática, divergência genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell*. Viçosa: UFV, 1997. 91p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. Nova Odessa, 1982. 524p.
- X MANCINI, B. Influência de tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. I. Essência de hortelã do Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, Araraquara, v.6, p.1-7, 1984.

MARINI-BETTOLO, G.B.; NICOLETTI, M.; PATAMICA, M.; GALEFFI, G.; MESSARIA, I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under fields conditions. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 213, p.113-127, 1981.

MARTINS, E.R. Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. Viçosa: UFV, 1996. 97p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

MATOS, F.J.A. Introdução fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 1988. p.125-128.

McCALLAN, S.E.A. History of fungicides. In: TORGESON, D.C. (ed.). *Fungicides and advanced treatise*. New York: Academic Press, 1967. v.1, p.1-29.

NAKASONE, A.K.; BETTIOL, W.; SOUZA, R.M. de. Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. *Summa Phytopatologica*, Piracicaba, v.25, n.4, p.330-335, out./dez. 1999.

OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Lavras: ESAL, 1991. 111p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).

OLIVEIRA, R.F.; BAGGIO, A.J.; PASCHOALATI, S. F.; LEITE, B. Evidência de compostos fenólicos pré formados com ação anti-fúngica em extratos de folha de *Mimosa scabrella*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, p.269, 1992. Suplemento.

X PINTO, C.M.F. Influência de extratos de plantas no crescimento micelial e na germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum* Berck. *Fitopatologia Brasileira*, v.18, p.306, 1992. Suplemento.

POZZA, E.A. Ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras-MG. Lavras: UFLA, 1994. 97p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

- ROGRIGUES, F.A.; MACHADO, C.F.; ARAÚJO, G.M.; JULIATTI, R.; BORGES, A.C.; PEDXOTO, J.R. Efeito de dois extratos aquosos na germinação, crescimento micelial e produção de escleródus de *Sclerotium rolfsi* "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.322, ago. 1995. Suplemento.
- RUSSOMANO, O.M.R.; MALAVOLTA, V.M.A.; AMARAL, R.E.M.; LASCA, C.C.; ALCANTARA, V.B.G.; SCHAMMASS, E.A. Estudos sobre a ocorrência de fungos em gramíneas forrageiras. *O Biológico*, São Paulo, v.53, n.1/6, p.25-35, 1987.
- SCHWINN, F.J.; SAUB, T. Phenylamides and other fungicides against Oomycetes. Basle Switzerland: Ciba-Geigy, 1982. p.259-272.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1994. 387p.
- SOARES, I.A.A.; BRANDÃO, M.; DUARTE, M.G.; JÁCOME, R.L.P.; OLIVEIRA, A.B. Estudos farmacocômicos de espécies de Senna: *S. alata* (L.) Roxb., *S. Occidentalis* (L.) LINK e *S. Tora* (L.) Roxb. *Farmacocômica de Plantas Daninhas de Uso Medicinal*, Belo Horizonte, v.6, n.1, p.7-11, jan. 1996.
- THORPE, T.A. The current status of plant tissue culture. In: BOHWANI, S.S. (ed.). *Plant tissue culture: applications and limitations*. New York: Elsevier, 1990. v.19, cap.1, p.1-33.
- TRINDADE, C.; SARTÓRIO, M.L. Farmácia viva: utilização de plantas medicinais. *Tecnologia e Treinamento Agropecuário*, Gramado, v.3, n.10, p.33, mar./abr. 1999.
- VALARINI, J.P.; FRIGHETTO, R.T.S.; SPADOTTO, C.A. Potencial da erva medicinal (*Cypopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigada. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.323, ago. 1995. Suplemento.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 1984. 320p.

[REDACTED]

WATERMAN, P.G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. (eds). **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Longman Group, 1993. p.47-62.

KISSOMANO, O.A.K., MALAVOLTA, V.M.A., AMARAL, R.M., LASSA, C.C., ALGAR-TARA, V.B.G., SCHIMMANS, F.A. Fatores e condições de cultivo em grandes lavouras. O Biólogo, São Paulo, v.23, n.16, p.25-32, 1987.

SCHWITZ, E.L., SAUB, P. Phenylalanine and other aromatic amino acids. *Journal of Chemical Ecology*, 1982, p.239-272.

SHVETZ, R.M., BAKER, G.C., MORGAN, E.C. Identificação e caracterização de cultivos de cana-de-açúcar. *Guia de Cana-de-açúcar*, 1994, p.277.

SOARES, J.A., BRADY, M., DUARTE, M.C., JACOME, R.F., OLIVEIRA, A.B. Efeito de fertilizantes na produção de cana-de-açúcar. *Revista de Cana-de-açúcar*, (1), n.1, p.1-11, 1987.

THORP, J.A. The control of plant tissue culture. In: *BIOTECHNOLOGY*, 2.2 (ed.). Plant tissue culture: applications and limitations. New York: Elsevier, 1990, p.1-33.

TRINDADE, C., SARTORI, M.L. Fatores que afetam o crescimento de plantas medicinais. *Fitoterapia e Farmacologia Agrícola*, Curitiba, v.3, n.10, p.22, setembro, 1999.

VALARIUS, J.V., RICHETTI, R.T.S., SPADOTTO, C.A. Efeito de diferentes doses de adubo no crescimento de plantas medicinais. *Revista de Cana-de-açúcar*, (1), n.1, p.1-11, 1987.

WAGNER, H., BLADT, S., ZIMANSKY, E.M. Plant drug analysis. A practical chromatographic approach. Berlin: Springer, 1984, 320p.

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA 1A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Colletotrichum dematium* com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores..... 46

TABELA 2A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Fusarium oxysporum* com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores..... 46

TABELA 3A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Colletotrichum dematium* com extratos brutos de folhas 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores..... 47

TABELA 4A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Fusarium oxysporum* com extratos brutos de folhas de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores..... 47

TABELA 1A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Colletotrichum dematim* com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.

F.V.	G.L.	SQ	QM	Pr > F
FRA1	1	11.18306	11.18306	0.0000
PL2	4	15.42891	3.85723	0.0000
TRAT3	3	137.33662	45.77887	0.0000
FRA1*PL2	4	2.09584	0.52396	0.3465
FRA1*TRA3	3	33.75181	11.25060	0.0000
PL2*TRAT3	12	33.25447	2.77121	0.0000
FRA1*PL2*TRAT3	12	37.46428	3.12202	0.0000
Erro	120	55.72875	0.46441	
Total	159	326.24375		
CV	11.78765124%			

** Teste F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 2A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Fusarium oxysporum* com extratos brutos de caule de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores

F.V.	G.L.	SQ	QM	Pr > F
FRA1	1	27.09316	27.09316	0.0000
PL2	4	9.01797	2.25449	0.0028
TRAT3	3	147.41314	49.13771	0.0000
FRA1*PL2	4	2.15242	0.53811	0.3989
FRA1*TRA3	3	1.77915	0.59305	0.3413
PL2*TRAT3	12	36.51566	3.04297	0.0000
FRA1*PL2*TRAT3	12	13.79946	1.14996	0.0165
Erro	120	63.18270	0.52652	
Total	159	300.95368		
CV	11.05978550%			

** Teste F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 3A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Colletotrichum dematim* com extratos brutos de folhas de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.

F.V.	G.L.	SQ	QM	Pr > F
FRA1	1	65.15256	65.15256	0.0000
PL2	4	12.24069	3.06017	0.0017
TRAT3	3	78.90131	26.30044	0.0000
FRA1*PL2	4	1.01994	0.25498	0.8201
FRA1*TRA3	3	25.80656	8.60219	0.0000
PL2*TRAT3	12	27.10494	2.25874	0.0003
FRA1*PL2*TRAT3	12	34.50844	2.87570	0.0000
Erro	120	79.79750	0.66498	
Total	159	324.53194		
CV	16.5934136%			

TABELA 4A. Resumo das análises de variância de porcentagem de inibição micelial com *Fusarium oxysporum* com extratos brutos de folhas de 5 espécies vegetais com 4 tipos de extratores.

F.V.	G.L.	SQ	QM	Pr > F
FRA1	1	98.36.064	98.36064	0.0000
PL2	4	32.24697	8.06174	0.0000
TRAT3	3	67.1592	22.38531	0.0000
FRA1*PL2	4	4.61147	1.15287	0.0338
FRA1*TRA3	3	8.00917	2.66972	0.0005
PL2*TRAT3	12	67.96978	5.66415	0.0000
FRA1*PL2*TRAT3	12	24.23778	2.01982	0.0000
Erro	120	51.24237	0.42704	
Total	159	353.83611		
CV	10.46981851%			