

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO EXTRATO VEGETAL AQUOSO DE *Psidium guajava* L. SOBRE A FITOBACTERIA *Ralstonia solanacearum* AGENTE CAUSAL DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Raquel Maria da Silva¹; Daniela da Silva Andrade²; Juliete Amanda Theodora de Almeida³; Kedma Maria Silva Pinto⁴

RESUMO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mil.) é cultivado em vasta área no território brasileiro. A doença de etiologia bacteriana de importância é conhecida popularmente como murcha bacteriana e tem como agente causal *Ralstonia solanacearum*. O trabalho objetivou avaliar o potencial biológico do extrato vegetal aquoso da goiabeira (*Psidium guajava*) no manejo da murcha bacteriana do tomateiro. O extrato foi obtido através do processo de infusão do material vegetal (folhas) seco (pó) em água destilada, em uma proporção de 1:5 (p/v), durante quinze minutos a uma temperatura de 70°C, sob agitação constante e posterior filtragem em papel filtro para obtenção do concentrado que em seguida foi liofilizado. O antibiograma foi realizado por meio da deposição de alíquotas de 0,3 mL de suspensão de *R. solanacearum* ($A_{580}=0,8$) em placas de Petri contendo meio de cultura Kelman e espalhadas com alça de Drigalski. Em seguida, discos de papel filtro (5,6mm de diâmetro) esterilizados foram embebidos em cinco diferentes concentrações (0; 2; 4; 6 e 8 mg/mL), sendo a concentração 0mg/mL, o tratamento controle, em que os discos foram umedecidos em água destilada esterilizada (ADE). No procedimento, os discos já umedecidos foram depositados em quatro pontos equidistantes de placa de Petri com meio de cultura sendo incubadas em estufa do tipo B.O.D até a avaliação que foi realizada através da mensuração dos halos de inibição com auxílio de um paquímetro digital. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das concentrações de cada extrato a uma análise de regressão (antibiograma). O extrato aquoso proporcionou formação de halo de inibição em todas as concentrações analisadas sendo os maiores formados na maior concentração.

Palavras- chaves: Atividade antimicrobiana; Controle Alternativo; Fitobacteriose.

¹ Engenheira Agrônoma, Mestranda em Produção Agrícola na UFRPE- Unidade acadêmica de Garanhuns. raquel.maria18@hotmail.com

² Engenheira Agrônoma, Mestranda em Produção Agrícola na UFRPE- Unidade acadêmica de Garanhuns. daniela5191@hotmail.com

³ Zootecnista, Mestranda em Ciências Animais e Pastagens na UFRPE- Unidade acadêmica de Garanhuns. juliete.amanda@hotmail.com

⁴ Engenheira Agrônoma, Professora Dr^a da UFRPE- Unidade acadêmica de Garanhuns. Kedma_maria@hotmail.com

ABSTRACT

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mil.) Is cultivated in a wide area in the Brazilian territory. The disease of bacterial etiology of importance is popularly known as bacterial wilt and has causal agent *Ralstonia solanacearum*. The objective of this work was to evaluate the biological potential of the guava water extract (*Psidium guajava*) in the management of tomato bacterial wilt. The extract was obtained by infusing dried (powder) plant material in distilled water in a ratio of 1: 5 (w / v), for fifteen minutes at a temperature of 70 ° C under constant stirring and subsequent filtration on filter paper to obtain the concentrate which was then lyophilized. The antibiogram was performed by deposition of 0.3 ml aliquots of *R. solanacearum* suspension (A580 = 0.8) in Petri dishes containing Kelman culture medium and scattered with Drigalski loop. After sterilized filter paper disks (5,6mm diameter) were soaked in five different concentrations (0, 2, 4, 6 and 8 mg / mL), the concentration 0mg / mL, the control treatment, in which the discs were moistened with sterile distilled water (ADE). In the procedure, the already moistened discs were deposited in four equidistant points of Petri dish with culture medium being incubated in oven type B.O.D until the evaluation that was accomplished by measuring the inhibition halos with the aid of a digital caliper. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the mean concentrations of each extract to a regression analysis (antibiogram). The aqueous extract afforded inhibition halo formation at all analyzed concentrations, the larger ones being formed at the higher concentration.

Keywords: Antimicrobial activity; Alternative Control; Phyto bacteriosis.

INTRODUÇÃO

Pertencente à família botânica da solanáceas, o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) possui o ciclo perene, sendo amplamente cultivado como anual no território brasileiro. A planta é nativa da América do Sul na região andina que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru na América do Sul. Sua exploração em cultivo ocorreu primeiro no México, sendo então considerado seu segundo centro de origem. No Brasil ele foi introduzido, pelos Europeus no final do século XIX (ALVARENGA, 2013; COSTA, 2017).

No país a área plantada de tomate é de 78.808.079 hectares, com uma produção de 4.373.047 toneladas na safra de 2017/18 (IBGE, 2018), impactando diretamente na economia

nacional, pois é responsável por uma receita de aproximadamente 4,2 bilhões de reais por ano (COSTA, 2017). Como em outras culturas de importância agrícolas, o tomate necessita de cuidados para evitar-se problemas de ordem fitossanitária, devido a sua vulnerabilidade a organismos considerados pragas.

Para hortaliça, a murcha bacteriana cujo agente causal é a *Ralstonia solanacearum* (SMITH, 1896) (YABUUCHI et al., 1995), é apontada como uma das principais patologias de na produção em todo o país com maior ênfase as regiões nordeste e norte devido as características climáticas ideais ao desenvolvimento do patógeno que (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACK, 2015). Para Santiago et al. (2016), é uma das doenças mais destrutivas, para muitas culturas nos trópicos.

Para o controle da doença são recomendadas medidas preventivas, pois não há moléculas químicas registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA que possam ser utilizadas no manejo da doença no tomateiro (MAPA, 2019). Através desta constatação, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas em torno de obtenção de um método de controle eficiente, para tanto o manejo alternativo através do uso de extratos vegetais apresenta-se como uma possibilidade promissora ainda em estudos para elucidar a questão de uso na cultura (MATOS et al., 2018).

As plantas de forma geral apresentam substâncias ativas que podem apresentar atividades biológicas, constituindo assim um potencial para utilização no manejo de muitas doenças (PINTO, 2013) e essas substâncias há muito tempo veem sendo alvos de diversas áreas do conhecimento, dentre elas das agrárias. Os metabólitos secundários, presentes nos extratos de plantas, constitui-se em um potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (FONTANA et al., 2017).

Para tanto o trabalho objetiva avaliar o potencial biológico do extrato vegetal da goiabeira (*Psidium guajava*) *in vitro* para o manejo de *R. solanacearum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Fitopatologia do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade acadêmica de Garanhuns- CENLAG, na Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE/UAG, no período de maio a agosto do ano de 2018.

Foram coletadas folhas de goiaba (*Psidium guajava*) livre de sintomas e sinais no município de Garanhuns (Figura 1). A cidade está situada a 841 metros de altitude, com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 8° 53' 27" Sul, Longitude: 36° 29' 48" Oeste no estado de Pernambuco (CIDADE BRASIL, 2018).



Figura 1: Mapa do município de Garanhuns no Agreste Meridional de Pernambuco. Fonte: Cidadebrasil.com.br. Adaptado por SILVA, R.M. 2018.

As folhas coletadas foram conduzidas a Unidade Acadêmica de Garanhuns para processamento e confecção do extrato, o material foi pesado e lavado em água corrente para retirada das sujidades superficiais, permanecendo em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C até a retirada da água superficial livre. Em seguida as folhas foram dispostas em estufa de circulação forçada, a uma temperatura de 65°C para secagem, após foram trituradas em moinho de facas e passadas em peneira de 2 mm para obtenção do pó. O extrato aquoso foi preparado no Laboratório de Biotecnologia-UAG, através do processo de infusão do material vegetal seco (pó) em água destilada, em uma proporção de 1:5 (p/v), durante quinze minutos a

uma temperatura de 70°C sob agitação magnética constante, posteriormente o extrato foi filtrado em filtro de papel para obtenção do concentrado, sendo as partículas vegetais desprezadas. O extrato foi preparado para a liofilização através do congelamento e posteriormente seguiu para o liofilizador Terroni LD1500, por fim, foi identificado e armazenado em refrigerador a 4,5°C +/- 2°C, para utilização no antibiograma no laboratório de fitopatologia.

ANTIBIOGRAMA

Conduzido no laboratório de Fitopatologia da UFRPE-UAG, foi utilizado o isolado de *R. salanacearum* CCRM Rs78 que pertence à coleção do laboratório de fitobacteriologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, campus Recife. Sendo cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura Kelman, por 48 horas a 26 °C, quando foram verificadas colônias com características típicas: mucoides, irregular e de colocação branca, as colônias foram transferidas para um tubo de ensaio estéril contendo água destilada esterilizada (ADE) para preparo da suspensão bacteriana, ajustada ($A_{580}=0,8$) a concentração de 10^8 de UFC/mL em espectrofotômetro visível (SP 1105- Spectrum).

Após ajuste, foram depositadas alíquotas de 0,3 mL da suspensão em placas de Petri, contendo o meio de cultura Kelman solidificado e espalhadas com alça de Drigalski. Em seguida, discos de papel filtro (5,6mm de diâmetro) esterilizados por autoclavagem, foram embebidos nas referidas concentrações do extrato vegetal aquoso (0; 2; 4; 6 e 8 mg/mL) esterilizados em filtros de membrana Millipore 0,22µm. No tratamento controle (0mg/mL) os discos de papel foram umedecidos com água destilada esterilizada (ADE).

Os discos do experimento foram depositados em quatro pontos na placa de Petri as quais foram mantidas em estufa incubadora B.O.D a uma temperatura constante de 26°C até o momento da avaliação, que foi realizada 48 horas após a incubação, através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano em dois sentidos oposto, para posterior realização da média (Figura 2).

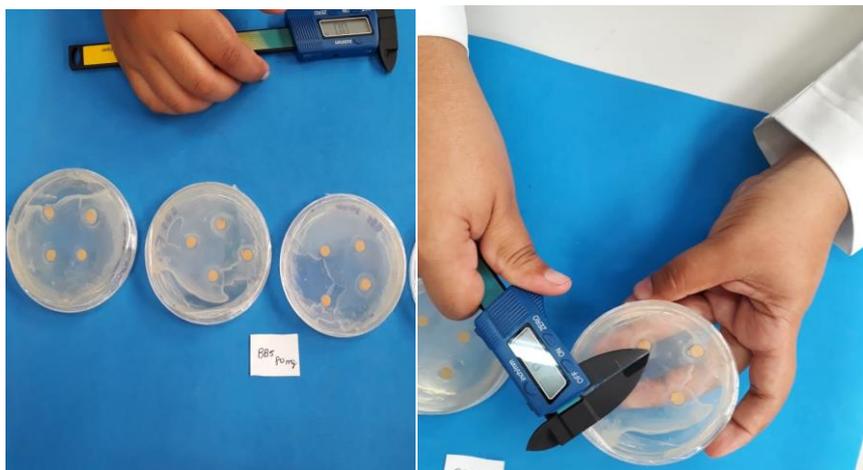


Figura 1: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais após 48hrs de incubação, no laboratório de Fitopatologia na Unidade Acadêmica de Garanhuns-UAG. Fonte: SILVA, R.M. 2018.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No experimento *in vitro*, foram utilizadas cinco concentrações distintas (tratamentos), sendo elas 0 (controle); 2; 4; 6 e 8 mg/mL com quatro repetições para cada tratamento.

A unidade experimental considerada uma placa de Petri com 4 discos cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as concentrações de cada extrato a uma análise de regressão pelo programa estatístico ASSISTAT 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento *in vitro*, as médias das concentrações do extrato vegetal ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão. O extrato de Goiabeira foi capaz de provocar a maior inibição do crescimento bacteriano nas concentrações de 4,60 mg/mL (Figura 3), formando halos de inibição de maior diâmetro. Silva et al. (2018) pesquisando os efeitos do extrato aquoso também de uma planta exótica o Eucalipto (*Eucalyptus grandis*) sobre esta fitobácteria obteve *in vitro* resultados positivos, com a formação de halos de inibição nas concentrações em avaliação. No entanto Amorim et al. (2011) avaliando extratos da planta Melão de São

Caetano (*Momordica charantia* L.) que pertence à família das Cucurbitacea, *in vitro* sobre a *R. solanacearum* raça 2 (agente causal do Moko da bananeira) não obteve resultados positivos.

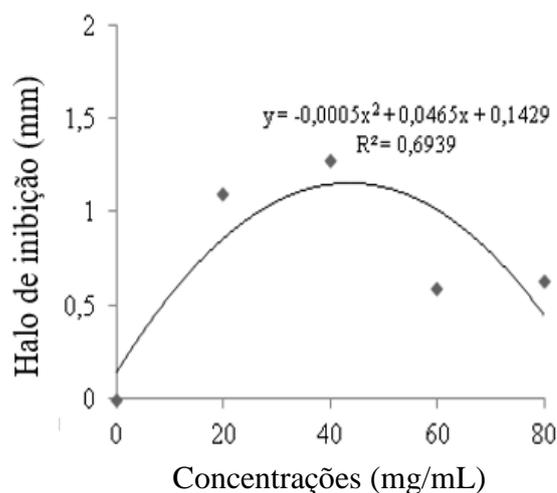


Figura 3: Gráfico do extrato aquoso *P. guajava* com as diferentes doses sobre a formação de halo de inibição de crescimento de *R. solanacearum*.

Carvalho et al. (2002) pesquisando atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *P. guajava* sobre bactérias também Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*) obtiveram resultados positivos com uma concentração menor de 1,2mg/mL, sendo o extrato hidroalcoólico proveniente do caule da planta.

Pesquisa realizada para elucidar o efeito antifúngico de extrato de *P. guajava* sobre *Candida albicans* por formas vegetativas e de biofilme, concluiu que o houve ação antimicrobiana e antibiofilme sendo um potencial para futuras profilaxias na área da medicina (GOLDENSTEIN, 2018). Na área agrônômica o óleo de goiaba, foi avaliado a propriedades antifúngicas sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* e resultados negativos sobre encontrados no crescimento micelial do fungo, porém o inverso foi comprovado para a germinação de esporos, os autores sugeriram que o fato foi recorrente da sensibilidade dos esporos a algum(s) composto(s) químico(s) que a goiaba possua e propondo novos estudos para melhor compreensão (SILVA et al.,2009).

CONCLUSÕES

O extrato vegetal aquoso proveniente das folhas da goiabeira (*Psidium Guajava*) inibiu o crescimento *in vitro* da fitobacteriose *Raltonia solanacearum*, sendo a concentração intermediária a mais eficiente, proporcionando a formação dos maiores halos de inibição.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), e ao apoio técnico do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade acadêmica de Garanhuns- CENLAG, na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: **Tomate produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. Lavras: UFLA, 2013. p. 11-23.

AMORIM, E. P. N. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 392-398, 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT- Consulta aberta**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 20 de mar 2019.

CARVALHO, A. A. T et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta farmacêuticas bonaerense**. V 21.n 4. 2002.

CIDADE BRASIL. Mapa do município de Garanhuns, 2018. Disponível em: <<https://www.cidade-brasil.com.br/mapa-garanhuns.html>> Acesso em 20 mar 2019.

COSTA, R. C.; ISHIDA, A. K. N.; MIRANDA, V. S.; DAMASCENO FILHO, A. S.; SILVA, C. T. B.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, L. C. Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 26-33, 2017.

FONTANA, D. C et al. Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pêsego. **Revista Cultivando o Saber**. V.10.n 2. p 148- 165. 2017.

GOLDENSTEIN, H. G. M. F. **Efeito antifúngico de extrato de *Psidium guajava* sobre *Candida albicans* por formas vegetativas e biofilme**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Pesquisa mensal de previsão de safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro, v 29 n.2 p1-79. 2018.

LOPES, C. A; BOITEUX L. S; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n.1, p. 125-130, 2015.

MATOS, D. L et al. Controle alternativo de *Lasiodiplodia theobromae* com óleos vegetais. **Cadernos de Agroecologia** – Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF – Vol. 13, Nº 1, Jul. 2018.

PINTO, K. M. S. **Perfil fitoquímico de extratos vegetais de espécies da caatinga e potencial no controle da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f.sp. *Citri*)**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2013.

SANTIAGO, T. R et al. Diversidade e Variabilidade de *Ralstonia solanacearum* spp. In: GAMA, M.A.S et al. **Estado da Arte em fitobacteriose Tropical**. Recife: UDUFRPE, 2016.

SILVA, A. C et al. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* penz. isolado do maracujazeiro. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1853 -1860, 2009.

SILVA, R. M. et al., **Atividade antibacteriana de extrato aquoso de eucalipto (*Eucaliptus grandis* hill) sobre o desenvolvimento in vitro de *ralstonia solanacearum***. In: II simpósio do bioma caatinga. IV workshop de sementes e mudas da caatinga, 2018, Juazeiro. Resumos. Juazeiro, UNIVASF, 2018.

SMITH, E. F. **A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant an Iraish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.)**. United States Department of Agriculture, Division of Vegetable. Physiology and Pathology, Bulletin, Washington, V.12, p. 1-28, 1896.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:7.