



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

CLEVERSON RODRIGUES

**USO DE EXTRATO PIROLENHOSO DE TECA
(*Tectona grandis*) NO CONTROLE ALTERNATIVO
IN VITRO DE *Colletotrichum gloeosporioides***

Dissertação de Mestrado

ALTA FLORESTA-MT

2014



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

CLEVERSON RODRIGUES

**USO DE EXTRATO PIROLENHOSO DE TECA
(*Tectona grandis*) NO CONTROLE ALTERNATIVO
IN VITRO DE *Colletotrichum gloeosporioides***

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. João Aguilar Massaroto
Co-orientadora: Profa Dra. Vanessa Cristina de Almeida Theodoro (*in memoriam*)

ALTA FLORESTA-MT

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catlogação na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Roberta Maria Miranda Caetano - CRB 1 / 2914

R696u Rodrigues, Cleverson

Uso de extrato pirolenhoso de Teca (*Tectona grandis*) no controle alternativo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. / Cleverson Rodrigues. Alta Floresta-MT, 2014. 57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos) – Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias da Universidade do Estado de Mato Grosso. Orientador: Prof. Dr. João Aguilar Massaroto. Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Cristina de Almeida Theodoro (*in memoriam*).

1. Extratos vegetais. 2. Antracnose. 3. Homeopatia na agricultura. 4. Região amazônica. I. Título.

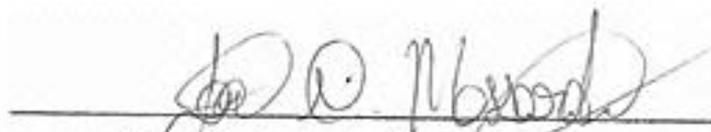
CDD 631.523

**USO DE EXTRATO PIROLENHOSO DE TECA
(*Tectona grandis*) NO CONTROLE ALTERNATIVO
IN VITRO DE *Colletotrichum gloeosporioides***

CLEVERSON RODRIGUES

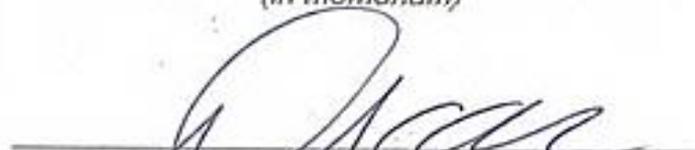
Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Aprovada em: 17/02/2014

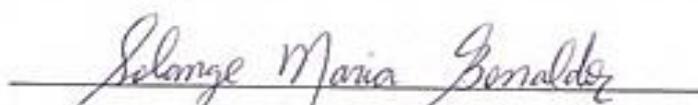


Prof. Dr. João Aguilar Massaroto
Orientador – UNEMAT/ PPGBioAgro

Profa. Dra. Vanessa Cristina de Almeida Theodoro
Co-orientadora – UNEMAT/ PPGBioAgro
(*in memoriam*)



Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
Banca - UNEMAT/ PPGBioAgro



Profa. Dra. Solange Maria Bonaldo
Banca - UFMT/ ICAA

DEDICATÓRIA

A Deus por me possibilitar mais essa conquista. A meus familiares, em especial, meus pais Antônio e Ceverina que são verdadeiros exemplos de força e determinação.

A Profa. Dra. Vanessa C. Almeida Theodoro (*in memoriam*), uma pessoa iluminada que nos deixou muitos ensinamentos, sempre nos lembrando de que somos acima de tudo *pessoas*.

A vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meu bom Deus por permitir mais uma vitória, me iluminando com sua divina sabedoria.

Aos meus pais Antônio e Ceverina, por acreditar e contribuir para a realização de mais uma conquista.

Aos meus irmãos Cleber, Cléia e Fernando, cunhados Marisa e Marcelo, e sobrinhos Caio, Carlos, Camille e João pelo carinho, apoio, alegria e principalmente pela paciência em me tolerar naquelas semanas tensas durante toda a minha caminhada.

Aos meus familiares pelos momentos de alegria e descontração.

Aos amigos que conquistei durante essa caminhada, em especial a melhor turma do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade em Agroecossistemas Amazônicos a primeira sem igual; afinal só existe uma Juliana Dardengo, uma Darline Carvalho, ou um Alan Batistão, um André Lavezo, sem contar na alegria e na humildade do sistema como um Marcos José e uma Isabelle Bonini, e na simplicidade de amigos como a Inês Proença, e Lígia Eburneo, com quem sempre pude contar, em fim a todos que compartilharam dos desesperos e alegrias das disciplinas.

Aos meus amigos de “vida social”, Daiane, Lucilene, Adriano, Dilânia, Juliete, Willian entre outros, que graças a eles “tive”.

Aos professores do PPGBioAgro e da Universidade do Estado de Mato Grosso – *Campus* de Alta Floresta, por contribuírem para o crescimento pessoal de cada um, ao professor M.Sc. Walmor Moya Peres e em especial a professora M.Sc. Grace Queiroz David, pela dedicação, companheirismo, incentivo e apoio durante esse percurso.

A grande família do Laboratório de Microbiologia, pelos trabalhos executados e momentos de tensão e descontração, em especial a Márcia Soares, grande parceira.

Ao Prof. Dr. João Aguilar Massaroto, pela orientação, por acreditar e aceitar o desafio que foi proposto.

Aos professores Dr. Vicente Wagner Dias Casali, Dr. Daniel Melo de Castro, Dra. Fernanda M. C. Andrade, Dr. Fabrício Rossi, Dr. José Renato

Stangarlin e Dr. Carlos Moacir Bonato, pela atenção e colaboração prestada, no decorrer da dissertação.

A professora Dra. Vanessa Cristina de Almeida Theodoro (*in memoriam*), pela co-orientação até momentos finais da dissertação, por seus ensinamentos e por contribuir para uma sociedade mais sustentável.

A Universidade do Estado de Mato Grosso pela oferta do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biodiversidades e Agroecossistemas Amazônicos.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e a Fundação de amparo à pesquisa do estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pela bolsa concedida.

Enfim a todos aqueles que contribuíram para que hoje eu pudesse estar aqui, o meu muito OBRIGADO...

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos apenas começando,
A certeza de que é preciso continuar,
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sono uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim terá valido a pena existir.”*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
3. CAPÍTULOS.....	9
3.1 FUNGITOXICIDADE DO EXTRATO PIROLENHOSO NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ¹	9
Resumo.....	10
Abstract.....	10
Introdução	11
Material e Métodos.....	13
Obtenção do extrato pirolenhoso	13
Obtenção do patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	13
Biotestes <i>in vitro</i> para determinação da atividade antifúngica	14
Testes de desenvolvimento micelial.....	14
Teste de germinação	16
Análise estatística	17
Resultados e Discussão.....	18
Conclusões	25
Referências Bibliográficas.....	26
3.2 FUNGITOXICIDADE DE ALTAS DILUIÇÕES DE EXTRATO PIROLENHOSO NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ¹	29
Resumo.....	30
Introdução	32
Material e Métodos.....	38
Obtenção do patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	38
Obtenção do extrato pirolenhoso	38
Preparo das dinamizações.....	39
Biotestes <i>in vitro</i> para determinação da atividade antifúngica	39

Testes de desenvolvimento micelial.....	40
Teste de germinação	41
Análise estatística	42
Resultados e Discussão.....	43
Conclusões	51
Referências Bibliográficas.....	52
4. CONCLUSÕES GERAIS	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
CAPÍTULO 1	
Figura 01- Crescimento micelial (cm) do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), após oito dias de incubação. CV (%) 2,87. Alta Floresta, 2013.....	18
Figura 02 - Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), com oito dias de incubação. CV (%) 3,16. Alta Floresta, 2013.	19
Figura 03 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), após oito dias de incubação. CV (%) 9,56. Alta Floresta, 2013.	20
Figura 04 – Esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , após crescimento micelial em meio acrescido de doses de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), após oito dias de incubação. Alta Floresta, 2013.	21
Figura 05 - Curva de germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ao longo do tempo. CV (%) 19,57. Alta Floresta, 2013.	23
Figura 06 - Germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), após oito horas de incubação. CV (%) 3,79. Alta Floresta, 2013.	24
CAPÍTULO 2	
Figura 01 - Esquema do processo de dinamização (diluição e sucussão) de preparados homeopáticos (Bitencourt & Bonato, 2008).....	39
Figura 02 - Crescimento médio micelial (cm) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), após oito dias de incubação. CV (%) 3,01. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.	43
Figura 03 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (<i>Tectona grandis</i>), com oito dias de incubação. CV (%) 1, 83. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.	44

Figura 04 - Porcentagem relativa de desenvolvimento micelial (PRD) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. CV (%) 2,7. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.

..... 45

Figura 05 - Esporulação (esporos mL⁻¹) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. Alta Floresta, 2013. 48

Figura 06 - Germinação de esporos (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito horas de incubação. CV (%) 3,1. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013. 48

LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS

CAPES Coordenação de Pesquisa Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMAT Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso

PPGBioAGRO Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos

EP_t Extrato Pirolenhoso de teca

CH Centesimal Hahnemanianna

IVCM Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

PIC Porcentagem de Inibição do Crescimento micelial

PRD Porcentagem Relativa de Desenvolvimento micelial

BDA Batata-Dextrose-Ágar

DIC Delineamento Inteiramente Casualizado

P.A. Puro Absoluto

RESUMO

RODRIGUES, Cleverson. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Fevereiro de 2014. Uso de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*) no controle alternativo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Orientador: João Aguilár Massaroto. Co-orientadora: Vanessa Cristina de Almeida Theodoro (*in memoriam*).

O atual padrão de vida da sociedade requer que haja o avanço em todos os setores de produção, industrial ou agrícola. A agricultura, tão bem sucedida no aumento da produtividade dos alimentos é, no entanto altamente dependente de insumos externos à propriedade, principalmente pelo uso de agrotóxicos, tanto em volume como em quantidade de ingrediente ativo por área no Brasil, trazendo sérios problemas ambientais, de saúde pública e contaminação de alimentos. A maioria das vezes esses produtos são utilizados no controle de pragas e doenças, sendo investidos bilhões de dólares. Porém, aos poucos ganha espaço uma sociedade preocupada com desenvolvimento de uma agricultura sustentável, principalmente para aquela agricultura familiar que representa grande parte da produção de alimentos que muitas vezes são consumidos ainda *in natura*, como frutas e hortaliças. Assim, há o desenvolvimento de pesquisas que visam aprimorar técnicas e propor meios alternativos ao uso dessa gama de produtos químicos disponíveis no mercado, e desde já se mostram eficientes, sendo testado o potencial de extratos vegetais que ainda são desconhecidos ou pouco difundidos, como o extrato pirolenhoso. Este produto é oriundo da queima da madeira por meio da condensação da fumaça que é liberada a atmosfera, sendo um produto rico em compostos minerais, que podem favorecer o bom desenvolvimento ao vegetal ou agindo diretamente no fitopatógeno. Fitopatógenos como os fungos são responsáveis por muitos danos à agricultura, como *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em muitas culturas, agindo tanto no campo quanto na pós-colheita, prejudicando a lucratividade do produtor, principalmente em locais quentes e úmidos como a região Amazônica. Além do uso de extratos vegetais, recentemente tem sido realizadas pesquisas que adotam o uso de preparados homeopáticos no sistema agrícola, fato que vem apresentando bons resultados também a campo, por se tratar de uma

tecnologia social e permitir a liberdade de ação do agricultor em seu sistema de produção. Dessa maneira é de suma importância o envolvimento da pesquisa de cunho científico com os problemas locais, tentando propor meios que possibilitem o manejo desses patógenos que trazem sérios danos à produção, principalmente a agricultura familiar.

Palavras-chaves: Extratos vegetais, antracnose, homeopatia na agricultura, região Amazônica.

ABSTRACT

RODRIGUES, Cleverson. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Fevereiro de 2014. Using pyroligneous extract of teak (*Tectona grandis L.f.*) on the alternative control *in vitro* of *Colletotrichum gloeosporioides*. Adviser: João Aguilar Massaroto. Co-advisor: Vanessa Cristina de Almeida Theodoro (*in memoriam*).

The current living standard of society requires an improvement in all sections of production, industry or agriculture. Agriculture, for instance, so successful in the increasing of food productivity is, though, highly dependent on external inputs to property, mainly by the use of pesticides, both in volume and amount of active ingredient per area in Brazil, causing serious environmental and public health problems and food contamination. Most of the time these products are used to control pests and diseases, an action that requires the investment of billions of dollars. However, it is gradually rising a society worried about the development of a sustainable agriculture, especially to that family farming which represents a large amount of food production that are often consumed freshly, such as fruits and vegetables. Thus, it is taking place the development of research that aim at improving techniques and propose alternatives to the use of such variety of chemical products available in the market. These products already show effective results, among them the tests with the potential of plant extracts that are still unknown or less known, as the pyroligneous extract. This product comes from the burning of wood through the condensation of the smoke that is released to the atmosphere. It is a product rich in mineral compounds that can promote good development to the plant or acting directly on the plant pathogen. Plant pathogens such as fungi are responsible for extensive damage to agriculture, such as *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose in many cultures, acting both on the field and in post-harvest, hurting the profitability of the producer, especially in hot, humid places such as the Amazon region. Besides the use of plant extracts, research that adopt the use of homeopathic preparations in the agricultural system have been conducted and have been showing good results also in the field, because it is a social technology and allow freedom of action of the farmer in his production system. Thus it is highly important the involvement of scientific research with

local problems, trying to propose ways to allow the management of these pathogens that bring serious damage to production, mainly through family farming.

Key words: Plant extracts, anthracnose, homeopathy in agriculture, Amazon region.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O modelo de produção em que está fundamentada a agricultura atual, ainda requer muitas mudanças, a fim de melhorar o sistema como um todo, abordando todos os aspectos envolvidos na dinâmica de produção agropecuária, seja: solo, planta, animal, água e atmosfera. Tais mudanças devem ser realizadas de modo a não agravar os danos ambientais gerados por décadas de colonização.

A aplicação de defensivos químicos é o principal meio de controle fitossanitário usado por agricultores há décadas, principalmente em extensas áreas agrícolas, sendo gastos bilhões de dólares no controle de doenças, que são responsáveis por cerca de 15% de perdas na produção agrícola a nível nacional (AMORA, 2011). O uso indiscriminado dessas substâncias organossintéticas gera inúmeros problemas à saúde humana e ao meio ambiente, sem mencionar a total dependência do produtor ao sistema mercantil das grandes multinacionais.

Da totalidade de área agrícola nacional ativa, cerca de 24%, está representada pela agricultura familiar, e possui grande potencial para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, pois é bastante relevante em termos econômicos e sociais, representando 84% dos estabelecimentos agropecuários brasileiros (IBGE, 2006). De acordo com Altieri (2002), as agriculturas familiares geralmente utilizam melhor os recursos como biodiversidade, solo, água, luz solar, conhecimentos locais, entre outros, apresentando a possibilidade de melhorar a produtividade e incrementar os serviços ecológicos e socioeconômicos desempenhados pela prática agrícola.

De modo geral a agricultura familiar explora diversas culturas, principalmente olerícolas e frutíferas, além da produção animal e seus derivados, que garantem a renda familiar de muitos dos pequenos produtores, assentados nos programas de reforma agrária, cujas áreas apresentam pequenas extensões de terra, tendo como alternativa a exploração de policultivos a fim de manterem-se estáveis em suas propriedades.

Contudo é preciso que o produtor adote um novo modelo de produção no sistema agrícola, incorporando práticas como a resistência varietal, a rotação de culturas, alteração da época de plantio, a solarização, a

biofumigação e a utilização de extratos vegetais e outros compostos naturais utilizados para a proteção de plantas (PATRÍCIO, 2007), enfatizando o desenvolvimento de tecnologias alternativas ao uso exclusivo de agroquímicos para o controle de pragas e doenças, sendo esse um dos grandes desafios da agricultura sustentável (VENZON et al., 2006).

Para tanto, há necessidade de um desenvolvimento tecnológico que busque a autossustentabilidade do sistema agrícola. Nesse sentido, uma agricultura autossustentável deve manter a complexidade existente na natureza e não ser simplificada ao extremo como ocorreu no último século, justamente o século responsável por ultrapassar diversos limites planetários e tendo a agricultura como uma das responsáveis (BETTIOL, 2013).

Segundo Caporal e Costabeber (2007), ao se discutir o desenvolvimento rural sustentável devem ser analisadas as multidimensões da sustentabilidade, sejam: ecológica, ética, social, cultural, econômica, e política. Nesse contexto, a realização de pesquisas que visam inovar e produzir informações, que possam ser utilizadas pelos produtores, a fim de melhorar seus sistemas de cultivo é de suma importância, principalmente quando alguns fatores biológicos limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção.

Analisando a ciência da homeopatia, com seus conceitos, filosofias e princípios e, mediante as observações da família agrícola homeopata, Andrade e Casali (2011), afirmam que a homeopatia é coerente com as bases epistemológicas que norteiam a sustentabilidade, e é possível inferir que a homeopatia associada às práticas de manejo ecológicas tem permitido a rápida transição dos agrossistemas às condições mais equilibradas e sustentáveis.

Segundo Martín et al. (2005), os medicamentos homeopáticos, como os extratos vegetais, constituem uma alternativa de controle na produção de alimentos livres de agroquímicos, além de preservar recursos naturais e reduzir os custos produção, preconizando a base de um sistema de produção mais sustentável.

Esses produtos têm sido empregados de forma empírica por muitos agricultores familiares, que utilizam este sistema de cultivo com maior aproveitamento dos recursos naturais à sua disposição e de forma eficiente na

inibição do desenvolvimento de vários organismos fitopatogênicos, sem provocar efeitos indesejáveis ao ambiente (BETTIOL, 1991).

Assim, os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas vêm sendo utilizados em estudos visando à redução do uso de agroquímicos, com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos. Pesquisas têm mostrado que espécies vegetais comumente presentes na agricultura familiar, como: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerona (*Origanum majorana*), pitanga (*Eugenia uniflora*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), nim (*Azadirachta indica*), pimenta (*Capsicum spp.*), arruda (*Ruta graveolens*), dentre outras, ou extratos vegetais como a manipueira e o pirolenhoso, têm sido utilizados de diversas maneiras nos estudos *in vitro* e *in vivo*, verificando-se ação direta, inibindo a produção e germinação de esporos ou afetando o crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos, quando não induzindo a produção de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitores, tornando o hospedeiro mais resistente (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; CARNEIRO et al., 2007; PENTEADO, 2007).

A pesquisa realizada *in vitro* é o primeiro passo para identificar o potencial de produtos oriundos de vegetais da flora nativa no controle de fitopatógenos, dentre os quais, destaca-se o uso do extrato pirolenhoso, oriundo da condensação da fumaça durante a queima da madeira, que há muito tempo vem sendo utilizado na agricultura como meio alternativo ao controle de pragas e doenças e fonte de nutrientes, conforme relatado por Campos (2007) e Zanetti (2004).

No entanto, seu uso é limitado nos sistemas de produção de bases agroecológicas, devido à presença de compostos como o alcatrão, que é altamente poluente e conter componentes cancerígenos, como benzopirenos e outros (CAMPOS, 2007). Tal problema pode ser resolvido com a adoção da prática homeopática na agricultura, pois a mesma permite o uso de inúmeras substâncias que outrora apresentam características tóxicas, seguindo o princípio da dose mínima (CASALI et al, 2006).

Assim a experimentação de novos preparados homeopáticos no meio rural, a partir de recursos locais tem sido valorizada, por ser vista como estratégia de sustentabilidade, favorecendo a independência dos agricultores

do auxílio técnico e do uso de recursos externos à propriedade (CUPERTINO, 2008), sendo considerada essa uma tecnologia social. Segundo Bonfim e Casali (2011), a homeopatia vem sendo utilizada com grande sucesso na produção orgânica e em sistemas agroflorestais, adotadas principalmente no controle de pragas e doenças.

Dentre os agentes etiológicos que agravam os sistemas de produção, destacam-se os fungos, que geram danos primários e agem numa gama de hospedeiros trazendo sérios problemas fitossanitários, nos quais podemos destacar o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, promotor de grandes prejuízos, principalmente, em épocas quente e chuvosas.

Este gênero apresenta ampla distribuição geográfica no mundo, causando as doenças denominadas antracoses, que representam sérios problemas em regiões tropicais e subtropicais. Dentre essas a região Amazônica, que segundo Siviero & Gasparoto (1995), trata-se de um patógeno limitante a produção agrícola na Amazônia, na qual os danos e as perdas gerados variam da cultura e de região para região, dependendo do tipo de manejo empregado nas culturas, de acordo com tais autores as medidas de controle deste patógeno são de difícil adoção e antieconômicas para a maioria dos agricultores dessa região.

Em geral, os sintomas da doença são caracterizados por manchas necróticas, queima e queda de flores, podridão e queda de frutos, cancro e secamento de ramos, tombamento de plantas jovens, dentre outros (MENEZES & OLIVEIRA, 1993).

É um importante como patógeno quiescente, causando podridões de pós-colheita em frutos tropicais. O sintoma típico da doença caracteriza-se por mancha de cor escura ou lesões deprimidas com bordos ligeiramente elevados, seguidas de uma necrose no tecido do hospedeiro, com bordos irregulares e a presença de uma massa de esporos alaranjada no centro (MAFFACIOLI, 2006).

Na literatura verifica-se diversos danos a inúmeras espécies agrícolas, desde frutíferas, olerícolas a ornamentais, sendo relatadas cerca de 230 espécies de hospedeiros (MENDES & URBEN, 2014), bem como afirmam Almeida et al. (2003) em aceroleira; Benchimol (2004) em cupuaçuzeiro; Silva

et al. (2010) em cajueiro; Silva et al. (2006), Silva et al. (2009), Matos et al. (2010), Rodrigues et al. (2011) e Rozwalka et al. (2008) em frutos de goiabeira, mamoeiro, maracujazeiro e mangueira; Hellwig & Ueno (2009), Bonett & Cerri (2011) em frutos de pimenta, pimentão e jiló; Cardoso et al. (2001) em cucurbitáceas e Lins & Coelho (2004) em flores tropicais como helicônias e bastão do imperador.

A necessidade de se buscar alternativas ao controle de fitopatógenos faz com que essa pesquisa seja o primeiro passo e tenha grande importância para o meio técnico-científico e rural, a qual propõe como medida alternativa ao uso de fungicidas o extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), por meio de doses simples e dinamizadas (homeopáticas), testadas no desenvolvimento *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, subsidiando futuras pesquisas a campo, sendo coerente com a visão ecológica e holística da agricultura sustentável.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.A.; ARAÚJO, E.; GONÇALVES JUNIOR, H.; BARRETO, A.F.; CARVALHO, R.A.G. Diagnóstico e quantificação de doenças da acerola no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.176-179, 2003.

ALTIERI, M. **Agroecologia: as bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 592p.

AMORA, D.X. Preparados homeopáticos como alternativa do controle de doenças em plantas. In: BONFIM, F.P.G. e CASALI, V.W.D. **Homeopatia: planta, água e solo**. Comprovações científicas das altas diluições. Viçosa-MG. UFV, 2011. p.41-51.

ANDRADE, F.M.C. e CASALI, V.W.D. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.6, p.49-56, 2011.

BENCHIMOL, R.L. Principais Doenças do Cupuaçuzeiro e Recomendações de Controle. **Comunicado Técnico 132**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém – PA, 2004.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. 1991. p.338.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção e manejo de doenças de planta na agricultura orgânica. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46. e Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, Ouro Preto. **Anais eletrônicos...** Ouro Preto, 2013. (Suplemento CD-Rom).

BONETT, L. P.; CERRI, C. S.; Fungitoxicidade do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (dc.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Iniciação Científica. **CESUMAR**, Maringá, v.13, n.2, p.151-159, 2011.

BONFIM, F.P.G. e CASALI, V.W.D. **Homeopatia: planta, água e solo**. Comprovações científicas das altas diluições. Viçosa-MG: UFV, 2011. **120p**.

CAMPOS, A.D. Técnicas para Produção de Extrato Pirolenhoso para Uso Agrícola. **Circular Técnica 65**. Embrapa - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

CAPORAL, F.R. e COSTABEBER, J.A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios**. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 2007. 24p.

CARDOSO, M. O.; BOHER, B.; ÁVILA, A. C.; ASSIS, L. A. G. Doenças das Cucurbitáceas no Estado do Amazonas. **Circular Técnica 9**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus – AM, 2001.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E.C.; GOMES, J.C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.34-39, 2007.

CASALI, V.W.D.; CASTRO, D.M.; ANDRADE, F.M.C.; LISBOA, S.P. **Homeopatia bases e princípios**. UFV. Viçosa-MG. 2006, 150p.

CUPERTINO, M. C. **O conhecimento e a prática sobre homeopatia pela família agrícola**. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

HELLWIG, T. C.; UENO, B.; Levantamento de fitopatógenos causadores de doenças em frutíferas nativas na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.1560 –1564, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2006: Agricultura familiar, primeiros resultados. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: 2006, 267p.

LINS, S.R.O. e COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, Jun. 2004.

MARTÍN, M. C.; GONZÁLEZ, C. E. F.; ALEMÁN, M.; MENESES, N. Efecto de productos homeopáticos sobre hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*. **Centro Agrícola**. v.32, n.4. p.87-90, 2005.

MATOS, D. L.; RODRIGUES, C.; EBURNEO, L.; NEVES, I. S.; SILVA, E. S.; SILVA, P. R.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Ocorrência de fungos fitopatogênicos na pós-colheita do *Carica papaya* na região de Alta Floresta – MT. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, Suplemento, p. 243, 2010.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil**, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 17/01/2014.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Imprensa universitária. Recife:UFRPE. p.261, 1993.

PATRÍCIO, F. R. A. Controle de doenças de hortaliças - Convencional vs. Alternativo. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.87-90, 2007.

PENTEADO, S.R.; **Defensivos alternativos e naturais**. Campinas – SP, 3ª edição, 2007. 174p.

RODRIGUES, M. S.; JARDINETTI, V. A.; SCHWAN-ESTRADA K. R. F.; CRUZ M. E. S.; Efeito do óleo essencial e do hidrolato de *Eugenia caryophyllata* thunb

no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em manga. In: VIII EPC – Encontro Internacional de Produção Científica - Maringá, **Anais Eletrônico...** Maringá; 2011.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T.; Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, p.129-137, 2003.

SILVA, A. C.; SALES, N. L. P.; ARAÚJO, A. V.; CALDEIRA JÚNIOR, C. F. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v. 33, p.1853 -1860, 2009.

SILVA, E. S., EBURNEO, L., SILVA, P.R., RODRIGUES, C., MATOS, D.L., DAVID, G.Q., PERES, W.M. Ocorrência de doenças fúngicas em cajueiros (*Anacardium occidentale*) na região de Alta Floresta MT. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, Suplemento, p.179, 2010.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A. P. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; DIAS, N. O.; TAVARES, G. M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p.131-133, 2006.

SIVIERO, A. & GASPARROTO, L. *Colletotrichum* spp: um patógeno limitante a agricultura na Amazônia brasileira. **Revista Forestal Venezuelana**, Merida, v. 1, n. 1, p. 76, 1995

VENZON, M.; JÚNIOR, T.J.P.; PALLINI, A.; **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. 378p.

ZANETTI, M. **Uso de sub-produtos da fabricação de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ em ambiente protegido**. 2004. 77f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

3. CAPÍTULOS

**3.1 FUNGITOXICIDADE DO EXTRATO PIROLENHOSO NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Colletotrichum
gloeosporioides*¹**

¹ Artigo a ser submetido no periódico Summa Phytopathologica

Resumo – (Fungitoxicidade do extrato pirolenhoso no desenvolvimento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*). Produtos oriundos de fontes renováveis têm sido estudados para uso na agricultura, possibilitando incrementos na produção das culturas agrícolas, como no caso do extrato pirolenhoso. A pesquisa visou avaliar o potencial fungitóxico do extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis* L.) no crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram testadas cinco doses do extrato pirolenhoso (0, 25, 50, 100, 150 mL L⁻¹) seguindo a metodologia *pour-plate* em 10 mL de meio batata-dextrose-ágar e mantidos em sala de incubação a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 12 horas por oito dias. Foram avaliadas as variáveis crescimento micelial (cm), índice de velocidade do crescimento micelial, inibição do crescimento (%), inibição de esporulação (%) e germinação dos esporos (%). Para o crescimento micelial, assim como no índice de crescimento micelial, inibição de esporulação e germinação, houve redução à medida que se elevou as doses. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi de 56% para maior dose (150 mL L⁻¹). O extrato pirolenhoso de teca exerce ação fungitóxica direta sobre o crescimento, esporulação e germinação *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Palavras-chave: Controle alternativo, antracnose, germinação de esporos, esporulação.

Abstract - (Fungitoxicity of the pyroligneous extract in the development *in vitro* of *Colletotrichum gloeosporioides*). Products derived from renewable sources have been studied for their use in agriculture enabling increments in the production of agricultural culture, such as in the case of the pyroligneous extract. The research aimed at evaluating the fungitoxic potential of the pyroligneous extract of teak (*Tectona grandis* L.) on mycelial, sporulation and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*. The experiment was conducted in completely randomized design with five treatments and four replications. Five doses of pyroligneous extract were tested (0, 25, 50, 100, 150 mL L⁻¹) following the *pour-plate* methodology in 10 mL of potato dextrose agar media and kept in the incubating room maintained at 25 ± 2°C in a 12 hour photoperiod for eight days. Mycelial growth variables (cm), mycelial index growth speed, growth inhibition (%), sporulation inhibition (%) and spore germination (%) were evaluated. There was a reduction for the mycelial growth as well as for the rate of mycelial growth, sporulation inhibition and spore germination as the doses were increased. The percentage inhibition of mycelial growth was 56 % for the highest dose (150 mL L⁻¹). Pyroligneous extract of teak (*Tectona grandis* L.) has a direct fungitoxic action on growth, sporulation and germination *in vitro* of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*.

Key words: Alternative control, anthracnose, spore germination, sporulation.

Introdução

Na agricultura a viabilidade de utilização de produtos advindos de fontes renováveis tem sido estudada, possibilitando incrementos na produção das culturas agrícolas (SILVEIRA, 2010).

Um desses produtos é o extrato pirolenhoso, obtido por meio da condensação da fumaça liberada no processo de carbonização da madeira para produção de carvão. Trata-se de um líquido de coloração amarela à marrom avermelhada, podendo ser de diferentes espécies vegetais (PORTO et al. 2007; SILVEIRA, 2010), o que lhe confere características peculiares.

Segundo Yotzchetz Júnior (2009), de modo geral o extrato pirolenhoso é composto de ácido pirolenhoso, que pode ser definido como uma solução aquosa de ácidos acético e fórmico, metanol e alcatrão solúvel, além de outros constituintes menores como: compostos fenólicos, ácidos, componentes neutros, álcoois e micronutrientes, sendo que a maior parte é constituída por água (85%). Possui cerca de 200 tipos de compostos, que interagem sinergicamente promovendo efeito benéfico às plantas. Quando aplicado ao solo, melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas, favorecendo a absorção dos nutrientes pelas plantas (ZANETTI, 2004).

Pesquisas desenvolvidas no Japão e observações realizadas na prática revelam que o extrato pirolenhoso repele determinados tipos de pragas e previne algumas doenças, permitindo, inclusive, a redução na dosagem de defensivos (MIYASAKA et al., 2001). Porém, ainda são escassas as informações científicas quanto à sua eficácia no solo, nas plantas, no combate às pragas bem como as concentrações ideais a serem utilizadas (CAMPOS, 2007; PORTO et al., 2007).

O extrato pirolenhoso vem atraindo a atenção de pesquisadores e técnicos de várias áreas, principalmente agrônômica, como alternativa de um produto mais natural quando comparado a compostos organossintéticos. Convém destacar que a utilização do extrato pirolenhoso na agricultura, embora seu efeito comprovado no controle de pragas e doenças em plantas, ainda necessita de maiores informações e estudos complementares (CAMPOS, 2007).

Segundo Saigusa (2002), o efeito ativador ou inibidor do extrato pirolenhoso sobre os organismos vivos depende de sua concentração. O autor relata que, no caso de microrganismos, a solução tem efeito imediato e pouco duradouro, porém é eficiente para recuperar a vitalidade e ao mesmo tempo fortalecer o sistema de defesa que existe na planta, reduzindo assim, o nível de danos causados por microrganismos, podendo ser adotado juntamente a outras práticas agroecológicas.

Uma das espécies amplamente exploradas nas atividades silviagrícolas que poderia ser utilizada para produção do extrato pirolenhoso é a teca (*Tectona grandis*). Durante seu uso e processamento, são gerados grande volume de resíduos madeireiros, que podem ser destinados à produção do carvão vegetal, e conseqüentemente na conversão da fumaça em extrato pirolenhoso. Estudos químicos da teca relatam a presença de uma substância pertencente à classe da tectoquinona, presente na idade adulta, à qual são atribuídas algumas propriedades antifúngicas, bactericidas e repelentes de alguns insetos, conferindo alta durabilidade quando exposta aos rigores do tempo (RAGUNATHAN et al., 1996).

Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*) no crescimento micelial, esporulação e na germinação de esporos *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta. A pesquisa compreendeu duas etapas, sendo a primeira para a verificação da ação fungitóxica *in vitro* de doses do extrato pirolenhoso sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e a segunda para verificação dessas doses na germinação dos esporos.

Obtenção do extrato pirolenhoso

O extrato pirolenhoso foi obtido de resíduo madeireiro de teca (*Tectona grandis*) no ano de 2009, pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta, através do processo de carbonização em forno de tijolo à 180°C.

O extrato pirolenhoso obtido permaneceu acondicionado em vidro âmbar durante pouco mais de quatro anos, período suficiente para ocorrer a decantação do extrato e sua separação em fases, sendo que a fase superior contém óleos leves, a fase central o pirolenhoso puro e a fase inferior o alcatrão (MIYASAKA et al., 2001), dispensando processos de purificação para eliminar possíveis compostos que poderiam comprometer a utilização do mesmo, como o alto teor de alcatrão.

Com a separação do extrato em fases pelo processo de decantação, foi utilizada no experimento a parte central do líquido decantado, que compreende a porção pirolenhosa, com pH próximo de 3,05.

Obtenção do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*

Folhas de cajueiros (*Anacardium occidentale*) presentes na região de estudo, com quadro sintomatológico da doença antracnose, foram coletadas e levadas ao Laboratório de Microbiologia, a fim de isolar o agente causal. O isolamento foi realizado adotando-se procedimentos padrões para isolamento em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), conforme método descrito por Alfenas & Mafia (2007).

Após tal procedimento, o fungo foi repicado para demais placas de Petri até obtenção de cultura pura, mantendo-as em câmara de germinação tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas a 25°C.

Biotestes *in vitro* para determinação da atividade antifúngica

A primeira etapa envolveu os testes de crescimento micelial e esporulação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (doses de extrato pirolenhoso) e quatro repetições cada, sendo a repetição composta por sete unidades amostrais (placas de Petri).

A segunda etapa envolveu o teste de inibição da germinação de esporos, organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (doses de extrato pirolenhoso) e quatro repetições cada, sendo a repetição representada por uma lâmina de microscopia.

Testes de desenvolvimento micelial

Teste de inibição do crescimento micelial

Para a verificação da fungitoxicidade no crescimento micelial e esporulação, foi utilizado o extrato pirolenhoso de teca (EP_t) em cinco dosagens (0, 25, 50, 100 e 150 mL L⁻¹), seguindo a metodologia *pour-plate*, na qual a quantia proporcional da referida dose foi depositada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e em seguida vertido 10 mL do meio de cultura fundente (BDA), havendo assim a completa homogeneização do meio.

Após a solidificação do meio, foi depositado ao centro da placa um disco de 10 mm da cultura pura, previamente incubada por 10 dias em meio BDA. Em seguida, tais placas foram vedadas com plástico filme e mantidas em sala de incubação a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas diariamente após 48 horas de inoculação, através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) com auxílio de uma régua milimetrada, obtendo-se uma média para cada repetição, até o momento em que quinze placas de Petri (50%+1 do total de placas) de um mesmo tratamento apresentassem colonização mínima de ¾ da superfície do meio.

As variáveis resposta obtidas no teste de inibição de crescimento micelial foram:

- Crescimento fúngico: determinado a partir dos valores de crescimento micelial, utilizando as médias da última observação de cada repetição do respectivo tratamento.
- Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM): obtido a partir das médias dos valores diários de crescimento micelial de cada tratamento, conforme proposto por Oliveira (1991);

$$IVCM = \sum \frac{(D - D_a)}{N} \quad \text{onde;}$$

D = diâmetro médio atual da colônia;

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

- Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC): obtido por meio das médias finais de crescimento das repetições, a qual compara o diâmetro médio (cm) dos tratamentos em relação à testemunha, por meio da fórmula de Abbott (1925).

$$PIC = \left[\frac{(\emptyset \text{ da testemunha} - \emptyset \text{ do tratamento})}{\emptyset \text{ da testemunha}} \right] \times 100$$

Teste de inibição da esporulação

O teste de inibição da esporulação foi realizado ao término do teste de inibição de crescimento micelial. Para a determinação da concentração de esporos por mililitro, foi utilizada solução de esporos de cinco placas aleatórias de cada tratamento, na qual foram adicionadas 10 mL de água destilada estéril por placa. Com auxílio da alça de Drigalski, efetuou-se a fricção sobre o micélio, seguido de filtragem em gaze.

Em seguida, uma alíquota de 100 µL da solução pura, oriunda das cinco placas, foi depositada em câmara de Neubauer e observada em microscópico óptico a fim de efetuar a contagem dos esporos.

Após a contagem dos esporos, os dados foram inseridos no programa computacional CALIBRA versão 2011, disponibilizado pela Embrapa

Meio Ambiente, para a determinação da concentração de esporos por mililitro (SANTOS et al., 2011).

Teste de germinação

Curva de germinação de esporos

Com o objetivo de avaliar o período necessário para a máxima germinação dos esporos de *C. gloeosporioides*, foi estabelecida uma curva de germinação de esporos, relacionando a porcentagem de germinação com o tempo necessário para a germinação.

Para esse teste, utilizou-se uma alíquota de 100 µL da suspensão de esporos ($1,7 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) depositada em câmara de Neubauer, que foi incubada em câmara úmida em BOD na ausência de luz a 25°C, durante 2, 4, 6, 8 e 10 horas, totalizando cinco períodos de avaliação, com quatro repetições cada. As observações foram realizadas em microscópio óptico ao final de cada período, efetuando-se a contagem dos esporos germinados.

Teste de inibição da germinação dos esporos

Para determinar a inibição da germinação dos esporos, alíquotas de 100 µL, sendo compostas por 50 µL da suspensão de esporos ($8,5 \times 10^5$ esporos mL⁻¹) somada a 50 µL de cada dose de extrato pirolenhoso (0, 25, 50, 100 e 150 mL L⁻¹) foram colocadas em lâmina de microscopia revestida por uma camada delgada de ágar-água a 1%. As quatro lâminas de cada tratamento foram incubadas em câmara úmida no escuro, mantidas em BOD a 25°C por oito horas.

O critério para considerar o esporo germinado obedeceu à descrição de Ulloa & Hanlin (2000), que descreve o tubo germinativo como uma hifa curta que cresce a partir do poro germinativo durante a germinação e que tem desenvolvimento contínuo sob condições favoráveis, formando uma hifa de maior comprimento (micélio), sendo também considerada como uma nova fase assimilativa do fungo. Do ponto de vista deste experimento, foi considerado o tubo germinativo completo quando seu comprimento foi igual ou superior à largura do esporo.

Em seguida, junto ao microscópio óptico, procedeu-se a avaliação do teste por meio de registro fotográfico com ocular digital e objetiva com 400x de aumento. Posteriormente, projetou-se sobre essas imagens uma malha quadriculada (2x2 cm), a fim de aleatorizar a contagem dos esporos germinados, sendo contados 100 esporos para cada repetição.

Análise estatística

Os valores obtidos para crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial, porcentagem de inibição do crescimento, inibição e curva de germinação de esporos foram submetidos à análise de variância pelo teste de F, procedendo-se a análise de regressão para as concentrações testadas a um nível de significância de 1%, por meio do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011). Para a inibição da esporulação, efetuou-se apenas comparativo descritivo das médias observadas.

Resultados e Discussão

Foi observada redução gradativa no crescimento micelial à medida em que aumentou a concentração do extrato pirolenhoso de teca (Figura 01).

Donde et al. (2013), verificaram comportamento semelhante no crescimento micelial do fungo *Phytophthora* sp. quando submetido às doses do extrato pirolenhoso de teca, observando redução da miceliação de acordo com a elevação da dosagem, cuja maior eficiência foi proporcionada na maior dose (200 mL L⁻¹ com 0,31 cm). Tal comportamento também foi verificado neste estudo, havendo elevado crescimento micelial para a testemunha (3,78 cm), e uma redução desse crescimento conforme se elevava a dosagem do extrato com menor miceliação na maior dose (1,64 cm) após oito dias de inoculação.

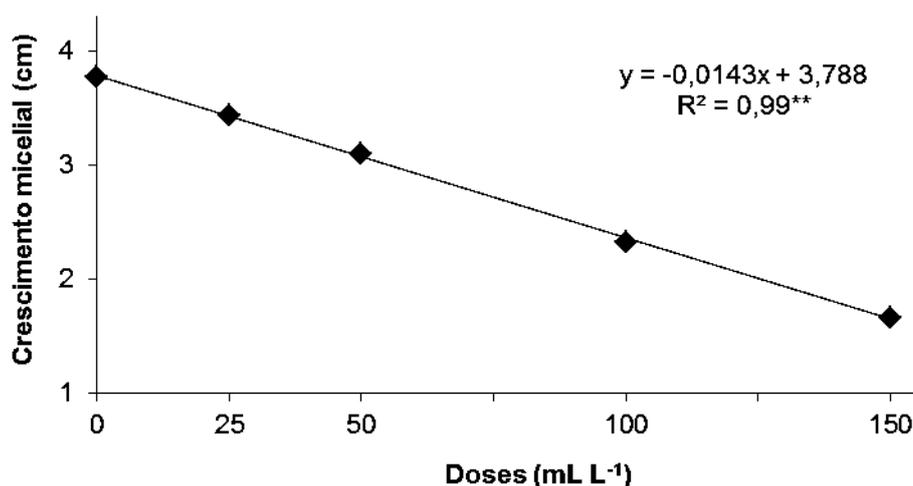


Figura 01- Crescimento micelial (cm) do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. CV (%) 2,87. Alta Floresta, 2013.

Silva et al. (2013), em estudos *in vitro* utilizando o extrato pirolenhoso de teca na dose 100 mL L⁻¹ verificaram significativa eficiência de controle no desenvolvimento do fungo *Rhizoctonia solani*, restringindo o total desenvolvimento do micélio, assim como Santos Junior et al. (2013), que na mesma dose e em diferentes concentrações do produto verificaram a total inibição do crescimento micelial em concentrações acima de 50%. No entanto, nessa pesquisa, dentro dos valores observados na mesma dose (100 mL L⁻¹), houve miceliação (2,36 cm), porém um valor inferior que a dose anterior.

Matos et al. (2011), avaliando a ação fungistática do extrato pirolenhoso de teca sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*,

verificaram que nos tratamentos acima de 50 mL L⁻¹ ocorreu a maior supressão de miceliação; ainda, observaram que a média de colonização da maior dose (100 mL L⁻¹) foi de 1,04 cm enquanto que a testemunha foi de 4 cm em mesmo período, eficiência semelhante ao observado neste ensaio.

Assim o extrato pirolenhoso reduz o crescimento micelial de alguns fungos, dentre os quais o *Colletotrichum gloeosporioides*, conforme comprovado neste experimento.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), pode ser observado na Figura 02, verificando que a velocidade de desenvolvimento do fungo na testemunha (índice de 0,55) é praticamente duas vezes maior do que na maior dose (índice de 0,28). Da mesma forma, Donde et al. (2013), estudando o comportamento do *Phytophthora* sp. sob a ação do extrato pirolenhoso de teca, observaram reduções significativas para o IVCM, tendo a maior dose (200 mL L⁻¹) o menor índice (0,09) e a testemunha um índice de 0,74. Santos Junior et al. (2013), também relatam redução significativa no índice de velocidade do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* com valores de 0,14 à uma concentração de 25% de extrato pirolenhoso e 0,73 para testemunha.

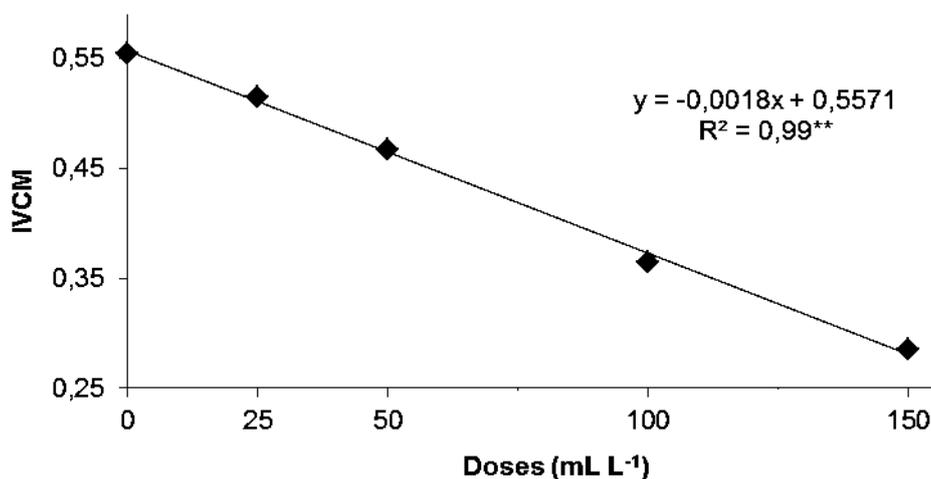


Figura 02 - Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), com oito dias de incubação. CV (%) 3,16. Alta Floresta, 2013.

O aumento das doses de extrato pirolenhoso promoveu maior porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), com uma taxa máxima

de 56,31% de inibição para a maior dose (150 mL L⁻¹) quando comparado à testemunha (Figura 03).

Resultados semelhantes a esse foram relatados por Matos et al. (2011), os quais afirmam ocorrer aumento da taxa de inibição do crescimento de *Botrytis cinerea* à medida em que se aumenta as doses de extrato pirolenhoso de teca, com pico de inibição de 60% quando comparado a testemunha. Donde et al. (2013) e Santos Junior et al. (2013) em suas pesquisas com *Phytophthora* sp. e *Rhizoctonia solani*, encontraram percentuais de inibição de 91% na dose 200 mL L⁻¹ e 100% quando em 100 mL L⁻¹, respectivamente.

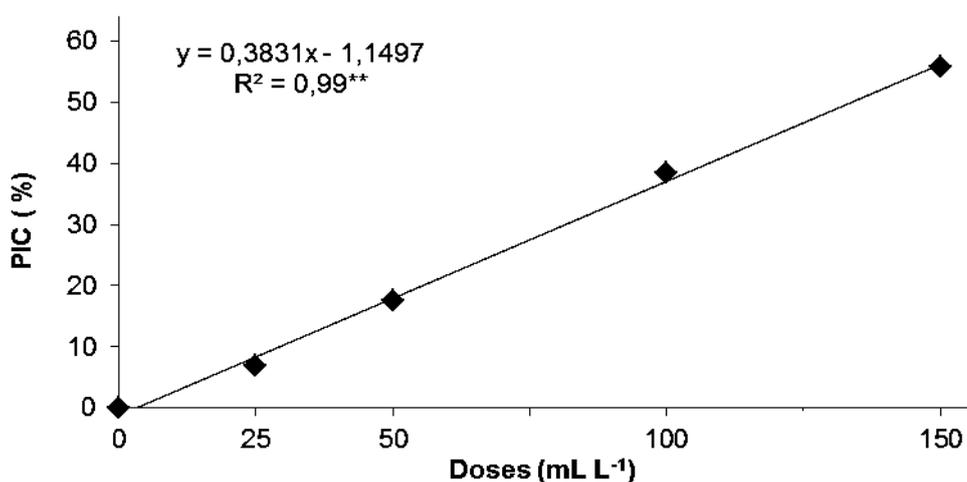


Figura 03 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. CV (%) 9,56. Alta Floresta, 2013.

As três características analisadas para a avaliação da inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função do uso de extrato pirolenhoso de teca apresentaram comportamento convergente e demonstraram eficiência do mesmo no intuito de reduzir o desenvolvimento do fungo, comprovando informações da literatura sobre o potencial do produto para utilização como agente fitossanitário.

Assim como no teste de inibição do crescimento micelial, também ocorreram alterações nas taxas de esporulação do fungo *C. gloeosporioides*, variando de acordo com a dosagem aplicada.

É observado na Figura 04, um pico máximo de esporulação (11×10^5 esporos mL⁻¹) quando utilizado 50 mL L⁻¹. Tal fato ocorre, provavelmente, pois

quando em menores dosagens o extrato pirolenhoso pode promover um estresse ao fungo, onde o mesmo, como mecanismo de ataque e sobrevivência eleva a produção de esporos, o que garante posteriormente maiores chances de colonização e dispersão.

Este fato ficou evidente em outros experimentos com controles alternativos, como observado por Balbi-Peña et al. (2006), verificando a eficiência de extratos de cúrcuma em *Alternaria solani*, onde a concentração do extrato a 1% inibiu 10% a produção de esporos a mais que quando comparado a concentração de 10%; Moura et al. (2012), com diferentes concentrações de extrato de capim-limão na taxa de esporulação do fungo *C. gloeosporioides*, verificaram que a concentração de 25% o número de esporos duplica em comparação com a concentração anterior, de 20% ($1,0 \times 10^4$).

A dose de 50 mL L^{-1} promoveu desenvolvimento micelial intermediário (Figura 01), ou seja, ocorreu restrição no crescimento médio micelial quando comparado à testemunha, no entanto proporcionou aumento de 74% na produção de esporos em relação à testemunha.

A menor concentração de esporos ocorreu na dose de 150 mL L^{-1} , com $1,3 \times 10^5$ esporos mL^{-1} ; logo a limitação do crescimento micelial (1,64 cm) atingiu um nível fungistático, que reduziu a esporulação nesse tratamento em cerca de 80% quando comparado à testemunha ($6,3 \times 10^5$ esporos mL^{-1}).

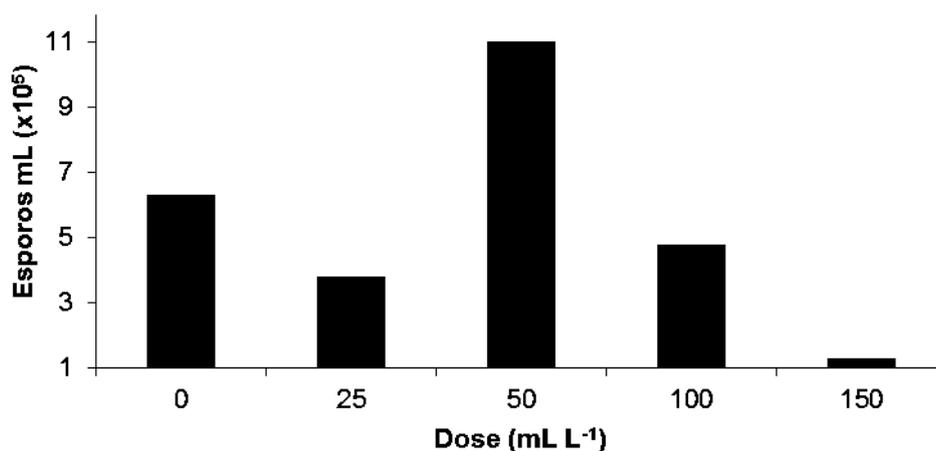


Figura 04 – Esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, após crescimento micelial em meio acrescido de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. Alta Floresta, 2013.

A determinação do período apropriado de incubação para a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos é de suma importância, pois permite a otimização do uso do tempo na realização de experimentos, bem como garante o sucesso quando se estuda o desenvolvimento e fisiologia da espécie local em estudo. A literatura apresenta divergência quanto a esse período, conforme observado em diversos estudos como Kumar & Kumar (1980), que relata cerca de seis horas de incubação para *Alternaria alternata*, *Curvularia pallescens* e *Drechslera australiensis*; Celoto et al. (2008) e Moura et al. (2012) descrevem um período de nove horas para *Colletotrichum gloeosporioides*; Balbi-Peña (2005), relata um período de doze horas para *Alternaria solani* e há casos extremos de até trinta seis horas, como descrito por Gulart (2009) para *Colletotrichum lindemuthianum*.

A curva de germinação *in vitro* dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* pode ser observada na Figura 05, na qual se verifica que a máxima germinação ocorreu após 8,8 horas de incubação (69,87%), muito próximo aos períodos que o antecedem, evidenciando que a partir das seis horas de incubação atingem-se patamares acima de 60% de germinação, (6 horas 62% e 8 horas 67%).

Esse comportamento germinativo, cujas médias se concentraram numa faixa de 60-70% de germinação, é relativamente baixo quando se observou outra variável como a porcentagem de germinação na dose zero com germinação de 98% (Figura 06), esse fato pode estar relacionado à suspensão de esporos utilizada na montagem do experimento que determinou a curva de germinação ($1,7 \times 10^6$ esporos mL⁻¹).

Geralmente altas concentrações de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* e outras espécies do gênero, são atribuídos a presença do acúmulo de material extracelular, chamado de mucilagem (exsudado de coloração alaranjada, com grande quantidade de esporos) comumente encontrada nas colônias fúngicas *in vitro*, ou em condições ambientais favoráveis, a qual está envolvida na sobrevivência, dispersão e na patogenicidade de espécies desse gênero. Segundo Mercure et al. (1994), Leite & Schadeck (1996) Bergstrom & Nicholson (1999), citados por Ferreira et al. (2009), essa mucilagem conidial, é capaz de controlar a germinação dos

esporos, verificando que quando em acérvulos ou suspensão com alta concentração, ocorre auto inibição da germinação pela presença da substância denominada micosporina-alanina, podendo ser atribuído a esse fato a baixa germinação na curva.

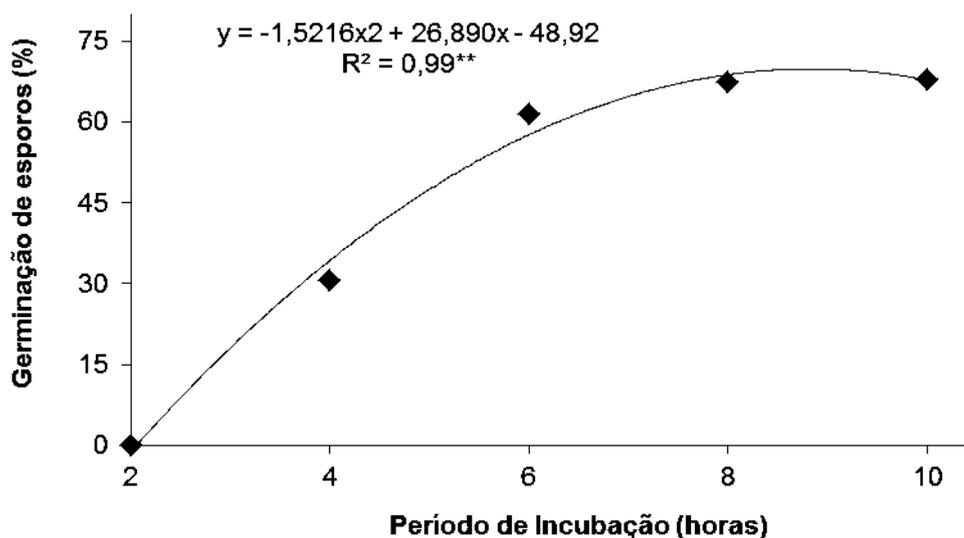


Figura 05 - Curva de germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* ao longo do tempo. CV (%) 19,57. Alta Floresta, 2013.

De acordo com os resultados obtidos, a partir de oito horas de incubação, a germinação é maior que 60%, sendo este intervalo de tempo satisfatório para se avaliar o efeito de produtos fungitóxicos na germinação de esporos de *C. gloeosporioides*.

A Figura 06 apresenta o efeito das doses de extrato pirolenhoso no processo de germinação dos esporos. Houve redução na capacidade germinativa do esporo com o aumento da dose, com um pico de germinação de 98% para a dose zero e valor mínimo de 85,81% quando aplicado 150 mL L⁻¹. Foi constatada redução próxima de 13% na taxa de germinação entre a menor e a maior dose.

Notou-se que, as dosagens 25 e 50 mL L⁻¹ apresentaram baixas porcentagens de inibição na germinação (abaixo de 3%) quando comparado à testemunha. Dosagens baixas que se comportam de modo semelhante ou próximo à testemunha no processo de germinação, poderiam não interferir no processo de infecção (penetração do fungo na planta), conforme relatam Balbi-Peña et al. (2006), e estariam atuando através de outros mecanismos em

etapas posteriores do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, como na colonização.

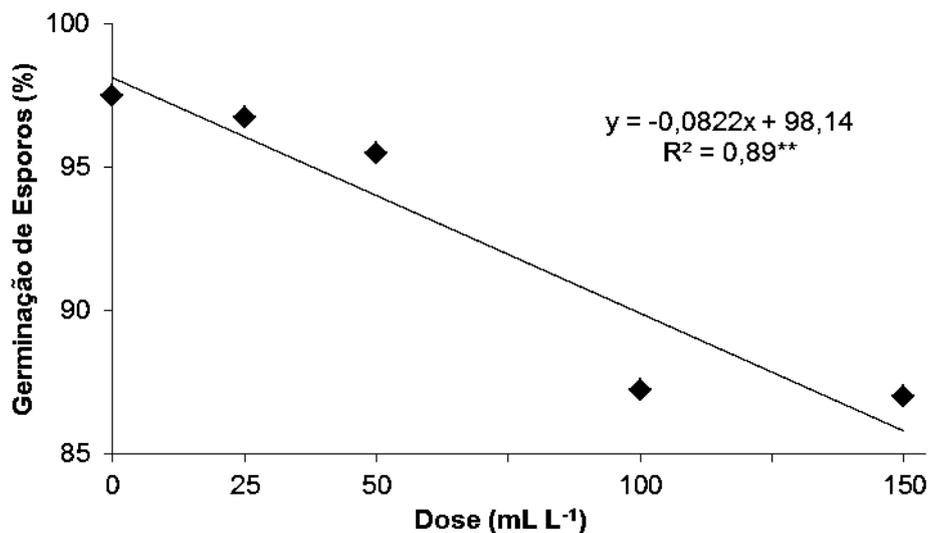


Figura 06 - Germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* sob a aplicação de doses de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito horas de incubação. CV (%) 3,79. Alta Floresta, 2013.

Os resultados obtidos em relação à germinação e esporulação de *C. gloeosporioides* corroboram os resultados encontrados nas avaliações de crescimento micelial deste estudo quanto à ação do extrato pirolenhoso de teca como agente fungitóxico *in vitro*, sendo o primeiro passo para identificar o potencial desse produto no controle de fitopatógenos. No entanto, pesquisas *in vivo* devem ser realizadas para comprovação de sua eficiência, avaliando a resposta do mesmo quando em interação com demais fatores em situações de cultivo a campo.

Conclusões

O extrato pirolenhoso de teca, nas condições em que foi desenvolvida a pesquisa, apresenta ação fungistática sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, C.A. & MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p.

BALBI-PEÑA, M.I. **Efeito do extrato do rizoma de *Curcuma longa* e solução de curcumina em *Alternaria solani* e controle de pinta preta em tomateiro**. 2005. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon.

BALBI-PEÑA, M.I., BECKER, A., STANGARLIN, J.R., FRANZENER, G; LOPES, M.C. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.310 - 314. 2006.

CAMPOS, A.D. Técnicas para Produção de Extrato Pirolenhoso para Uso Agrícola. **Circular Técnica 65**. Embrapa - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2007.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.30, n.1, p. 1-5, 2008.

DONDE, A.R.; RODRIGUES, C.; BAMBOLIM, A.; DAVID, G.Q.; PERES, W.M. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. In: SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, 1., 2013, Alta Floresta. **Anais eletrônicos....** Alta Floresta, 2013. (CD-Rom).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, J.B.; ABREU, M.S.; ALVES, E.; PEREIRA, I.S.; FERNANDES, K.D. Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.273-281, 2009.

GULART, C. A. **Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., a fungicidas sistêmicos**. 2009. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – SC.

KUMAR, R. & KUMAR, S. Effect of homoeopathic medicines on fungal growth and conidial germination. **Indian Phytopathology**, v.33, p.620-621, 1980.

MATOS, D.L; DAVID, G.Q.; PERES, W.M.; EBURNEO, L.; SILVA, M.D.; FELITO, R.A. FELITO; MACEDO, D.G.C.; YAMASHITA, O.M. Controle alternativo de *Botrytis cinerea* (Pers) com licor pirolenhoso de teca (*Tectona*

grandis L.f.), “*in vitro*”. In: SEMANA DA ENGENHARIA FLORESTAL, 5., 2011, Alta Floresta. **Anais eletrônicos...** Alta Floresta, 2011 (CD-Rom).

MIYASAKA, S.; OHKAWARA, T.; KUNIO, N.; YAZAKI, H.; SAKITA, M.N. Técnicas de produção e uso de fino de carvão e licor pirolenhoso In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: Controle ecológico de pragas e doenças, 1., 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2001, p.161-176.

MOURA, G.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; ALVES, A.P.F.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.371-379, 2012.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras. Lavras.

PORTO, P. R.; SAKITA, A. E. N.; NAKAOKA, M. S. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **Instituto Florestal**, São Paulo, n. 31, p.15-19, 2007.

RAGUNATHAN, R.; GURUSAMY, R.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, London, v.55, n.2, p.39-144, 1996.

SAIGUSA, T. **Aplicação de extrato pirolenhoso na agricultura** (APAN – Associação dos produtores de Agricultura natural). Apostila, p.24-32, 2002.

SANTOS JUNIOR, A.C.; RODRIGUES, J.M.A.; OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, C.; DAVID, G.Q.; PERES, W.M. Fungitoxidade do extrato pirolenhoso ao fungo *Rhizoctonia solani*. In: SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, 1., 2013, Alta Floresta. **Anais eletrônicos...** Alta Floresta, 2013. (CD-Rom).

SANTOS, E.R.; ALMEIDA, E.G.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W.; PINTO, Z.V.; Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão (CALIBRA) **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2011. Disponível em <<http://www.cnpma.embrapa.br/forms/calibra.php3>> Acessado em: 15 de jul de 2012.

SILVA, M. S.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M.; RODRIGUES, C. Controle alternativo “*in vitro*” de *Rhizoctonia solani* com extratos vegetais em Alta Floresta - MT In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2013, Cáceres/MT. **Anais...** Cáceres: UNEMAT, 2013, v.8, p.22-24.

SILVEIRA, C. M. **Influência do extrato pirolenhoso no desenvolvimento e crescimento de plantas de milho.** 2010. 75p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ULLOA, M. & HANLIN, R.T. **Illustrated Dictionary of Mycology.** 2000.

YOTZCHETZ JÚNIOR, R. **Produção de carvão vegetal de resíduos madeireiros da espécie timbori - *Enterolobium contortisiliquum* em forno de alvenaria.** 2009. 46p. Monografia (Eng. Florestal) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

ZANETTI, M. **Uso de sub-produtos da fabricação de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ em ambiente protegido.** 2004. 77f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

3.2 FUNGITOXICIDADE DE ALTAS DILUIÇÕES DE EXTRATO PIROLENHOSO NO DESENVOLVIMENTO DE *Colletotrichum gloeosporioides*¹

¹ Artigo a ser submetido no periódico Revista Brasileira de Agroecologia

Resumo – (Fungitoxicidade de altas diluições de extrato pirolenhoso no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*). O uso de técnicas homeopáticas torna-se uma medida alternativa de controle para inúmeros fatores bióticos e abióticos, reduzindo assim os danos gerados pelo uso indiscriminado de agroquímicos, principalmente na área fitossanitária. A pesquisa visou avaliar *in vitro* a fungitoxicidade de altas diluições ou dinamizações do extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), no crescimento micelial, esporulação e germinação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e quatro repetições. Foram testadas seis dinamizações em escala centesimal do extrato pirolenhoso de teca (3, 9, 15, 21, 27 e 33 CH) e três testemunhas (água destilada, tintura mãe, solução hidroalcoólica 30%). Todos os tratamentos foram diluídos a 0,1% em meio BDA, em seguida vertido nas placas de Petri e mantidos em sala de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas por oito dias. Foram avaliadas as variáveis crescimento micelial (cm), índice de velocidade do crescimento micelial, porcentagem relativa de desenvolvimento micelial (%), inibição da esporulação e germinação dos esporos (%). Os tratamentos não diferiram entre si para as variáveis crescimento micelial e porcentagem de germinação dos esporos, o índice de velocidade de crescimento micelial diferiu apenas para tintura mãe e a 27 CH. As variáveis porcentagem relativa de desenvolvimento e esporulação oscilaram de acordo com a dinamização, com redução máxima de 7% na PRD (33 CH) e aumento de 70% na esporulação (3 e 21 CH) diferindo-as das testemunhas. De modo geral o extrato pirolenhoso dinamizado não apresentou fungitoxicidade expressiva no crescimento, esporulação e germinação de *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: Homeopatia, antracnose, crescimento micelial, esporulação.

Abstract - (Fungitoxicity of high dilutions of the pyroligneous extract in the development of *Colletotrichum gloeosporioides*). The use of homeopathic techniques becomes an alternative control measure for various biotic and abiotic factors, thus reducing the damage caused by the indiscriminate use of agrochemicals, especially in the phytosanitary area. The research aimed at evaluating *in vitro* the fungitoxicity of high dilutions or dinamizations of the pyroligneous extract of teak (*Tectona grandis* L.) on mycelial growth, sporulation and germination of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. The experiment was arranged using a completely randomized factorial design with nine treatments and four replications. Six dinamizations were tested in a centesimal scale of the pyroligneous extract of teak (3, 9, 15, 21, 27 and 33CH) and three controls (distilled water, tincture, 30% of hydroalcoholic solution). All treatments were diluted to 0,1% on PDA, then poured in Petri dishes and kept in incubation room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in a 12 hour-photoperiod for eight days. Mycelial growth variables (cm), mycelial index growth speed, relative percentage of mycelial growth (%), inhibition of sporulation and spore germination (%) were evaluated. The treatments did not differ for the variables mycelial growth and percentage of spore germination. Mycelial index growth speed differed only for

mother tincture and at 27CH. The variables: relative percentage of development and sporulation varied according to the dinamization, with maximum reduction of 7 % in RPD (33CH) and an increase of 70% in sporulation (3 and 21CH) differing from the controls. Generally, the dinamized pyroligneous did not show significant fungitoxicity on growth, sporulation and germination of *C. gloeosporioides*.

Key words: Homeopathy, anthracnose, mycelial growth, sporulation.

Introdução

Preconizada pelo médico alemão Samuel Hahnemann em 1796, a homeopatia, termo oriundo do grego *ómoios*, “semelhante”, e *páthos*, “doente”, designa o método terapêutico baseado na lei natural de cura “*simila similibus curantur*”, ou seja, o semelhante será curado pelo semelhante. A ciência da homeopatia é embasada na observação, na experimentação e no reconhecimento e respeito pelas leis da vida, sendo seus princípios aplicados a qualquer nível de complexidade, atuando na força vital do ser, restabelecendo o equilíbrio (ANDRADE & CASALI, 2011).

Tal ciência tem como base a experimentação das preparações altamente diluídas e sucussionadas, cujos fenômenos atendem aos critérios rígidos da ciência moderna por serem repetíveis, quantificáveis, descritíveis, previsíveis e terem relação causa-efeito. Trata-se de uma ciência com filosofia, metodologia e princípios próprios (CASALI et al., 2006).

Assim, essa ciência tem como pilares quatro princípios fundamentais: *semelhante cura semelhante* – qualquer substância que possua a propriedade de despertar sintomas, de qualquer ordem, no experimentador sadio, será capaz de curar, em doses adequadas, o organismo enfermo com sintomas semelhantes (LISBOA et al, 2005); *experimentação no organismo sadio* – (patogenesia) refere-se ao procedimento sistemático de testar as substâncias homeopatizadas em organismos saudáveis, visando conhecer a ação (sintomas) dessas substâncias no organismo vivo sadio (CASALI et al., 2006); *doses mínimas* – a utilização de doses mínimas é uma forma de diminuir a toxicidade de substâncias em doses ponderais, permitindo o uso de substâncias altamente tóxicas, sem causar mal ao paciente (ROSSI, 2005); *medicamento único* – particularmente durante a experimentação, na qual o uso de mais de uma substância ao mesmo tempo pode mascarar os efeitos individuais de cada uma (CASTRO, 2013).

Há relatos de que a homeopatia chegou ao Brasil em 1840, sendo incorporada à cultura popular por médicos que ousavam contrariar a hegemonia médica, como um meio de curar as enfermidades da época (DUARTE, 2003).

Inicialmente a homeopatia era destinada ao uso humano, não havendo menção de Hahnemann do emprego desta ciência em vegetais ou outros animais, entretanto, o próprio Hahnemann afirmou em sua obra *Organon da arte de curar*¹ que “se as leis da natureza que proclamo são verdadeiras, então elas podem ser aplicadas a todos os seres vivos”. Assim, a partir de 1920, no Instituto de Biologia (Stuttgart, Alemanha), surgem pesquisas com uso dessa ciência no meio rural, onde se tem relato das experimentações em plantas (BONATO, 2009; ANDRADE & CASALI, 2011).

Os primeiros experimentos com vegetais foram realizados por Kolisko e Kolisko em 1923, orientados por Rudolf Steiner, trabalhando com muitas espécies vegetais e cerca de 300 preparados homeopáticos; a partir da década de 70, diversos autores como Khanna & Chandra (1976), Kumar & Kumar (1978) e Sinha & Singh (1983) realizaram novos ensaios com vegetais e também microrganismos na Europa e na Índia. Esses experimentos tornam-se mais frequentes na década de 90, quando também diversas pesquisas agrônomicas iniciaram no Brasil pelas escolas superiores de Viçosa-MG (UFV) e Maringá-PR (UEM) (ROSSI, 2005). De modo geral essas pesquisas visam verificar o efeito dos preparados homeopáticos, no organismo (vegetal, animal ou microbiológico), de modo a restabelecer seu equilíbrio vital.

Nesse contexto surge o termo agrohomeopatia, que tem o objetivo de levar saúde ao meio rural. É uma das ciências que se baseia no vitalismo e nos princípios agroecológicos para conhecer a natureza, sua biodiversidade, seus ciclos biológicos, suas interações e principalmente sua energia vital (ROSSI, 2005), ou seja, conservam a visão de totalidade do ser vivo de modo holístico, assim a doença é tida como um desequilíbrio da força imaterial que mantém a vida (BARBOSA NETO, 2006).

O uso da homeopatia na agricultura orgânica tem amparo legal na Instrução Normativa nº 07, publicada no Diário Oficial da União em 19 de maio de 1999. Esta normativa estabelece as normas de produção orgânica no Brasil,

¹ - O livro *Organon Del Heilkunst (Organon da arte de curar)*, publicado na Alemanha em 1810 de autoria de Hahnemann, não é o livro que inaugura a Homeopatia, em 1796 (catorze anos antes do *Organon*) o autor havia publicado sua ideia de experimentar substâncias em homens saudáveis, porém, sem dúvida, o *Organon* é seu livro mais importante, uma obra densa e rica, de impressionante atualidade e que contém todos os fundamentos teóricos da Homeopatia. No total, foram seis edições nas quais Hahnemann foi aperfeiçoando seus ensinamentos.

permitindo assim o uso dos preparados homeopáticos pelos agricultores, sendo recomendado tanto para limitações abióticas quanto para controle de doenças e pragas (ROLIM et al., 2005). De acordo com Castro (2013), este conhecimento possibilitou a utilização da homeopatia em diversos setores, especialmente na agropecuária, tanto como forma mais saudável de tratamento de animais e plantas adoecidas, como também uma possibilidade de melhorar a produção de plantas e animais através da indução de patogênias controladas, como por exemplo, estimulando a produção de metabólitos secundários de plantas medicinais. Dessa maneira, o uso da homeopatia tornou-se uma valiosa ferramenta nos sistemas de produção agrícola.

Os preparados homeopáticos baseiam-se no uso de substâncias altamente diluídas e sucussionadas, ou seja, um processo de trituração ou diluição em um veículo (água, solução hidroalcoólica) e sucussão ou agitação por meio de movimentos ritmados ascendentes e descendentes, tendo assim a dinamização ou potencialização da solução/tintura mãe. Dessa maneira tem-se a transformação da matéria pelo aumento de seu poder de informação, onde o medicamento-substância transforma-se em medicamento-informação (CASALI et al., 2006).

Os preparados dinamizados tratam de uma modalidade de energia e sendo energia devem obrigatoriamente obedecer às mesmas bases que regem os estudos energéticos. A natureza e a classificação das dinamizações homeopáticas pertencem à física atômica por se processarem dentro dos princípios da desintegração da matéria e das radiações, sem ruptura nuclear (SCHEMBRI, 1992).

Para muitos cientistas, os efeitos dos medicamentos homeopáticos não passam de um efeito placebo, uma vez que não há meios de mensuração da informação que se retém ao veículo após as diluições e sucussões, principalmente após a 12^a dinamização em escala centesimal hahnemanniana (12CH). Após essa dinamização, segundo as leis da química, nos deparamos com a constante de Avogadro, a qual afirma que 1 mol de qualquer entidade equivale a $6,0251 \times 10^{23}$ unidades dessa mesma entidade, assim, a constante possui 23 zeros. Considerando que a cada diluição realizada (1 parte em 99 partes) dois zeros são consumidos, resulta que em uma diluição de 12CH, 24

zeros são consumidos, logo não há mais um só átomo ou molécula do soluto no solvente (CESAHO, 2007).

Segundo Gutmann (1990), o efeito dos preparados homeopáticos ocorre devido a informações das moléculas do soluto que, de alguma forma, passam às moléculas do solvente. Sistemas biológicos teriam a capacidade de perceber essas informações e ter seu comportamento alterado por elas. A retenção dessas informações seria realizada com auxílio de outras moléculas, como oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono, quando se considera um sistema hidroalcolico. A transmissão das informações do soluto ao solvente seria possível devido a um “padrão de movimento” das moléculas do sistema como um todo, considerando uma “rede estrutural oscilatória”, em constante ressonância.

De acordo com Poitevin (1994) pode existir alguma especificidade molecular dos constituintes da solução de base utilizada na preparação das altas diluições da homeopatia, especificidade essa que seria conservada mesmo nas altas diluições. O papel da água é altamente relevante, pois atuaria como suporte e talvez como condutor da informação (capacidade de memória da água), devido a alterações conformacionais que ocorrem nas moléculas de água submetidas à dinamização (agitação), que por sua vez também teria sua importância como fator externo de adição de energia ao sistema solvente-soluto.

Segundo Porto (1998), a água pode ter seu comportamento alterado no que diz respeito aos efeitos causados sobre sistemas biológicos, após sofrer influencia de campos magnéticos em presença de soluções de compostos diversos, criando-se as “soluções-imagem”, que teriam efeitos semelhantes aos das soluções originais quando aplicadas em sistemas biológicos. Isso pode ser indício de que os campos de moléculas isoladas ou biocampos também possam induzir alterações sutis na molécula de água, causando assim, efeitos diversos dessa água quando em contato com seres vivos.

Segundo Rossi (2005), a homeopatia aplicada às plantas permite o controle de pragas e doenças causadas por vírus, fungos e bactérias, além de incrementar a produção de biomassa. Estas características tornam a

homeopatia uma opção ecológica para o uso no campo, totalmente de acordo com as bases agroecológicas.

O uso e eficiência de tratamentos homeopáticos no controle de fitopatógenos são relatados por diversos autores. Verma et al. (1989), visando o controle do vírus do mosaico do tabaco (VMT), com soluções homeopáticas aplicadas antes e depois da incubação do vírus reduziram 50% o conteúdo do mesmo; Khanna e Chandra (1976), também obtiveram resultados significativos no controle da “podridão dos frutos” (*Fusarium roseum*) em tomate, observando uma ação profilática e curativa. Sinha e Singh (1983) utilizando-se de vários produtos homeopáticos no controle de *Aspergillus parasiticus* e da aflotoxina B₂, verificaram que o *Sulphur* (200CH) inibiu em 100% o crescimento do fungo e a produção de aflatoxina. A *Silicea* e a *Dulcamara* também reduziram o crescimento do fungo em 50% e a produção de toxina em mais de 90%; Martín et al. (2005), avaliaram o efeito de produtos homeopáticos sobre *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasítica*, *Alternaria brasicae* em condições in vitro obtendo resultados satisfatórios no controle dos mesmos com inibições máximas de 60%, bem como Diniz et al. (2006) e Garbim et al. (2010).

No caso de experimentações utilizando-se de medicamentos homeopáticos, recomenda-se a utilização não somente de uma dinamização e sim de várias, pois as respostas podem variar em função da dinamização e do medicamento em estudo. No preparo dos tratamentos homeopáticos são utilizados produtos de origem mineral, animal e/ou vegetal, a fim de se obter a tintura mãe, para posteriores processos de diluições e succussões, conforme descrito na Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011).

Para os produtos de origem vegetal, geralmente são utilizados tinturas de extratos, resinas ou licores, como o extrato pirolenhoso obtido de resíduo madeireiro por meio da condensação dos gases no processo de carbonização da madeira, apresentando um amplo potencial de uso no meio agrícola.

Sua composição apresenta inúmeros compostos químicos que lhe confere características de adubo, inseticida, fungicida dentre outras. O extrato pirolenhoso em sua forma bruta apresenta o alcatrão, tanto solúvel quanto

insolúvel (ZANETTI, 2004), composto esse que em altas dosagens e elevado tempo de exposição pode gerar sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente, não permitindo o seu uso na produção orgânica conforme Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008 - anexos VI e VIII (BRASIL, 2008).

Seguindo os princípios da homeopatia, esse extrato pirolenhoso quando dinamizado poderia, reduzir os riscos de contaminação por alcatrão ainda solúvel e viabilizar o uso na agricultura orgânica, como medida alternativa de controle de pragas e doenças.

Desta maneira, a presente pesquisa visou avaliar *in vitro* o potencial fungistático de altas diluições ou dinamizações do extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), no crescimento micelial, esporulação e na germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta. A pesquisa compreendeu duas etapas, sendo a primeira para a verificação da ação fungitóxica *in vitro* de dinamizações do extrato pirolenhoso sobre o crescimento micelial e a esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e a segunda para verificação dessas dinamizações na germinação dos esporos.

Obtenção do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*

Folhas de cajueiros (*Anacardium occidentale*) com quadro sintomatológico da doença antracnose foram coletadas e levadas ao Laboratório de Microbiologia, a fim de isolar o agente causal (*Colletotrichum gloeosporioides*). O isolamento foi realizado adotando-se procedimentos padrões para isolamento em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), conforme método descrito por Alfenas & Mafia (2007).

Após tal procedimento, o fungo foi repicado para demais placas, para obtenção de cultura pura, mantendo-as em câmara de germinação tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas a 25°C.

Obtenção do extrato pirolenhoso

O extrato pirolenhoso foi obtido de resíduo de madeira de teca (*Tectona grandis*) no ano de 2009, pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta, através do processo de carbonização em forno de tijolo à 180°C.

O extrato pirolenhoso obtido permaneceu acondicionado em vidro âmbar durante pouco mais de quatro anos, período suficiente para ocorrer à decantação do extrato e sua separação em fases, sendo que a fase superior contém óleos leves, a fase central o pirolenhoso puro e a fase inferior o alcatrão (MIYASAKA et al., 2001), dispensando processos de purificação para eliminar possíveis compostos que poderiam comprometer a utilização do mesmo, como o alto teor de alcatrão.

Com a separação do extrato em fases pelo processo de decantação, foi utilizada no experimento a parte central do líquido decantado, que compreende a porção pirolenhosa, com pH em torno de 3,05.

Preparo das dinamizações

Para o preparo das dinamizações (diluição + succussão) utilizou-se como tintura mãe o extrato pirolenhoso de teca, seguindo a escala centesimal hahnemanniana (CH), ou seja, diluindo uma parte do preparado em 99 partes do veículo - álcool ou água; para fins experimentais adotou-se a diluição de cinco gotas da tintura mãe em 20 mL de veículo (álcool P.A. 30%) em frascos âmbar de 30 mL, sucucionando manualmente por 100 vezes, obtendo-se a dinamização 1CH; novamente o processo é repetido, na qual cinco gotas da dinamização anterior (1CH) são diluídas em 20 mL de álcool P.A. 30% seguido pela succussão, obtendo-se a 2CH e assim sucessivamente, até a dinamização 33CH.

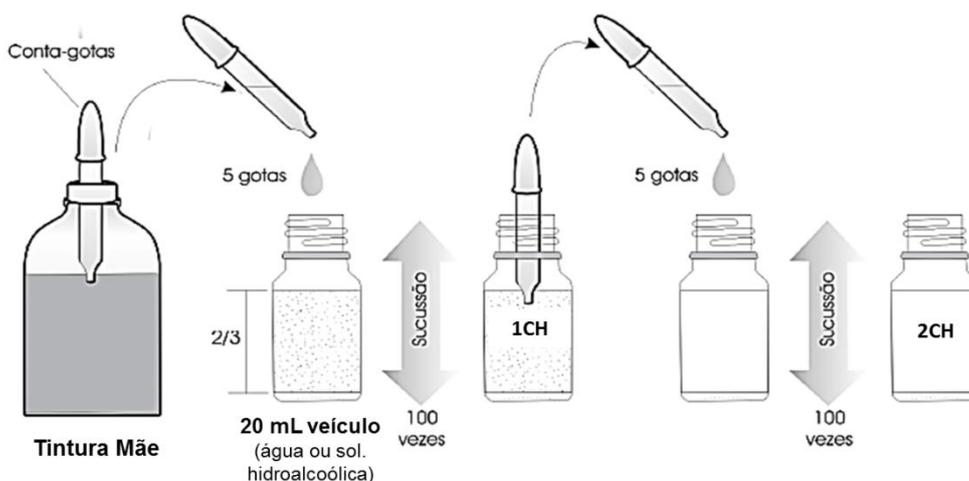


Figura 01 - Esquema do processo de dinamização (diluição e succussão) de preparados homeopáticos (Bitencourt & Bonato, 2008).

Biotestes *in vitro* para determinação da atividade antifúngica

Para determinação da atividade antifúngica do preparado homeopático, foram utilizadas seis potências ou dinamizações (3CH, 9CH, 15CH, 21CH, 27CH e 33CH), escolhidas num amplo espectro de modo a representar o comportamento do extrato dinamizado, mais três testemunhas (água destilada, tintura mãe, solução hidroalcoólica 30%), perfazendo nove tratamentos.

A primeira etapa envolveu os testes de crescimento micelial e esporulação, organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, com cinco placas de Petri em cada repetição.

A segunda etapa envolveu o teste de inibição da germinação de esporos, também em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, sendo a repetição representada por uma lâmina.

Testes de desenvolvimento micelial

Teste de inibição do crescimento micelial

Os tratamentos, nas devidas dinamizações, foram incorporados em meio de cultura BDA a temperatura máxima de 45°C, na concentração de 0,1% (TOLEDO, 2013), e então vertidos (10 mL) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Após a solidificação do meio, foi depositado ao centro da placa um disco de 10 mm da cultura pura, previamente incubada há oito dias em meio BDA; em seguida, tais placas foram vedadas com plástico filme e mantidas em sala de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas diariamente após 48 horas de inoculação, através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) com auxílio de uma régua milimetrada, obtendo-se uma média para cada repetição de cada tratamento, até o momento em que onze placas de Petri (50%+1 do total de placas) de um mesmo tratamento apresentassem colonização mínima de $\frac{3}{4}$ da superfície do meio.

As variáveis resposta obtidas no teste de inibição de crescimento micelial foram:

- Crescimento fúngico: determinado a partir dos valores de crescimento micelial, utilizando as médias da última observação de cada repetição do respectivo tratamento.
- Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM): obtido a partir das médias dos valores diários de crescimento micelial de cada tratamento, conforme proposto por Oliveira (1991);

$$IVCM = \Sigma \frac{(D - Da)}{N} \quad \text{onde;}$$

D = diâmetro médio atual da colônia;

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

- Porcentagem relativa de desenvolvimento (PRD): Foi proposto o uso de uma fórmula matemática que representasse o efeito do tratamento no desenvolvimento fúngico, levando em consideração o tratamento testemunha, que permitiria um desenvolvimento relativo de 100%, assim a PRD foi obtida a partir das médias das repetições, comparando o diâmetro médio (cm) da testemunha (água) com os demais tratamentos, por meio da fórmula;

$$PRD = \left[\frac{\emptyset \text{ tratamento}}{\emptyset \text{ testemunha}} \right] \times 100$$

Teste de inibição da esporulação

O teste de inibição da esporulação foi realizado ao término do teste de inibição de crescimento micelial. Para a determinação da concentração de esporos por mililitro, foi utilizada solução de esporos de cinco placas aleatórias de cada tratamento, na qual foram adicionadas 10 mL de água destilada estéril por placa, e com auxílio da alça de Drigalski efetuou-se a fricção sobre o micélio, seguido de filtração em gaze.

Em seguida uma alíquota de 100 µL da solução de esporos, composta das cinco placas, foi depositada em câmara de Neubauer e observada em microscópio óptico a fim de efetuar a contagem dos esporos.

Após a contagem dos esporos, os dados foram inseridos no programa computacional CALIBRA versão 2011, disponibilizado pela Embrapa Meio Ambiente, para a determinação da concentração de esporos por mililitro (SANTOS et al., 2011).

Teste de germinação

Teste de inibição da germinação dos esporos

Para determinar a inibição da germinação dos esporos, alíquotas de 100 µL, sendo compostas por 50 µL da suspensão de esporos ($1,0 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) somada a 50 µL de cada tratamento (devidamente corrigida a 0,1% do preparado homeopático em água destilada estéril) foram colocadas juntas em lâmina de microscopia revestida por uma camada delgada de ágar-água a 1%. As quatro lâminas de cada tratamento foram incubadas em câmara úmida no escuro, mantidas em BOD a 25°C por oito horas.

Foi considerado germinado o esporo cujo tubo germinativo apresentasse seu comprimento igual ou superior à largura do esporo, seguindo à descrição de Ulloa & Hanlin (2000).

Em seguida, junto ao microscópio óptico, procedeu-se a avaliação do teste por meio de registro fotográfico com ocular digital e objetiva com 400x de aumento. Posteriormente, projetou-se sobre essas imagens uma malha quadriculada (2x2 cm), a fim de aleatorizar a contagem dos esporos germinados, sendo contados 100 esporos para cada repetição.

Análise estatística

Os valores obtidos para crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial, porcentagem relativa de desenvolvimento micelial e inibição de germinação de esporos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, por meio do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011). Para a inibição da esporulação, efetuou-se apenas comparativo descritivo das médias observadas.

Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à inibição do crescimento micelial (Figura 02). As testemunhas solução hidroalcoólica 30% e tintura mãe apresentaram crescimento idêntico entre si, cuja média de crescimento foi de 3,34 cm. Com relação à testemunha padrão (água destilada) verificou-se um crescimento médio de 3,53 cm.

Mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas dentre os preparados homeopáticos de extrato pirolenhoso, a dinamização 33CH apresentou menor média de crescimento (3,30 cm), enquanto que a dinamização 3CH teve média de crescimento de 3,54 cm. Rodrigues et al. (2013), utilizando dinamizações do extrato pirolenhoso de teca no controle do fungo *Ceratocystys fimbriata*, verificaram que não houve diferença significativa entre as dinamizações testadas (5CH, 15CH e 30CH) e a tintura mãe, para o crescimento micelial *in vitro*, e relatam redução de crescimento de 1,72 cm quando comparados a testemunha água destilada.

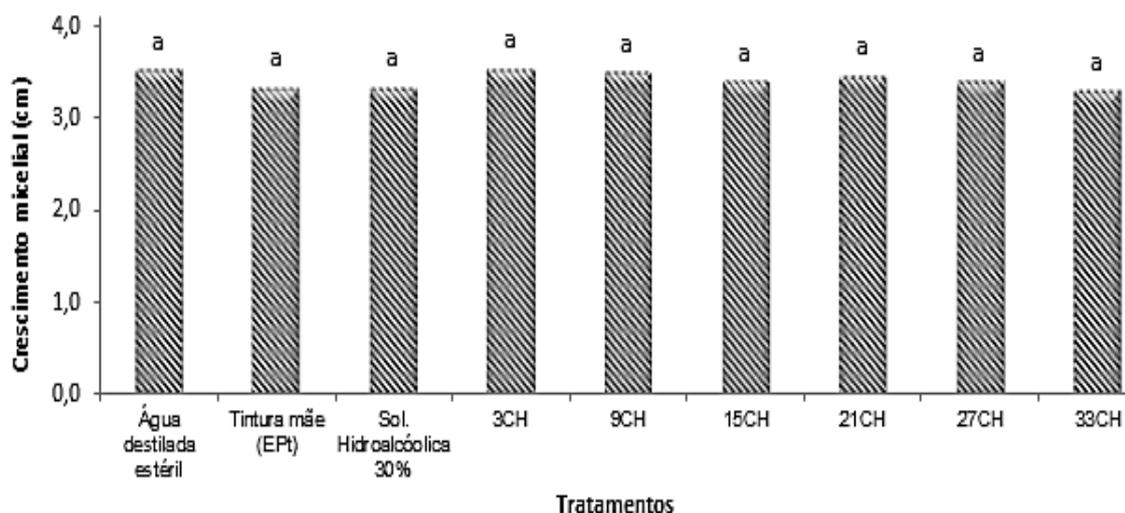


Figura 02 - Crescimento médio micelial (cm) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. CV (%) 3,01. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.

Várias substâncias na forma de preparados homeopáticos também foram testadas em outros fitopatógenos. Carneiro et al. (2010), utilizando preparados homeopáticos de bioterápico, relataram um comportamento semelhante ao observado no presente trabalho, sem diferença significativa,

entre todas as dinamizações testadas (26, 27, 28, 29 e 30CH) com as testemunhas água destilada e solução hidroalcoólica 30%, no controle *in vitro* do fungo *Alternaria solani*, fungo esse que pertence ao mesmo grupo de doenças (Grupo V), que o *Colletotrichum gloeosporioides* de acordo com a classificação de McNew em 1960. Esses fungos são responsáveis por manchas e crestamentos, e interferem no mesmo processo fisiológico vital, ou seja, na fotossíntese. De acordo com autor, doenças pertencentes a um mesmo grupo apresentam características semelhantes quanto às diversas fases do ciclo de relações patógeno-hospedeiro, não raro apresentando idênticas medidas para seu controle (BEDENDO, 2011).

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) apresentou maior valor (0,55) para a dinamização 27CH, diferindo significativamente apenas da tintura mãe (Figura 03). Notou-se que as testemunhas solução hidroalcoólica e tintura mãe apresentaram o mesmo crescimento micelial (3,34 cm) (Figura 02), demonstrado na Figura 01, tiveram um índice de velocidade diferente, porém não significativo, evidenciando que o extrato pirolenhoso (tintura mãe) interfere na velocidade de crescimento micelial sendo a menor média observada (0,52).

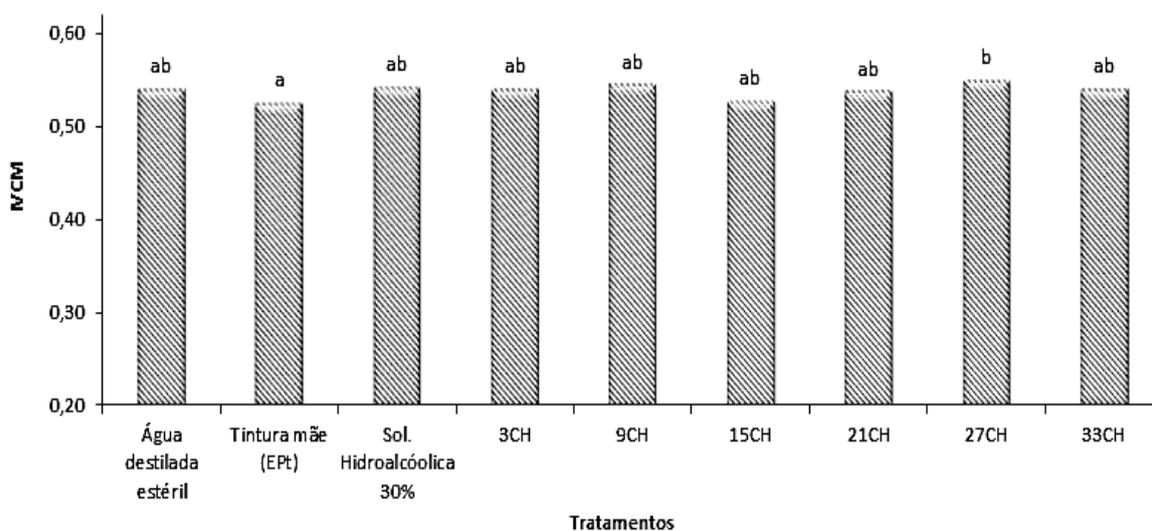


Figura 03 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanianna (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), com oito dias de incubação. CV (%) 1, 83. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.

Tal comportamento é atribuído à composição do extrato pirolenhoso, que apresenta inúmeros compostos (ZANETTI, 2004), que podem exercer efeitos negativos no avanço do micélio sobre o meio de cultura compostos esses que não se encontram no álcool P.A., base da solução hidroalcoólica.

Verificou-se que os demais tratamentos não diferiram significativamente das testemunhas, apesar de apresentarem médias maiores do que a tintura mãe.

Para a porcentagem relativa de desenvolvimento micelial (PRD) verificou-se que, quando comparados à testemunha padrão (água destilada), todos os tratamentos, exceto a dinamização 3CH (100,43%), apresentaram valores médios inferiores (Figura 04). No entanto, apenas a dinamização 33CH diferiu dos tratamentos água e 3CH, com cerca de 7% a menos que ambos os tratamentos, enquanto que os demais tratamentos mantiveram um comportamento semelhante entre si.

Rodrigues et al. (2013), relatam uma redução em torno de 55% no desenvolvimento micelial do fungo *Ceratocystys fimbriata*, quando submetido a dinamização 15CH do extrato pirolenhoso de teca. Toledo (2009), relata em seus experimentos baixa redução no desenvolvimento micelial de *Alternaria solani*, em torno de 3 a 18%, variando de acordo com a dinamização e o material de origem do preparado homeopático.

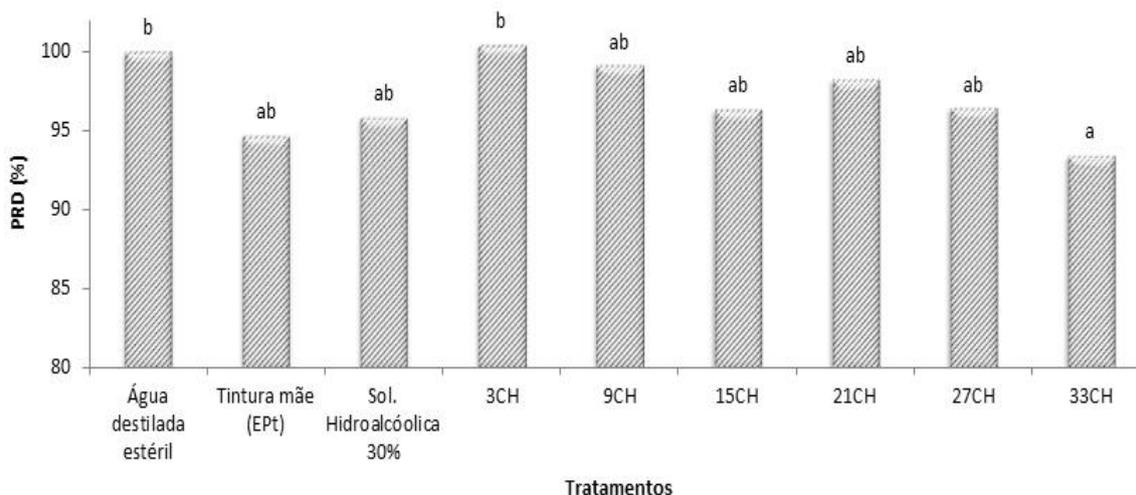


Figura 04 - Porcentagem relativa de desenvolvimento micelial (PRD) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. CV (%) 2,7. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.

Dentre os tratamentos dinamizados, todos obtiveram médias de PRD maiores do que a tintura mãe (94,7%), exceto a dinamização 33CH, que apresentou PRD de 93%.

Os comportamentos observados para as três características avaliadas de desenvolvimento micelial, com pouca ou nenhuma diferença significativa entre as testemunhas e as dinamizações avaliadas, podem estar relacionados ao princípio homeopático da dose mínima proposto por Hahnemann, em que qualquer substância no seu estado natural bruto manifesta-se por si mesma apenas como matéria, ou seja, suas doses causam efeitos interpretados pelas leis da Química, devido à presença das moléculas; no entanto no processo de dinamização da substância, os efeitos são interpretados pelas leis da Física, uma vez que a matéria é energia condensada, e a dinamização é o meio de liberar essa energia, agindo de modo não molecular (CASALI et al., 2006).

De acordo com Campos (1994) citado por Casali et al. (2006), a liberação da energia, ou expansão pelo método da dinamização, não se dá de forma linear, mas sim por saltos. Quando os saltos são expansões dentro do mesmo nível de energia, as manifestações mantêm semelhança entre si. No caso de expansões entre níveis, as manifestações mudam e os padrões vibratórios se tornam cada vez mais sutis à medida que a energia se expande. Logo, a resposta do organismo varia conforme o preparado homeopático e a potência utilizada.

Tal fato foi observado nessa pesquisa, em que ocorreu interação do preparado homeopático com o organismo avaliado, agindo de diferentes maneiras de acordo com a dinamização, assim provavelmente não há apenas uma única causa-efeito e sim uma complexidade de alterações no organismo como um todo, que age de modo ainda desconhecido, tendo como hipótese o reequilíbrio vital promovido pela patogenesia ao fungo após cultivos *in vitro*. De acordo com Rossi (2008), essas variações podem atuar na energia vital, que representa um princípio dinâmico, imaterial, distinto do corpo e que integra a totalidade do organismo, organizando todos os fenômenos fisiológicos.

Assim, um mesmo medicamento pode ser aplicável a vários organismos e para situações distintas (RISSATO et al., 2013), enfatizando a importância da utilização, em experimentações, de várias dinamizações, pois as respostas podem variar em função da dinamização e do medicamento em estudo (BONATO, 2009).

Na inibição da esporulação do fungo, observou que as testemunhas água destilada e tintura mãe apresentaram mesma concentração de esporos por mililitro ($5,5 \times 10^5$). Os demais tratamentos, quando comparados a essas testemunhas, foram inferiores e superiores dependendo da dinamização, incluindo a testemunha solução hidroalcoólica 30%, com uma redução de 27% (Figura 05).

Verificou-se que a dinamização 27CH, que no índice de velocidade de miceliação apresentou a maior média, agora na taxa de esporulação obteve uma redução de 49% ($2,8 \times 10^5$), seguido da 9CH com redução de 45%, essa sendo uma das dinamizações superiores nas variáveis de crescimento micelial. Esse fato também foi relatado por Nozaki et al. (2004) e Oliveira et al. (2011), os quais afirmam que nem sempre as condições que beneficiam o crescimento micelial são as mesmas encontradas para esporulação, fatos relacionados geralmente a composição do meio.

Algumas dinamizações tiveram um avanço na capacidade de esporulação em torno de 25% quando comparados às testemunhas água e tintura mãe, como a 3CH e a 21CH, com picos de esporulação de $6,8$ e $7,0 \times 10^5$, respectivamente.

Quando comparadas à solução hidroalcoólica 30%, apenas as dinamizações 9CH e 27CH promoveram redução na capacidade de esporulação do fungo, em torno de 27%. Porém dinamizações como 3CH e 21CH elevaram sua concentração de esporos por mililitro em mais de 70%. Ficou evidente que a maior parte das dinamizações (3, 15, 21 e 33CH) beneficiou a capacidade de esporulação.

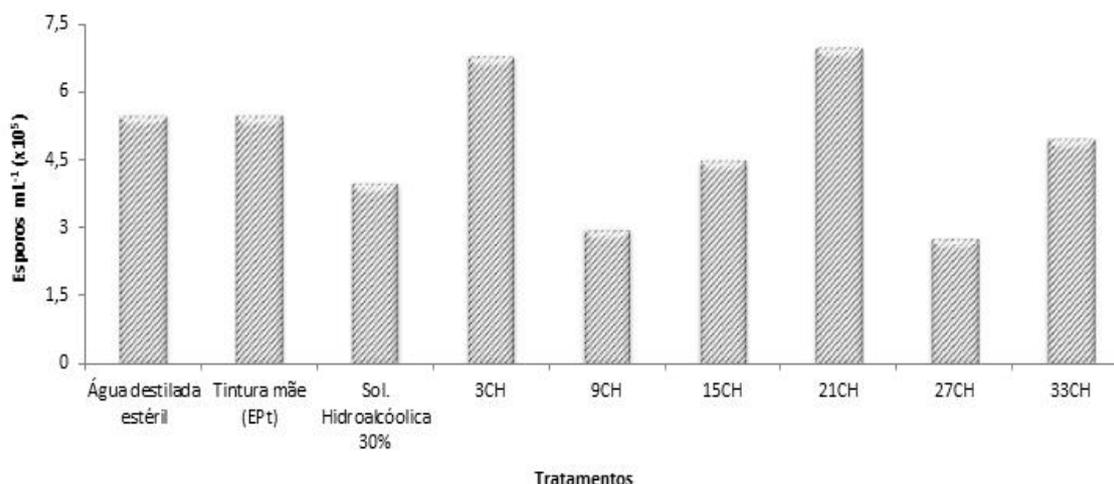


Figura 057 - Esporulação (esporos mL⁻¹) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemannianna (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito dias de incubação. Alta Floresta, 2013.

Com relação à ação das dinamizações na germinação dos esporos (Figura 06), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Toledo (2009) também verificou que não houve diferenciação entre testemunhas (água e solução hidroalcoólica) com as dinamizações de *Propolis*, *Isoterapicos*, *Ferrum sulphuricum*, *Sulphur*, *Phosphorus*, *Kali iodatum*, *Silicea terra* e *Staphysagria*, todas apresentando taxas de germinação acima de 92%, com reduções máximas de 8%.

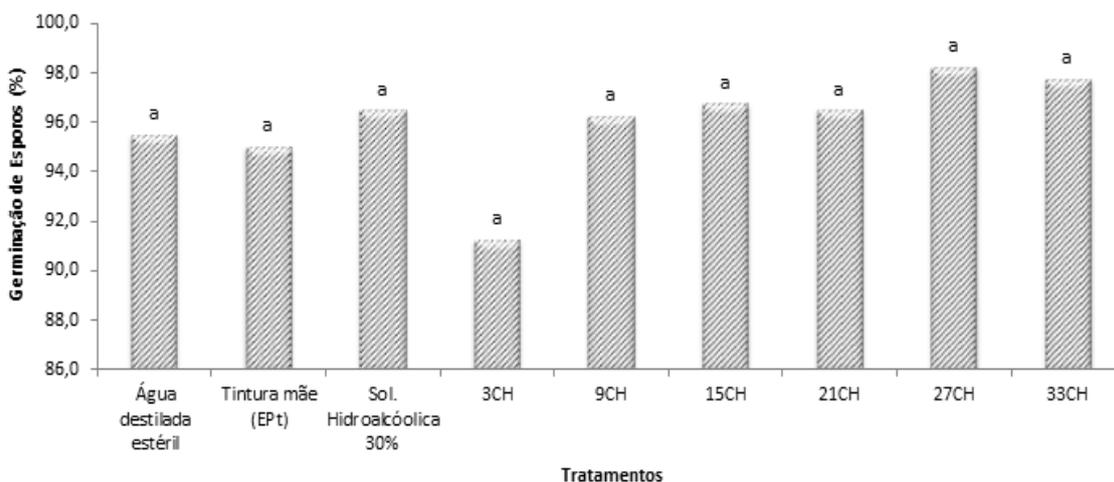


Figura 06 - Germinação de esporos (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a tratamento homeopático, em escala centesimal hahnemanniana (CH), de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), após oito horas de incubação. CV (%) 3,1. Mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta, 2013.

Nesse experimento, a maioria das dinamizações obtiveram médias superiores às testemunhas água destilada e tintura mãe, exceto a 3CH que apresentou a maior taxa de inibição da germinação (9%); entretanto essa dinamização foi a que mais beneficiou a miceliação e esporulação, apresentando a maior média de PRD entre todos os tratamentos, além de elevar a produção de esporos em cerca de 70% quando comparada à solução hidroalcoólica. Assim, a mesma dinamização agiu de modo a favorecer o desenvolvimento micelial (crescimento e esporulação) e não beneficiou a capacidade de germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Por outro lado, dinamizações como a 27CH e 33CH, que apresentaram baixos índices nas taxas de PRD e esporulação, tiveram as maiores médias na germinação dos esporos (98 e 97%, respectivamente). Esse comportamento é descrito como efeito zig-zag por Espinoza (2001), o qual ocorre quando uma substância em diferentes dinamizações pode inverter o seu efeito para determinadas características.

Apesar de não haver diferença entre os tratamentos utilizados, todos apresentaram taxas de germinação acima de 90%, denotando baixa eficiência das dinamizações no controle de germinação de esporos de *C. gloeosporioides*.

De modo geral os tratamentos homeopáticos apresentam comportamento cíclico ou senoidal, ou seja, as dinamizações apresentam formato de ondas. Segundo Bonato (2004), os medicamentos homeopáticos se comportam como energia, seguindo as mesmas leis da física de ondas eletromagnéticas como: frequência, comprimento e amplitude, assim cada onda possui natureza e frequência peculiares, assim a frequência de cada preparado homeopático depende de sua natureza.

Esse comportamento de ondas é proposto por outros autores como Kolisko & Kolisko em 1978, Bonato (2007), e relatado em experimentos como o de Castro (2002) no desenvolvimento vegetal; Andrade (2004), na vitalidade do solo; Toledo et al. (2013), no controle de microrganismos, dentre outros. O padrão de resposta em curvas, similares a ondas magnéticas, segundo esses autores, é responsável pela tendência para respostas favoráveis de atuação no

sistema patógeno-hospedeiro em baixas, médias e altas dinamizações, ora atuando como estimulantes, ora como supressores (CASALI et al., 2006).

Contudo, constatou-se que houve pouco ou nenhum efeito fungitóxico do extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), quando aplicado de modo dinamizado nos teste *in vitro*. No entanto, tais resultados não devem ser tomados como definitivos para descartar o uso desta substância como solução homeopática pois, em situação de cultivo a campo, esses preparados serão aplicados em situação de interação patógeno-hospedeiro, o que pode resultar em comportamento diferente do observado nesta pesquisa. Assim é fundamental, o desenvolvimento de outros estudos, analisando-se diferentes variáveis, dinamizações, frequência e forma de aplicação.

Conclusões

Nas condições em que foi desenvolvido o experimento, não há fungitoxicidade das dinamizações do extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*) sobre o desenvolvimento e germinação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, C.A. & MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p.

ANDRADE, F.M.C. **Alterações da vitalidade do solo com o uso de preparações homeopáticas**. 2004. 362 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ANDRADE, F.M.C. & CASALI, V.W.D. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 6, p. 49-56, 2011.

BARBOSA NETO, R.M. **Bases da homeopatia**. Liga de homeopatia – Medicina Unicamp, Campinas, 2006. 71p.

BEDENDO, I.P. Grupos de Doenças: Classificação de doenças. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds) **Manual de fitopatologia**. Princípios e conceitos. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p.423-426.

BITENCOURT, D.P. e BONATO, C.M. **Homeopatia simples aplicada na educação ambiental**. Peabiru, 2008, 26p.

BONATO, C.M. **Homeopatia simples**: Alternativa para a agricultura familiar. Marechal Cândido Rondon: Gráfica Líder, 2006, 32p.

BONATO, C.M. Homeopatia na fisiologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira** 32 (Suplemento), p.78-82, 2007.

BONATO, C.M. Homeopatia: fisiologia e mecanismos em plantas. Seminário sobre Ciências Básicas em Homeopatia, 4., 2004, Lages, **Anais...**, Lages, 2004, p.38-54.

BONATO, C.M. **Homeopatia na agricultura**. In: Encontro Brasileiro de Homeopatia na Agricultura, AMVHB , 1., 2009, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2009. p.01-14.

BRASIL. **Instrução Normativa nº64/2008**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19345>>. Acesso em: 15 Jan 2014.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; ROMANO, E.D.B.; PIGNONI, E.; TEIXEIRA, M.Z.; VASCONCELOS, M.E.C.; GOMES, J.C. Effect of biotherapeutic of *Alternaria solani* on the early blight of tomato-plant and the in vitro development of the fungus. **International Journal of High Dilution Research**. 2010; v.9, n.33, p.147-155.

CASALI, V.W.D.; CASTRO, D.M.; ANDRADE, F.M.C.; LISBOA, S.P. **Homeopatia bases e princípios**. Viçosa: UFV, 2006, 150p.

CASTRO, D.M. Homeopathy: Principles and Applications. In: International Conference on Homeopathy in Agriculture, 2., 2013, Maringá, **Anais eletrônicos...** Maringá: UEM, 2013. (Suplemento CD-Rom).

CASTRO, D.M. **Preparações homeopáticas em plantas de cenoura, beterraba, capim-limão e chamba.** 2002. 227p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CESAHO – **Mecanismo de ação do medicamento homeopático.** Centro de estudos avançados em homeopatia. Piracicaba - SP, 2007. Disponível em <http://www.cesaho.com.br/biblioteca_virtual/index.aspx> Acessado em: 20 de nov de 2012.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.171-179, 2006.

DUARTE, E.S.M. **Soluções homeopáticas, crescimento e produção de compostos bioativos em *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).** 2003. 92p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ESPINOZA, F.J.R. Agrohomeopatia: uma opción ecológica para el campo mexicano. **La Homeopatia de México**, México, v.70, n.613, p.110-116, 2001.

Farmacopéia Homeopática Brasileira. 3ª. Ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GARBIM, T. H. S.; CORRER, C. J.; OLIVEIRA, J. P.; LEONARDDI, R.; CERATTI, V.; ROMANO, E. D.; LONNI, G. A. A. S.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Avaliação do efeito de medicamentos homeopáticos sobre a germinação de esporos de *Alternaria brassicicola* e *Corynespora cassiicola*. In: Encontro de Atividades Científicas, 11., 2010, Londrina, **Anais...** Londrina: UNOPAR, 2010.

GUTMANN, V. Estudos sobre a organização do sistema molecular. **Revista de Homeopatia**, v.55, n.4, p.111-114, 1990.

KHANNA, K. K.; CHANDRA, S. Control of tomato fruit rot caused by *Fusarium roseus* with homoeopathic drugs. **Indian phytopathology**, v. 29, n. 3, p.269-272, 1976.

KUMAR, R. e KUMAR, S. Effect for certain homoeopathic medicines on fungal growth and conidial germination. **Indian Phytopathology**. v.33, p.620-621, 1980.

LISBOA, S.P.; CUPERTINO, M.C.; ARRUDA, V.M; CASALI, V.W.D. **Nova visão dos organismos vivos e o equilíbrio pela homeopatia**. UFV. Viçosa-MG, 2005, 103p.

MARTÍN, M. C.; GONZÁLEZ, C. E. F.; ALEMÁN, M.; MENESES, N. Efecto de productos homeopáticos sobre hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*. **Centro Agrícola**. v.32, n.4, p.87-90. 2005.

MIYASAKA, S.; OHKAWARA, T.; KUNIO, N.; YAZAKI, H.; SAKITA, M.N. Técnicas de produção e uso de fino de carvão e licor pirolenhoso In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: Controle ecológico de pragas e doenças, 1., 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2001, p.161-176.

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p.429-432, 2004.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras. Lavras.

OLIVEIRA, J.T.M.; BONALDO, S.M.; TRENTO, R.A. Desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. isolado de teca em diferentes meios de cultura. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13, p.1329-1334, 2011.

POITEVIN, B. Mecanismos de ação dos medicamentos de uso homeopático. Dados recentes e hipótese 1º parte – mecanismos físico-químicos. **Revista de Homeopatia**, v. 59, n1, p. 25-30, 1994.

PORTO, M.E.G. **Alterações de propriedades biológicas e físico-químicas da água induzidas por campos magnéticos**. 1998. 111p. Dissertação (mestrado em Físico-química), Universidade de Campinas, Campinas.

RISSATO, B.B.; STANGARLIN, J.R.; COLTRO, S.; LORENZETTI, E.; TOLEDO, M.V. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* with homeopathic drugs. In: International Conference on Homeopathy in Agriculture, 2., 2013, Maringá, **Anais eletrônicos...** Maringá: UEM, 2013. (Suplemento CD-Rom).

RODRIGUES, C.; SILVA, A.S.L.; SANCHES, I.J.R.; COSTA NETTO, L.F.; MESQUITA, J. S.; SILVA, M.S.; MATOS, D.L.; DAVID, G.Q.; MASSAROTO, J.A.; THEODORO, V.C.A. Action of homeopathic doses of pyroligneous extract of teak (*Tectona grandis*) in *Ceratocystis fimbriata* development. In: International Conference on Homeopathy in Agriculture, 2., 2013, Maringá, **Anais eletrônicos...** Maringá: UEM, 2013. (Suplemento CD-Rom).

ROLIM, PRR; TOFOLI, JG; DOMINGUES, RJ; ROSSI, F. Preparados homeopáticos no controle da pinta preta do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, 2005.

ROSSI, F. **Aplicação de preparados homeopáticos em morango e alface visando o cultivo com base agroecológica**. 2005. 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROSSI, F. **Ciência da Homeopatia Aplicada na Agricultura**. In: Encontro Sobre Estudos em Homeopatia, 1., 2008. p. 22-33.

SANTOS, E.R.; ALMEIDA, E.G.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W.; PINTO, Z.V.; Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão (CALIBRA) **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2011.

SCHEMBRI, J. **Conheça a Homeopatia**. Belo Horizonte. Ed. Rona Editora, 1992. 263p.

SINHA, K. K. SINGH, P. Homeopathic drugs – inhibitors of growth and aflotoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Indian Phytopathology**, v.36, p.356-357. 1983.

TOLEDO, M.V. **Fungitoxicidade contra *Alternaria solani*, controle da pinta preta e efeito sobre o crescimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) por medicamentos homeopáticos**. 2009. 95p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon.

TOLEDO, M.V.; STANGARLIN, J.R.; MEINERZ, C.C. Fungitoxic effect of homeopathic *Ferrum sulphuricum* on *Alternaria solani*. In: International Conference on Homeopathy in Agriculture, 2., 2013, Maringá, **Anais eletrônicos...** Maringá: UEM, 2013. (Suplemento CD-Rom).

ULLOA, M. e HANLIN, R.T. **Illustrated Dictionary of Mycology**. 2000.

VERMA, H. N., VERMA, G. S. VERMA, V. K. KRISHNA, R., SRIVASTAVA, K. M. Homeopathic and pharmacopeial drugs as inhibitors of tobacco mosaic vírus. **Indian Phytopathology**, v. 22, p.188-193. 1989.

ZANETTI, M. **Uso de sub-produtos da fabricação de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ em ambiente protegido**. 2004. 77f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Pode-se afirmar que doses simples do extrato pirolenhoso de teca, nas condições em que foram desenvolvidas as pesquisas, apresentam grande potencial no controle *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, enquanto que doses dinamizadas do extrato não apresentam expressiva ação fungitóxica.

“Fazer ciência é estudar os fenômenos que vão surgindo. Aceitar que só existe o que está explicado é limitar a mente.”

Vicente W. D. Casali