

EFEITOS DO EXTRATO DE *Equisetum hyemale* (CAVALINHA) NO FUNGO *Exserohilum turcicum*

W. M. ROCHA¹, F. G. M. PORTO^{2,3}, T. O. R. BEAN⁴, J. R. D. FINZER¹, L. C. ASSIS¹

¹ Universidade de Uberaba, PPGEQ – Mestrado Profissional em Engenharia Química

²SATIS- Satis Indústria e Comércio Ltda – Araxá – MG

³Univeridade Federal de Uberlândia, PPGEQ- Doutorado em Engenharia Química

⁴FAZU – Faculdades Associadas de Uberaba- Curso de agronomia

RESUMO – A preocupação em relação a preservação do meio ambiente e saúde humana tem se tornado foco no setor agroindustrial, assim a busca de alternativas benéficas a esses meios veem recebendo atenção. O fungo *Exserohilum turcicum* é popularmente chamado de Mancha Foliar e comum em cultivo de milho no Brasil, causando prejuízos à produção. Sabe-se pela literatura que o *Equisetum hyemale* (Cavalinha) possui propriedades fungicidas, desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o extrato de *Equisetum hyemale* (Cavalinha) no combate ao *Exserohilum turcicum*. Por conter sílica em sua composição, não prejudica os solos e a saúde humana podendo substituir agroquímicos. A produção dos extratos seguiu seguinte metodologia colheita, pré-secagem, moagem, extração sólido-líquido e filtragem. Ao todo foram 17 extratos, suas variações foram indicadas pelo método estatístico Planejamento do Composto Central. Para verificação de sua eficiência em meio agrícola, foi realizada a inoculação do fungo *Exserohilum turcicum* em contato com o extrato, no meio Agar Batata Dextrose (BDA). O preparo das placas seguiu a proporção de 39 g de BDA para cada litro de água, assim 10 ml do meio foram inseridos em placas de petri adicionando a proporção de 1000 µL de extrato, desta forma as placas recebiam discos de 6 mm de diâmetro contendo micélio fúngico. Para melhores análises de resultados de crescimento micelial, cálculos de IVCm e PIC foram realizados, onde extratos de pH alcalino demonstraram melhor eficiência aos de pH ácido por apresentar melhora em torno de 31%.

Palavras-chave: Extrato, Agroquímicos, Fungo.

ABSTRACT – The concern regarding the preservation of the environment and human health has become a focus in the agro-industrial sector, so the search for beneficial alternatives to these means is receiving attention. The fungus *Exserohilum turcicum* is popularly called Mancha Foliar and is common in corn cultivation in Brazil, causing production losses. It is known in the literature that *Equisetum hyemale* (Horsetail) has fungicidal properties, therefore, the aim of this study was to evaluate the extract of *Equisetum hyemale* (Horsetail) in combating *Exserohilum turcicum*. Because it contains silica in its composition, it does not harm the soil and human health and can replace agrochemicals. The production

of extracts followed the following methodology: harvest, pre-drying, milling, solid-liquid extraction and filtration. Altogether there were 17 extracts, their variations were indicated by the statistical method Planning the Central Compound. To verify its efficiency in an agricultural medium, the inoculation of the fungus *Exserohilum turcicum* was carried out in contact with the extract, in the Agar Potato Dextrose (BDA) medium. The preparation of the plates followed the proportion of 39 g of BDA for each liter of water, so 10 ml of the medium were placed in petri dishes, adding the proportion of 1000 μ L of extract, in this way the plates received 6 mm diameter discs containing fungal mycelium. For better analysis of mycelial growth results, IVCM and PIC calculations were performed, where alkaline pH extracts showed better efficiency than acidic pH for showing an improvement of around 31%.

Keywords: Extract, Agrochemicals, Fungus.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil as perdas de alimentos no seguimento vegetal por conta de doenças patogênicas apresentam um prejuízo de R\$55 bilhões de reais por ano segundo dados registrados em 2015, em relação a perdas por competição de pragas (culturas principais prejudicadas por plantas daninhas em seu desenvolvimento) apresenta prejuízo de R\$ 9 bilhões de reais (Fowler *et al.*, 2020).

Plantações estão expostas a uma ampla gama de patógenos causadores de doenças que em sua maioria são controladas mediante a utilização de agroquímicos e que se não for aplicado adequadamente podem desencadear efeitos maléficos tanto ao meio ambiente quanto a saúde de utilizadores e consumidores (Guimarães *et al.*, 2015).

O Brasil é um país que detém uma grande demanda alimentar, para tal tem uma imensa preocupação a respeito de preservação do meio ambiente e saúde humana, e para que ocorram melhorias, a evolução dos agroquímicos (ou defensivos agrícolas) é crucial para se manter em alto nível o ramo agropecuário (Fowler, 2020). Assim, diversos estudos mostram o potencial de plantas medicinais no controle fitopatogênico apresentando sua ação como defensivo agrícola sem efeitos maléficos. (Guimarães *et al.*, 2015)

As plantas medicinais contemplam de substâncias ou classes de substâncias responsáveis por ações terapêuticas. Atualmente estão sendo bastante utilizadas como recurso medicinal alternativo para tratamento de diversas enfermidades. Por ser matéria orgânica e mais acessível a população pode apresentar um grande potencial contra inúmeras pragas e doenças presentes no meio agrícola, diminuindo até a degradação de solos (Carneiro *et al.*, 2014).

A planta medicinal *Esquisetum hyemale* conhecida como cavalinha pertence à família Equisetaceae, sendo esta nativa do continente americano, possuindo uma grade aglomeração no sul do Brasil. Ela apresenta potencial para finalidade de defensivos agrícolas, pois sua composição apresenta Ácido silícico, Ácido gálico, Resinas, Sais de Potássio, Tiaminas, Luteolina, Saponinas, Compostos Orgânicos (Ca, Mg, Na, F, Mn, Si, S, P, Cl e K), Triglicerídeos (Ácido Oléico, Esteárico, Lenoléico, Elinolênico), Óleos, Flavonóides (Isoquercetina, Esquitrina, Canferol, Galutenina, Fitosterol), Alcalóides (Metosapiridina, Nicotina, Palustrina, Palustrinina), Vitamina C e Taninos. (Guimarães *et al.*, 2015), sendo nutrientes benéficos a plantas.

Ações de extratos de Cavalinha sobre as plantas atua na indução de sua resistência pela ativação das

fitoalexinas, que são metabolitos secundários que demonstram grandes ações na proteção contra vários tipos de patógenos (Guimarães *et al.*, 2015). Com isso, devido as plantas serem organismos eucariontes multicelulares, e à existência de inúmeros microrganismos, cada espécie pode reagir de variadas formas sob ação do extrato de Cavalinha. Assim no presente estudo, o fungo *Exserohilum turcicum* (mancha foliar) foi submetido a ataque com extrato de cavalinha.

Inicialmente a Mancha Foliar foi detectada na Índia em meados de 1870, posteriormente foi se transferindo para o restante dos continentes, obtendo uma grande preocupação principalmente na África do Sul e no Brasil. Ela é um patógeno que possui um bom desenvolvimento em condições de alta umidade e temperaturas entre 18 e 27°C, muito comum em lavouras de milho e pode causar sérios danos levando à seca prematura da planta (Gonçalves *et al.*, 2013).

Por ser considerado um patógeno necrotrófico tendo a capacidade de extrair nutrientes de tecidos mortos do hospedeiro, pode chegar a perdas de rendimento de uma safra de milho de 60%. Os sintomas da doença atingem com grande frequência a folhas, onde são danificadas com lesões de formato elíptico de tamanhos variados (2,5 a 15 cm de comprimento), em plantas jovens a cor das lesões é um tom de palha, nas adultas, a coloração passa para avermelhado a castanho (Rossi *et al.*, 2012).

Por sua vez, as folhas são danificadas por consequência da destruição dos tecidos fotossintéticos, por conta do aumento do número e da área das lesões necróticas, acarretando assim a redução da interceptação da radiação solar, fazendo com que, a transmissão de nutrientes fornecidos pela fotossíntese seja prejudicada, promovendo assim a baixa concentração de açúcares na planta, não ocorrendo o enchimento deste de forma devida (Alvim *et al.*, 2010). As medidas de controle mais utilizadas se devem uso de cultivares resistentes, ser feito um estudo para melhor época e local para plantio, aplicação equilibrada de adubos e fungicidas (Rossi *et al.*, 2012).

O objetivo do presente estudo é avaliar a eficiência do extrato de *Esquisetum hyemale* (Cavalinha) em contato com o patógeno *Exserohilum turcicum* (Mancha Foliar).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de *Esquisetum hyemale* (Cavalinha)

Os equipamentos utilizados para extração foram: Secador Pardal, sendo este um desidratador de pequeno porte e fácil manuseio, modelo New Hobby Digital; Medidor de umidade Mettler Toledo com sistema infravermelho, modelo HE53; Bomba de vácuo Tecnal, com sistema de filtração, modelo TE-058; Balança analítica Bel Engineering, modelo Mark; Moinho de fluxo contínuo para grãos e materiais secos Marconi, modelo MA600.

A obtenção do extrato de cavalinha foi efetuada pelas seguintes etapas:

- 1) A obtenção da planta é uma das mais influenciadoras do processo, onde são selecionados exemplares mais desenvolvidos e com suas colorações características (Verde-amarelada), onde no laboratório são devidamente higienizadas.

- 2) Segue uma pré-secagem com ar em escoamento na temperatura de 50°C por 1 hora. Isso possibilita a ocorrência de redução de tamanhos com uso de moinho de facas.
- 3) A moagem é efetuada visando a diminuição de tamanho das unidades de Cavalinha.
- 4) Após o preparo da Cavalinha com as operações preliminares, efetua-se a extração sólido-líquido. O material (Cavalinha triturada) entra em contato com o solvente, C₂H₅OH (Álcool Etílico) e H₂O (Água), usados no estudo atual.
- 5) Posteriormente, por filtração a vácuo são separados o sólido da solução lixiviada, resultando no extrato de cavalinha.

O estudo teve seu planejamento ajustado pelo método estatístico Planejamento do Composto Central, onde estipulou 17 extratos. Foram utilizadas três variáveis, concentração do solvente, tempo de extração e temperatura. Os solventes utilizados junto a Cavalinha foram H₂O (água) e C₂H₅OH (álcool etílico). A Tabela 1 apresenta as variações de extratos do planejamento.

Tabela 1: Variáveis propostas pelo Planejamento do Composto Central

Nº Procedimentos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Solvente (g)
1	25,00000	15,00000	33,3000
2	25,00000	15,00000	100,0000
3	25,00000	75,00000	33,3000
4	25,00000	75,00000	100,0000
5	50,00000	15,00000	33,3000
6	50,00000	15,00000	100,0000
7	50,00000	75,00000	33,3000
8	50,00000	75,00000	100,0000
9	20,58592	45,00000	66,6000
10	54,41408	45,00000	66,6000
11	37,50000	4,40620	66,6000
12	37,50000	85,59380	66,6000
13	37,50000	45,00000	21,4732
14	37,50000	45,00000	111,7268
15	37,50000	45,00000	66,6000
16	37,50000	45,00000	66,6000
17	37,50000	45,00000	66,6000

Fonte: Autor (2020)

2.2 Inoculação

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia da UNIUBE (Universidade de Uberaba), campus Aeroporto em Uberaba, Minas Gerais, entre os anos de 2020 a 2021. O isolado fúngico *Exserohilum turcicum* utilizados nos ensaios foram fornecidos pela SATIS e FAZU (Faculdade Associadas de Uberaba) e mantidos sob temperatura controlada visando sua conservação.

Na elaboração dos ensaios, foi utilizado a proporção de 39 g do meio BDA (Batata Dextrose Ágar) para cada litro de água destilada conforme indicação do fabricante (KASVI – Agar Batata Dextrose K25-610102). Após a união, a solução era pré-aquecida em micro-ondas por 3 minutos para homogeneização completa do material e H₂O assim podendo ser levado a autoclave.

Após autoclave, a solução era resfriada em banho maria até temperatura de 50°C, assim podendo ser transferida as placas de petri. Ao todo foram 17 extratos a serem analisados, preparando 85 ensaios sendo 5 para cada extrato, sem levar em consideração as contra provas. Cada placa recebeu 10 ml de Ágar com 1000 µL de extrato, todos sendo adicionados com auxílio de pipeta volumétrica e pera eletrônica. Em seguida, discos de 6 mm de diâmetros contendo micélio fúngico foram alocados no meio preparado, onde possibilitou o acompanhamento do crescimento micelial, sendo este medido de 2 em 2 dias. As placas de petri utilizadas foram de materiais descartáveis de dimensionamento de 90 x 15 mm de diâmetro.

Para inoculação de todos extratos, o processo foi dividido em três dias diferente gerando assim três conta provas distintas, assim a contra prova Zero 1 foi realizada nos mesmos dias dos extratos C01, C02, C04, C07, C08 e C09, para o Zero 2 os procedimentos realizados no mesmo dia foi C03, C05, C06, C10, C12 e C14, por fim o Zero 3 acompanhado pelo C11, C13, C15, C16 e C17.

2.3 Avaliação de desempenho do extrato

No período de avaliação de crescimento, a medição ocorreu até que o controle negativo (Placa com apenas BDA) tivesse completado totalmente o meio de cultura no interior da placa de Petri, que corresponde a 8,2 cm (Considerando toda estrutura da placa). Para determinação do índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), seguiu-se a seguinte formula para avaliação (Oliveira *et al.*, 1991):

$$IVCM = \sum \frac{D-Da}{N} \quad (1)$$

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual;

Da = diâmetro médio da avaliação anterior;

N = número de dias após a inoculação.

Para determinação de ação fungitóxica dos tratamentos, calculou-se a porcentagem de inibição dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando os valores médios de diâmetros de crescimento diagonais, onde com auxílio de escalímetro Trident foi aferida a medição de comprimento do micélio em seu

crescimento diagonal. A partir dos resultados obtidos determinou-se a Percentagem de Inibição do Crescimento micelial (PIC) determinado pela Equação (2): (Pereira *et al.*, 2002):

$$PIC = \frac{(d-dt)}{(d)} \cdot 100 \quad (2)$$

PIC = percentagem de inibição do crescimento micelial (em %);

d = diâmetro médio do crescimento da testemunha;

dt = diâmetro médio do crescimento do tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 nos apresenta o resultado do processo de extração sólido-líquido onde a cavalinha em contato com solvente variando temperatura e tempo produziu um novo produto.

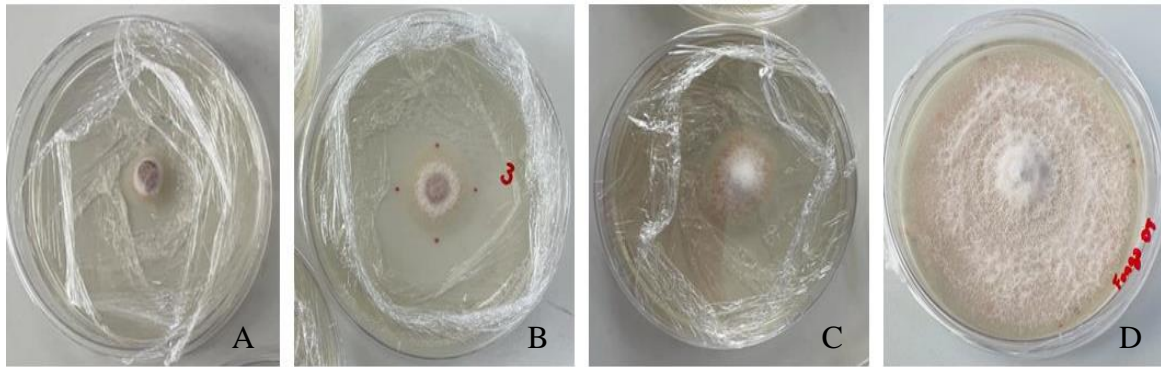
Figura 1: Extrato de *Equisetum hyemale* (Cavalinha)



Fonte: Autor (2021)

A Figura 2 demonstra o ensaio C06, apresentando o comportamento do crescimento micelial do *Exserohilum turcicum*, onde a variação ocorre pela velocidade do crescimento IVCM e pela porcentagem de inibição do crescimento PIC, em grande maioria, o fungo apresentou dados de crescimento em média de oito dias, cobrindo totalmente a placa de petri. Um grande fator que afeta o crescimento do *Exserohilum turcicum* é a temperatura, onde em temperaturas mais baixas vemos uma certa demora em seu crescimento comparado as temperaturas mais altas, nos meses de execução dos procedimentos a temperatura do ambiente variou entre 20 a 30°C, assim ocorrendo variações no crescimento dos fungos.

Figura 2: Demonstração do crescimento micelial do *Exserohilum turcicum*



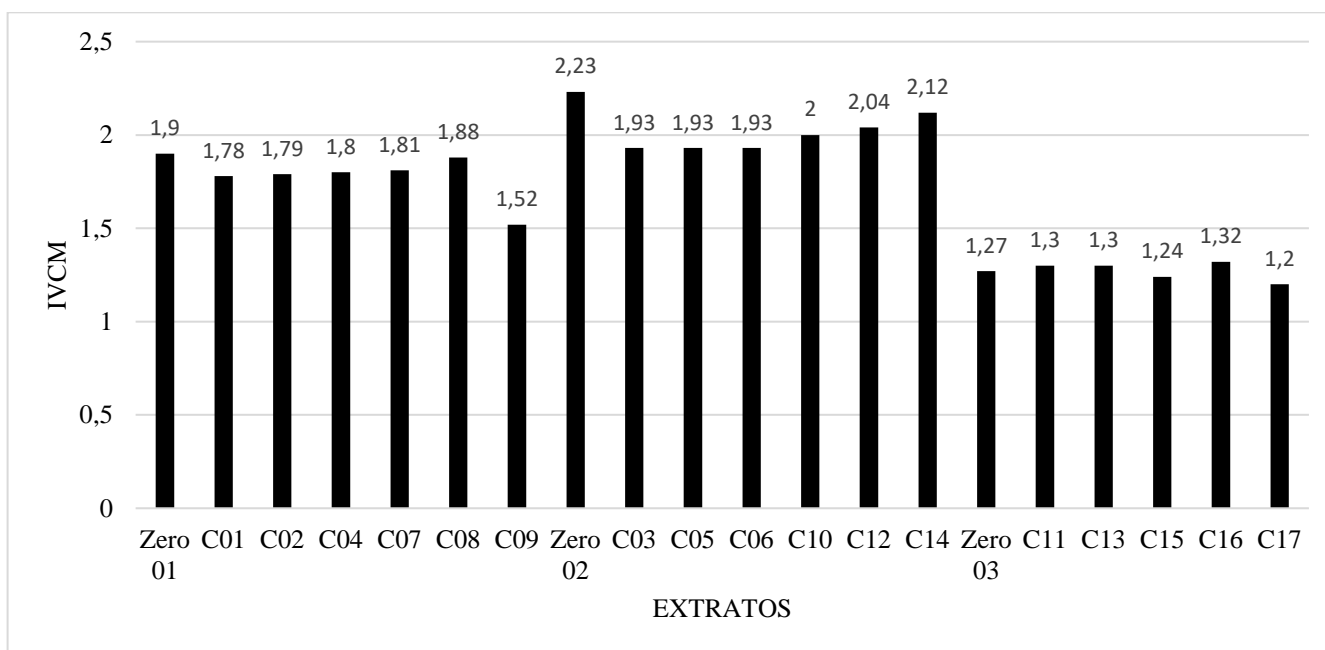
Fonte: Autor (2021)

A imagem A nos apresenta o fungo inoculado após 2 dias, a B em 4 dias, C em 6 e por fim a D com 10 dias de crescimento, tendo ocupado a área total da placa de petri.

Na inoculação do *Exserohilum turcicum*, os resultados obtidos nos ensaios possibilitaram observar o efeito de cada extrato de *Equisetum hyemale*. Todos os produtos adquiridos pela extração foram inseridos em mesma concentração no meio de cultura, e assim adquirindo seu diâmetro médio foram calculados o IVCN e o PIC, dados estes que comprovam a eficiência do extrato como um fungicida.

O gráfico de colunas representado no Gráfico 1 foi selecionado para comparação dos resultados de IVCN entre os extratos testados. Neste, os procedimentos denominados zero, apresentam a contra prova da inoculação, onde o fungo não entra em contato com o extrato, assim vemos seu crescimento natural. Já outras siglas apresentadas, apresenta o extrato utilizado para ataque ao fungo.

Gráfico 1: Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)



Fonte: Autor (2021)

Observou-se que os extratos apresentaram redução significativa do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do fungo avaliado. Cabe ressaltar que embora o fungo tenha se comportado de maneiras diferentes na contra prova, a temperatura e umidade do ambiente durante o crescimento justifica tal diferença. O *Exserohilum turcicum* apresentou dificuldades de crescimento em temperaturas baixas, portanto possuindo um diferenciações no IVCM de cada contra prova e os ensaios com extratos utilizados no mesmo procedimento.

O procedimento C06 comparado a sua contra prova (Zero 2) apresentou redução de 13,58%, em quanto o C09 comparado ao Zero 1 19,89%, o C17 com o zero 3 apresentou redução de 5,61%, esses são as melhores reduções para cada contra prova. Analisando os ensaios como um todo o melhor resultado de redução de IVCM foi apresentado pelo C09.

A Tabela 1 apresenta os resultados do Percentual de inibição do crescimento micelial (PIC), com o melhor desempenho verificado com a utilização do extrato C09 com inibição de 44,74% do crescimento micelial nos dois primeiros dias. Ao decorrer dos dias o extrato foi perdendo sua eficácia reduzindo a percentual de inibição demonstrando assim que uma nova aplicação do extrato no fungo poderia aumentar sua eficácia.

Tabela 1: Resultados de Percentual de inibição do crescimento micelial (PIC)

Procedimentos	PIC em %			
	2ºDia	4ºDia	6ºDia	8ºDia
C01	13,16	7,84	7,53	1,94
C02	7,89	9,8	8,24	1,94
C03	0	-2,45	-3,23	-1,29
C04	7,89	10,78	8,24	-1,29
C05	2,63	-5,39	-5,02	-1,29
C06	2,63	-8,82	-1,08	-0,65
C07	7,89	6,86	8,24	0
C08	7,89	-3,43	-0,36	0
C09	44,74	25	19	1,94
C10	16,39	14,02	9,76	0
C11	-27,27	9,84	5,10	-7,70
C12	13,11	8,41	9,76	0,61
C13	-18,18	4,92	2,04	2,46
C14	7,38	7,94	5,72	0
C15	0	1,64	6,12	0,82
C16	-36,36	0	-1,02	2,46
C17	0	18,03	8,16	5,74

Fonte: Autor (2021)

Para melhor verificação dos resultados encontrados, o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) a 2 fatores e nível de significância de 5% foi utilizado. Os resultados indicam que não há diferença estatística de Percentual de Inibição de Crescimento em relação aos dias (p-valor 0,2306), mas há em relação às concentrações (p-valor 0,0033), ou seja, diferentes concentrações de extração influenciam na inibição do crescimento, assim pode-se firmar em qual variação de extratos obteve-se o melhor resultado na inibição.

4. CONCLUSÃO

A partir Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e o Percentual de Inibição de Crescimento Micelial (PIC), pode-se concluir que o extrato de *Equisetum hyemale* possui um potencial como substituto de agroquímicos sendo utilizado como fungicida. Em pesquisas futuras devem se atentar às concentrações do extrato, visto que o melhor resultado foi obtido com C09 onde apresentou melhor redução na porcentagem de inibição micelial e redução na velocidade de crescimento micelial.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a SATIS (Satis Industria e Comercio Ltda), FAZU (Faculdade Associadas de Uberaba), UNIUBE (Universidade de Uberaba) e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), por todos equipamentos e materiais disponibilizados ao projeto, e a todo auxilio que tive por essas instituições.

6. REFERÊNCIAS

CARNEIRO, Fernanda Melo; SILVA, Maria José Pereira da; BORGES, Leonardo Luiz; ALBERNAZ, Lorena Carneiro; COSTA, Joana Darc Pereira. **TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL**. p. 1-32, 2014.

FOWLER, João. **Defensivos Agrícolas: saiba o que são, os tipos e a importância dos agroquímicos para a produção rural**. Tecnologia do Campo, Agricultura, abr. 2020.

GONÇALVES, Ricardo Marcelo *et al.* **Mancha-foliar-de-Phaeosphaeria (mancha-branca-do-milho): fungo ou bactéria?** Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Sete Lagos-Mg, v. 21, n. 79, p. 1-37, 2013.

GUIMARÃES, SS; MAZARO, SM; FREDDO, ÁR; WAGNER JÚNIOR, A. **Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro***. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. p. 1-7, 2015.

OLIVEIRA, João Almir. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*)**. 1991. 111 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/33483>. Acesso em: 26 ago. 2020.

PEREIRA, Liliana Auxiliadora Avelar *et al.* **Fungitoxicidade *in vitro* de Iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz**. 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbs/v24n1/v24n1a10.pdf>. Acesso em: 01 set. 2020.

ROSSI, Roberto L. de; REIS, Erlei Melo; BRUSTOLIN, Ricardo. **Deteção e quantificação da infecção natural de *Exserohilum turcium* em sementes de milho e milho pipoca**. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Águas de Lindóia-SP, p. 1-7, 2012.