

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LEONARDO FIRMINO DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE  
INÓCULOS DE *Ustilago maydis* (CANDOLLE) ORÇOS DE FRUTOS DE  
MILHO**

**CAMPINA GRANDE  
NOVEMBRO – 2018  
LEONARDO FIRMINO DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE  
INÓCULOS DE *Ustilago maydis* (CANDOLLE) CORDA ORIUNDOS DE FRUTOS DE  
MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas – habilitação Licenciatura – da Universidade Estadual da Paraíba, *Campus* I, em cumprimento das exigências para obtenção do grau de Licenciado.

**Área de concentração:** Fitopatologia.

**Orientador:** Profa. D<sup>ra</sup>. Érica Caldas Silva de Oliveria.

**Coorientador:** Profa. D<sup>ra</sup>. Valéria Veras Ribeiro.

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586a Silva, Leonardo Firmino da.  
Atividade antifúngica *in vitro* de extratos vegetais sobre  
inóculos de *ustilago maydis* (Candolle) corda oriundos de  
frutos de milho [manuscrito] / Leonardo Firmino da Silva. -  
2018.  
37 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Profa. Dra. Érica Caldas Silva de Oliveira ,  
Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."  
"Coorientação: Profa. Dra. Valéria Veras Ribeiro ,  
Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."  
1. Cultura do milho. 2. Carvão-do-milho. 3. Extratos  
vegetais. 4. Fitopatógeno. I. Título

21. ed. CDD 633.15



LEONARDO FIRMINO DA SILVA

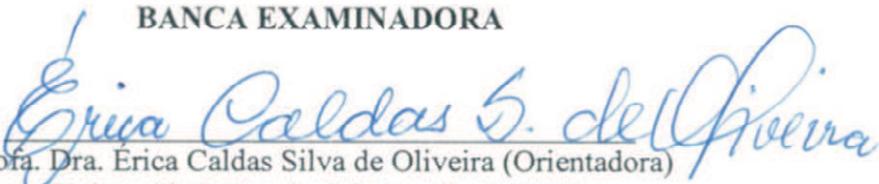
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE  
INÓCULOS DE *Ustilago maydis* (CANDOLLE) CORDA ORIUNDOS DE FRUTOS DE  
MILHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Ciências Biológicas – habilitação  
Licenciatura – da Universidade Estadual da  
Paraíba, *Campus I*, em cumprimento das  
exigências para obtenção do grau de  
Licenciado.

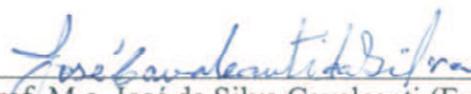
Área de concentração: Fitopatologia.

Aprovada em: 05/12/2018

BANCA EXAMINADORA

  
Profa. Dra. Erica Caldas Silva de Oliveira (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Profa. Dra. Shirley Rangel Germano (Examinadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof. M.e. José da Silva Cavalcanti (Examinador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

*Ao meu amado filho, pelo afeto, carinho e amor*

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu filho Lucas Leonardo Vieira da Silva, por me amar incondicionalmente em todos os momentos, presentes e ausentes, por representar na minha vida a razão pela qual busco constante aperfeiçoamento e também a razão para que eu nunca desista dos meus sonhos. Sou incrivelmente feliz e orgulhoso por ser o seu pai.*

*A professora Érica Caldas Silva de Oliveira por ter me apresentado os fungos e toda sua diversidade ecológica e biotecnológica, pelas suas aulas e pelo comprometimento com seus alunos e toda a dedicação no ensino do componente curricular Micologia/ Biologia de Fungos no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba. Agradeço também por sua orientação neste trabalho, por quando me notar desmotivado por influência de outros docentes, não me permitiu desistir do meu projeto de pesquisa e assim gentilmente me orientou. Sou muito grato!*

*A professora Valeria Veras Ribeiro que acreditou assim como a professora Érica Caldas na minha capacidade acadêmica e me co-orientou gentilmente no decorrer não só deste trabalho como também no projeto de iniciação científica no controle biológico de pragas urbanas.*

*Agradeço muito e sempre irei ser grato as professoras Valeria Veras Ribeiro, Érica Caldas Silva de Oliveira e Shirley Rangel Germano pela criação do Laboratório de Micologia (MICOLAB-UEPB) e a todas outras contribuições dadas para esta ciência que muitas vezes sofre preconceitos e é mal interpretada. A micologia obteve uma grande contribuição com os seus esforços.*

*Ao meu grande mestre José da Silva Cavalcanti por ter me adotado como filho tanto na vida acadêmica como pessoal, pelos ensinamentos cheios de sabedoria que muitas das vezes ao decorrer do meu curso de graduação me orientaram e confortaram. Serei seu filho adotivo e com muita honra.*

*Ao Professor Dr. Francisco de Ramos Brito pelo apoio e incentivo dado aos meus estudos na biologia de fungos e aos conhecimentos sobre toda a natureza e o direito ambiental e por toda confiança dedicada, sei que o senhor é mais que um professor pra mim é um grande amigo de valor inestimável.*

*A professora Cibele Flávia Farias por me mostrar o melhor caminho para ser um bom professor onde antes de tudo se propõe a educação por meio da defesa dos princípios éticos entre humanos e seres vivos, por todas as aulas de estagio em que aprendi que ser professor é bem mais que dar aulas... é transformar vidas.*

*Ao laboratório de Botânica da Universidade Estadual da Paraíba (LABOT-UEPB) representado pela Profa. Shirley Rangel Germano, grande contribuinte do meu avanço na formação acadêmica juntamente com o professor Dr. Joan Bruno Silva que por meio de atividades de monitoria e iniciação científica ampliaram minha visão científica. Agradeço também aos técnicos de laboratório: Augusto (Departamento de Farmácia) por ter me ensinado como preparar meios de cultura para micro-organismos e acreditado no meu projeto de pesquisa; Robson e Macelly (Ambos do Departamento de Biologia) por terem me auxiliado nas atividades práticas laboratoriais durante meus experimentos científicos.*

*Agradeço aos meus amigos e irmãos acadêmicos Éden Havilla e Arielson Gomes, que Deus possa recompensá-los pelo companheirismo e confiança que me foram ofertadas nos momentos difíceis pessoais e financeiros.*

*A minha família por representar os meus sonhos de transformações, a minha mãe pelo comprometimento em criar todos seus oito filhos com garra de coragem sacrificando grande parte da sua vida, por nunca ter nos abandonado quando as situações eram adversas e beiravam a morte. Aos meus irmãos por serem sempre solícitos e me ajudarem quando precisei de apoio no decorrer da minha vida.*

*A todos os funcionários da limpeza e segurança do CCBS - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, em especial a Dona Silvia que sempre me auxiliou em busca as chaves das salas e também sempre me oferecia café gentilmente.*

*A Laércio da xerox por me ajudar sempre quando precisei tirar xerox mesmo sem condições no momento, além dos conselhos de vida que me deu em nossas conversas diárias por estarmos todos os dias desde o chegar da manhã até o sair da universidade à noite.*

*A secretária Nágila Assis Lucena de Moraes por me atender sempre com presteza e educação, ser proativa e tão competente durante o exercício de seu cargo na secretaria do departamento de biologia e pelos conselhos pessoais que também sempre me indicou. Mais uma grande amiga que a biologia me presenteou.*

*Aos meus amigos e professores do PPGBF-UFPE Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco. Nick Brito, Daniel Barbosa, Thays Oliveira, Amanda e Marília Rodrigues.*

*A todos que contribuíram de forma direta ou indireta e que aqui não foram citados deixo meu grande agradecimento, tenho a plena certeza que não cheguei até aqui por apenas mérito, mas também por todos os amigos que fiz nesta caminhada e me auxiliaram por diversas vezes.*

*Muito Obrigado a Todos.*

## RESUMO

O Carvão-do-Milho é uma doença causada pelo fungo *Ustilago maydis* (DC.) Corda de importância secundária que acomete a cultura do milho. Manifesta-se tardiamente no plantio principalmente nos órgãos reprodutivos, e pode ocorrer em alta severidade quando é praticado o recultivo do grão. A doença tem espalhado-se por diversas regiões do país. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de extratos vegetais para o controle de *Ustilago maydis* *in vitro*. O experimento foi conduzido em ambiente de laboratório onde foram produzidos e testados os extratos vegetais hidroalcoólicos de *Rosmarinus officinalis* L., *Plumeria pudica* Jacq. e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. nas concentrações de 10%, 35%, 50% e 80% com 4 repetições cada sobre inóculos de *U. maydis* (DC.) Corda, para caracterização de suas capacidades atividade antifúngica. O delineamento experimental foi conduzido inteiramente casualizado. Observou-se que os extratos a base de *C. citratus* (1- 10%, 3 – 50% e 4- 80%) se mostraram potenciais para a inibição do desenvolvimento pro-micelial de *U. maydis*, sendo a repetição 4 – 80% o tratamento que apresentou menor desenvolvimento fúngico (1,02 cm). O extrato vegetal de *P. pudica* apresentou capacidade antifúngica significativa em relação à testemunha apenas no tratamento 4 – 80% (1,22 cm). Já *R. officinalis* não apresentou atividade antifúngica significativa em relação ao controle. No experimento *in vitro*, pode-se observar que o extrato de *C. citratus* e *P. pudica* diminuiu o crescimento micelial, o primeiro com maior efetividade. Sendo estes extratos mais indicados para estratégias para o controle do patógeno.

Palavras-chave: Controle *in vitro*, Fitopatógeno, Agricultura.

## ABSTRACT

Corn Smut is a disease of the fungus *Ustilago maydis* (DC.) Corda of secondary importance that affects the corn crop. It occurs late in the planting mainly in the reproductive organs, and can occur in high severity when the recultivo of the grain is practiced. The disease has spread throughout various regions of the country. The objective of this work was to evaluate the effect of plant extracts for the control of *Ustilago maydis* in vitro. The experiment was conducted in a laboratory environment where the hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L., *Plumeria pudica* Jaq. and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. in the combinations of 10%, 35%, 50% and 80% with 4 replicates each on inoculates of *U. maydis* (DC.) Corda, for characterization of their activities of antifungal activity. The experimental design was conducted in a completely randomized design. The base extracts of *C. citratus* (1-10%, 3-50% and 4-80%) were selected for the inhibition of the pro-mycelial development of *U. maydis*, and a 4-80 replicate which has the lowest fungal development (1.02 cm). The vegetal extract of *P. pudica* presented greater antifungal capacity than the control only in the treatment 4 - 80% (1.22 cm). No significant antifungal activities were performed in relation to control. No in vitro experiment, which can be extracted from *C. citratus* and *P. pudica*, decreased mycelial growth, the first with greater effectiveness. These extracts are most suitable for pathogen control strategies.

Key words: *In vitro* control, Phytopathogen, Agriculture.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Tumores em órgão feminino infectado vegetal infectado.....	20
<b>Figura 2</b> – Teliósporos de <i>U. maydis</i> .....	20
<b>Figura 3</b> – Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	22
<b>Figura 4</b> – Micoflora de grãos de milho coletados do reservatório CONAB.....	27
<b>Figura 5</b> – Lâminas Produzidas com esporos para identificação morfológica dos fungos.	27
<b>Figura 6</b> – Correlação linear dos tratamentos.....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Fungos identificados em nível de ordem .....	<b>28</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Análise de Variância dos Tratamentos x Repetições a 5%** de significância.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Teste de Tukey a 5% de significância**. DMS = 0,657.....	<b>29</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DBA:** Batata Dextrose Ágar
- KOH:** Hidróxido de Potássio
- ®:** Marca Registrada
- C° :** Graus Celsius
- CONAB:** Companhia Nacional de Abastecimento
- Ver. :** Versão
- Var. :** Variedade
- ADE:** Agua Destilada
- EVH:** Extrato Vegetal Hidroalcoólico

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1. Geral .....	16
2.2. Específicos.....	16
<b>3- Referencial Teórico.....</b>	<b>17</b>
3.1. Cultivo de <i>Zea mays</i> L. ....	17
3.2. Fungos como Pragas Agrícolas.....	18
3.3 Carvão-do-Milho.....	18
3.3.1 Ciclo de Vida e Biologia do Patógeno.....	20
3.4 Utilização de Extratos Vegetais e seus Princípios Ativos.....	23
<b>4- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Coleta de Material Biológico.....	24
4.1.1 Obtenção de Inóculos de <i>U. maydis</i> (DC.) Corda .....	24
4.1.2 Coleta de Folhas das Espécies Vegetais.....	24
4.2 Preparo dos Extratos Vegetais.....	24
4.3 Acompanhamento e Avaliação.....	25
4.4 Avaliação da Microbiota em Grãos de Milho.....	25
4.5 Análises Estatísticas.....	25
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a fome é o maior problema de ordem social enfrentado pelos países subdesenvolvidos, e este problema tende a se agravar no avanço dos anos em função do crescente aumento populacional (FAO, 1996). Logo, se faz necessário o estudo de meios de cultivo mais eficientes, para o controle de pragas agrícolas que ameaçam a quantidade e qualidade dos alimentos produzidos, e que estes contemplem a demanda necessária.

Doenças que acometem as plantas ocorrem desde os primórdios da antiguidade e resultam em malefícios ao ser humano tanto em ordem econômica quanto social (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995). Durante o século XIX pesquisadores como Fraz Unger e Anton de Bary contribuíram para a formação da ciência que se debruça a estudar tais doenças com o intuito de descrever a sua sintomatologia, etiologia e possíveis patógenos responsáveis, culminando iniciando assim os estudos da fitopatologia (GALLI; CARVALHO, 1968). Por meio desta ciência, que engloba diversas outras áreas, os cientistas produzem e organizam conhecimentos sobre patologias vegetais, estas podem ser ocasionadas por outros seres em atuação conjunta com a influência do meio.

As culturas de cereais anualmente são atacadas por diversos patógenos de diferentes tipos como insetos, fungos, nematoides, vírus e bactérias segundo (RESENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Atualmente busca-se o controle sobre o avanço dessas doenças, e a disseminação desses conhecimentos para os produtores rurais são fundamentais para o combate adequado e preservação do solo, maximizando a produção atual e agricultura sustentável (GUANZIROLI; BUAINAIN, 2012).

No Brasil a Fitopatologia não possui um histórico plenamente definido segundo Galli; Carvalho (1978). Em estudos no campo da fitopatologia iniciou com pesquisadores estrangeiros, alemães, belgas, franceses e italianos. Costa (1975) citou a pesquisa de Arsène Puthemans como primeiro relato da fitopatologia, em que foi analisada a ocorrência de uma bacteriose em cultura de cana-de-açúcar no estado da Bahia em 1869.

Com os avanços de estudos na área da fitopatologia doenças até então desconhecidas, quanto a sua etiologia, hoje possuem a correta descrição do patógeno, responsável pela presença de sintomas visíveis nos tecidos vegetais, sendo os fungos os principais agentes etiológicos de patologias nas plantas, ocasionando inúmeros prejuízos, notadamente em monocultivos agrícolas de milho (EMBRAPA, 2006) e feijão (EMBRAPA, 2018).

Culturas agrícolas do milho e feijão possuem grande importância histórica, social e econômica para a região nordeste do Brasil (CASTRO, 2012), muitas residentes na região

rural utilizam-se da agricultura como única forma de subsistência no interior dos estados da região nordeste, sendo este grupo de produtores dos grãos o mais afetado quando há incidência de doenças como a do Carvão-do-Milho que atacam a lavoura e se proliferam diminuindo consideravelmente a produção anual, impedindo o recultivo (EMBRAPA, 2016).

Os prejuízos são significativos e afetam a maioria das pessoas que dependem única e exclusivamente do monocultivo de cereais como o milho e o feijão. Estes grãos estão presentes em grande parte da área plantada do nordeste brasileiro e constituem juntos grande importância econômica, sendo afetados também por períodos de estiagem (SUZANE, 2018).

O presente estudo visa formular um fungicida natural à base do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plumeria pudica*, *Rosmarinus officinalis* e *Cybnopogon citratus* determinando sua potencialidade como alternativa viável ao tratamento de frutos de milho inoculados por esporos de *Ustilago maydis*. A proposta se faz necessária pelas constantes e problemáticas perdas no cultivo de milho parte da agricultura familiar, acarretando prejuízos consideráveis a pequenos produtores na região do agreste paraibano e no nordeste brasileiro como um todo, que se utilizam do cultivo do grão para sua alimentação e/ou venda.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a ação inibitória de extratos vegetais hidroalcoolicos sobre inóculos de *Ustilago maydis* (DC.) Corda.

### 2.2 Objetivos Específicos

Produzir o Extrato Hidroalcoólico Vegetal (EHV) das espécies vegetais *Plumeria pudica* Jacq., *Rosmarinus officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. nas concentrações 10%; 35%; 50%; e 80%.

Avaliar o crescimento micelial inicial do patógeno em meio de cultura DBA.

Determinar quais extratos hidroalcoólicos são eficientes para a inibição da germinação e controle micelial dos inóculos de *U. maydis*.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Cultivo de *Z. mays* L.

O milho (*Zea mays* L.) é um dos representantes da família Poaceae, um dos principais cereais cultivados no mundo, com produção mundial de 778,8 milhões de toneladas entre os anos de 2007 a 2011 (DEMARCHI, 2011). No Brasil, onde o milho é produzido em diversas regiões, sua produção no mesmo período foi de 281 milhões de toneladas (DEMARCHI, 2011).

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de milho Gama et. al., (2015), a área cultivada com essa cultura foi de 15,1 milhões de ha, na safra 2011/2012, (Conab 2012). A importância da cultura do milho no cenário agrícola vem aumentando nos últimos anos pela sua viabilidade econômica e por representar o mais expressivo cereal, a cultura do milho obteve aumento de 4,2 toneladas, a na safra 2012/2013 (CONAB, 2013).

Muito utilizado para alimentação animal, o milho possui grande diversidade em seu uso, participando de cerca de 160 produtos diferentes para diversos fins (MIRANDA et al., 2012), caracterizando assim sua grande importância econômica e social. O rendimento do milho pode ser influenciado por diversos fatores como a disponibilidade hídrica, a fertilidade do solo, a população de plantas, o sistema de cultivo, o potencial produtivo do híbrido, o manejo de plantas daninhas, as pragas e também as doenças.

Ressalta-se que um dos principais desafios para o desenvolvimento deste setor é a disseminação de diversos patógenos que infectam a cultura (KUHLEN et al., 2005). A expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), a adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis, têm promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento, a cada safra, de novos problemas para a cultura do milho, relacionados à ocorrência de doenças (COSTA et al., 2009, 2010).

A cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem afetar a produção, a qualidade, a palatabilidade e o valor nutritivo dos grãos e da forragem; dentre as doenças que ocorrem na cultura do milho, merecem destaque, pela sua importância: doenças foliares, podridões do colmo e das raízes; doenças causadas por bactérias e por vírus; doenças causadas por nematoides e fungos (EMBRAPA, 2010).

A distribuição destes fungos no Brasil varia em função da região e também da época em que o milho é cultivado; regiões mais altas e frias favorecem algumas doenças enquanto regiões baixas e quentes beneficiam outros grupos de fungos (COSTA et al., 2009). Para ocorrer uma doença, é necessário que estejam presentes, ao mesmo tempo, três condições: presença do patógeno que causa a doença, plantas suscetíveis ao patógeno e ambiente favorável ao desenvolvimento da doença (FANTIN; DUARTE, 2008). Considerando que a patogenicidade é devida ao crescimento de estruturas infectivas (esporos e micélio) sobre o hospedeiro (milho) o presente estudo busca testar extratos vegetais para o possível controle *in vitro* do desenvolvimento micelial de *U. maydis*.

### 3.2 Fungos como Pragas Agrícolas

Os fungos desempenham na natureza diversas funções ecológicas que vão desde a sua participação na cadeia decompositora de detritos nos ecossistemas marinhos e terrestres, até o controle de populações de outros seres vivos por meio do controle biológico (ALEXOPOULOS, 1996). Dentre os papéis ecológicos os fungos estabelecem também relações parasitárias em um amplo espectro de hospedeiros, como exemplo, temos grupos de fungos especializados em parasitar seres do reino vegetal, denominando-se fungos fitopatógenos (WEBSTER; WEBER 2007).

As relações estabelecidas comumente ocasionam perdas significativas ou não, a depender da severidade da doença desenvolvida no tecido de hospedeiros, condições climáticas e a capacidade infectiva do parasita. Os fungos fitopatógenos correspondem ao grupo de fungos capazes de penetrar em injúrias no tecido de hospedeiros ou provocar agravos sob tais tecidos, sendo lesões morfológicas gerais e específicas a tecidos vegetais e em seus frutos (AGRIOS, 1988).

### 3.3 O Carvão-do-Milho

Dentre as doenças fúngicas que acometem as lavouras de milho pode-se destacar o carvão comum do milho. O agente etiológico é o fungo *Ustilago maydis* DC. Cda. um fungo pertencente ao Reino fungi, Filo *Dicariomycota* e Subfilo *Ustilaginomycotina* Gênero *Ustilago* sp. segundo taxonomia filogenética (HIBBETT et al., 2007). A doença causada pelo fungo é amplamente dispersa no mundo, havendo registro de ocorrência em diversos países como África do Sul, Uruguai, Argentina, Espanha, Austrália, Bolívia, China, Grécia, Estados Unidos, Jamaica, México, Portugal, Porto Rico, Rússia e Venezuela (FARR; ROSSMAN, 2015). Já no México o carvão do milho é conhecido como Huitlacoche, produzido em lavoura para ser isolado e utilizado como condimento na culinária, temperando os tacos, comida tradicional da gastronomia mexicana (VILLANUEVA, 1995).

No Brasil, o carvão-do-milho é considerado uma doença de importância secundária, mas ocorre em todas as áreas onde o milho é produzido (AGROFIT, 2015). O carvão é diferente de todas as demais doenças do milho, pois as espigas infectadas não produzem grãos e são perdidas; No lugar dos grãos podem ser vistas as estruturas do fungo *U. maydis* que formam uma massa negra pulverulenta, por isso o nome carvão (EMBRAPA, 2016). No

entanto, nas últimas safras, a presença de espigas com carvão parece ter tido um leve aumento (EMBRAPA, 2016).

Alternativas que visem à diminuição da contaminação do solo, a produção e aplicação de um extrato vegetal feito a partir de tecidos vegetais de plantas, que possuam na sua composição química substâncias antifúngicas, que não comprometam a saúde vegetal e consequentemente humana é um dos objetivos a serem alcançados mediante os estudos já divulgados na comunidade científica (ARAÚJO, 2009).

Em 2013, a doença foi relatada em Itatira, no Ceará, como preocupante pelos produtores da região, que não a conheciam, e estavam descartando as espigas contaminadas (GOMES, 2013). Na ocasião, diversas reportagens foram realizadas sobre a doença nos meios de comunicação, que relataram a incidência de carvão em pelo menos onze comunidades do local.

Na Paraíba a doença foi confirmada no sertão do estado, na cidade de Bom Jesus-PB na região de entorno ao município de Cajazeiras-PB, segundo a notícia divulgada pelo jornal Diário do Sertão em 2017. Na entrevista feita pela repórter do jornal local, foi relatado o caso da doença que acometeu espigas de milho produzidas pela plantação do Agricultor José Pedro da Silva, 71 anos, morador da localidade e produtor do grão, segundo o mesmo, caso semelhante já foi registrado no ano de 1990 na cidade por outro agricultor. Suspeita-se que os esporos, desde então, venham se propagando naquela região em virtude das condições climáticas favoráveis (DIÁRIO DO SERTÃO, 2016).

Apesar de ser caracterizada como uma doença de importância secundária na cultura do milho (AGROFIT, 2015), esta doença é extremamente prejudicial para os pequenos produtores, que possuem, nesta cultura a base de sua economia familiar (EMBRAPA, 2011).

Os sintomas do carvão são facilmente visualizados por causa da formação de galhas nas espigas, podendo ocorrer em toda a espiga ou apenas parte dela, na bainha e nervura foliar (FERNANDES et al., 2004). Dentro destas galhas, são produzidos teliósporos escuros, formando uma massa pulverulenta negra, o que dá o nome da doença. O tamanho das galhas varia de 1 a mais de 30 cm de diâmetro e sua localização depende da fase da planta no momento da infecção (PATAKY; SNETSELAAR, 2006). A massa de esporos (teliósporos) escuros que gera as galhas faz com que os tecidos da membrana dos grãos se rompam, liberando os esporos (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; AGROFIT, 2015). O controle da doença deve ser baseado nas boas práticas agrícolas, evitando-se o estresse hídrico e altas doses de nitrogênio no solo, a retirada das plantas contaminadas também é recomendável, pois

é fonte de inóculo. A resistência genética é uma recomendação, porém é pouco conhecida nos cultivares comerciais (EMBRAPA, 2016). O bom empalhamento, rotação de culturas, redução de injúrias e de lagartas nas espigas também são recomendados para a redução da doença (AGROFIT, 2015; PEREIRA et al., 2005).

Infelizmente, nem todas as alternativas para o controle da doença podem ser realizadas pelos produtores de pequenas lavouras da Paraíba, o estresse hídrico, e a grande quantidade de nitrogênio no solo, por exemplo, são fatores que dificilmente podem ser controlados pelos agricultores, aliado à inexistência de produtos de origem química ou natural para o controle desta doença.

### 3.3.1 *Ciclo de Vida e Biologia do Patógeno*

O ciclo inicia-se com o rompimento dos tumores fúngicos formados (galhas) e liberação de esporos diplóides (Figura 2) no ambiente, advindo do parasitismo em outros hospedeiros (Figura 1).

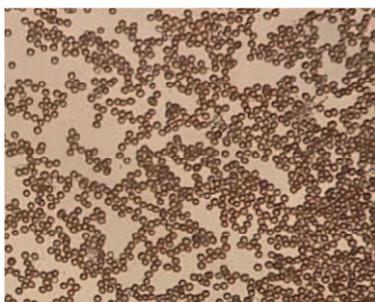
Figura 1-Tumores em órgão feminino vegetal infectado



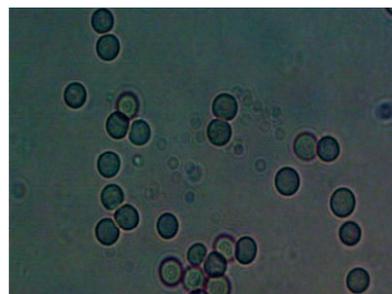
SILVA, L.F. 2017

O Fungo fitopatológico *U. maydis* possui ciclo de vida biotrófico e este se desenvolve duas fases no solo e nos tecidos do hospedeiro (PEREIRA et al., 2005).

Figura - 2 Teliósporos de *U. maydis*. A) aumento de 40x e B) 100x com auxílio de Câmera modelo MU 900 AM SCOPE®. (SILVA, L.F). 2017



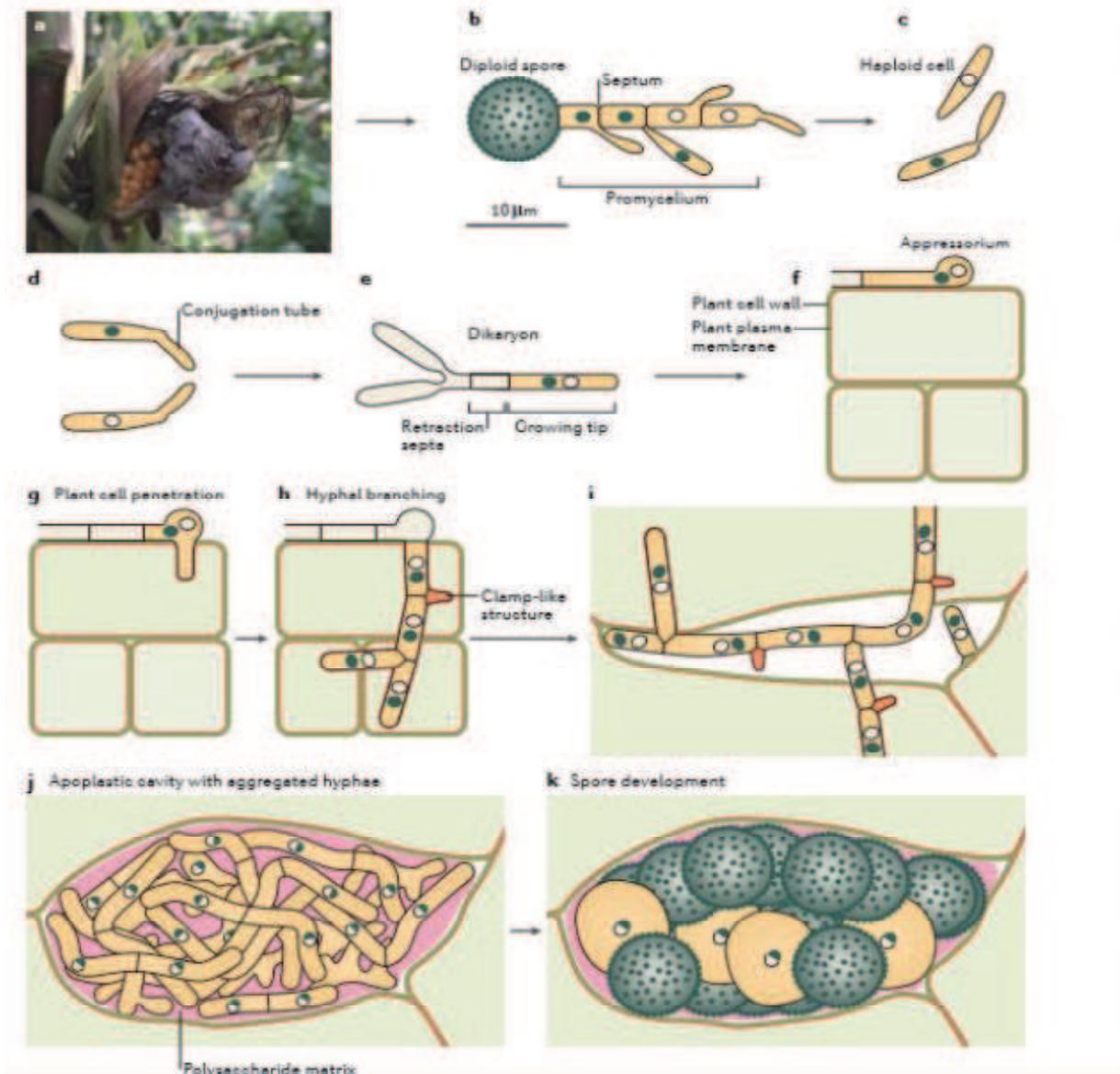
A



B

Estes esporos chegam até o solo se alongam (esporídeos) e passam por meiose produzindo quatro núcleos haploides que são transferidos para um pró-micélio septado contendo que portará um núcleo em cada compartimento (fase haplóide). Este pró-micélio segmenta-se formando cada compartimento esporídeos que no solo projetam um tubo de germinação quando próximo a outras projeções geneticamente compatíveis, após a plasmogamia destas células é formado um pró-micélio desta vez com dicariótico, este pró-micélio desenvolve-se e passa a alocar vacúolos em um lado da extremidade formando uma zona de restrição que passa a aumentar o desenvolvimento apical da hifa, no ápice há uma diferenciação que culmina na formação de um apressório, este ao entrar em contato com a parede celular do hospedeiro secreta substâncias (Antocianinas) patogênicas. Estas substâncias iniciam o processo de infestação alterando respostas imunitárias da espécie vegetal fazendo com que o patógeno ultrapasse a parede celular e entre em contato com a membrana celular do hospedeiro e também se ramifique para o espaço intracelular (Figura 3).

Figura- 3 Ciclo de vida *Ustilago maydis* (CANDOLLE) CORDA



As hifas do patógeno ficam completamente encapsuladas pela membrana do hospedeiro. Durante o início do alojamento no tecido hospedeiro é retomado o ciclo de divisão celular produzindo hifas dicarióticas com haústórios presentes em regiões septadas, estas estruturas possuem a função de permitir o prolongamento da infecção, as hifas ao se

multiplicarem e aumentarem o espaço intracelular constituindo neste uma matriz de nutrientes (Polissacarídeos) que servem como fonte energética. O próximo evento celular, a cariogamia dos núcleos presentes nas hifas. Os núcleos ao possuírem carga genética diploide são separados na junção dos septos celulares e diferenciam-se em esporos diploides enegrecidos. Estes esporos são liberados ao rompimento do tecido vegetal reiniciando o ciclo (Figura 3) (LANVER, et.al., 2017)

### **3.4 Utilização de extratos vegetais e seus princípios ativos**

A utilização de produtos com atividade antifúngica, a partir de plantas, é intensiva devido à crescente resistência destes organismos fitopatogênicos frente aos produtos sintéticos. Outra problemática é o uso destes pesticidas ao decorrer de anos, pois podem causar impactos negativos para todos os seres vivos e para o meio ambiente, devido à poluição causada pelos resíduos químicos no solo. Frente a esse problema, estratégias visando o emprego de novas tecnologias na agricultura moderna, têm sido desenvolvidas por meio do uso de extratos vegetais ou óleos essenciais provenientes de plantas, para o controle de doenças e pragas, que visem causar menos danos ao ambiente e a saúde humana (AMARAL; BARA, 2005). As plantas medicinais possuem princípios ativos que são responsáveis pelas ações terapêuticas, desencadeando diversas reações nos vegetais, animais e nos seres humanos (PEGLOW; VELOSO, 2002). Muitos extratos de plantas medicinais têm sido testados no controle de doenças em plantas com efeito significativo sobre fitopatógenos (RIBEIRO; BEDENDO, 1999) apresentando-se assim como uma estratégia promissora para o controle ecológico destas moléstias.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de Material Biológico

#### 4.1.1 Coleta de Inóculos de *U. maydis*

Espigas de milho infectadas, com tumores fúngicos, caracterizando a infecção do fungo *U. maydis*, foram coletadas no distrito de Galante, mais especificamente, na zona rural, coordenadas (7°18'25.7"S 35°47'56.9"W) na época do início de inverno de 2018, entre os meses de junho e julho, nas lavouras dos pequenos agricultores que produzem o grão anualmente. Estas espigas foram levadas ao laboratório de Micologia da Universidade Estadual da Paraíba (MICOLAB) onde se procedeu a identificação microscópica por meio da produção de lâminas em exame direto com KOH (Hidróxido de Potássio) e posterior visualização dos esporos em microscopia ótica, para o registro das imagens e medição das dimensões dos esporos, foi utilizada a Câmera digital acoplada modelo MU 900 AM SCOPE® Ver. *software* 3.7.

As características observadas foram comparadas as chaves de identificação presentes em sites especializados em taxonomia MicoExpert.com e Mycokays. Os esporos foram isolados e mantidos em ADE em um período de 15 dias antes de sua utilização com auxílio de agitador magnético.

#### 4.1.2 Coleta do Material Botânico

Folhas de espécimes de *P. pudica* Jacq. em estágio de desenvolvimento médio foram coletadas no distrito de Galante durante no mês de fevereiro de 2018. As folhas de *R. officinalis* e *C. citratus* foram oriundas da cidade de Itatuba-PB e adquiridas do comércio de ervas da feira central da cidade de Campina Grande.

### 4.3 Preparo do Extrato Hidroalcoólico

Todas as folhas foram desinfecionadas com solução de cloreto de sódio [1%] no laboratório de Botânica (LABot) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e o Extrato hidroalcoólico vegetal foi preparado por exaustão em extração a frio com agitação manual durante 72 horas no laboratório de Fitoquímica do departamento de farmácia, seguindo-se os

métodos tradicionais segundo a Farmacopéia Brasileira (2010). Posteriormente os extratos foram filtrados em papel filtro e acondicionados em frascos de penicilina de 30 ml, colocados em estufa térmica a uma temperatura de 50°C para eliminação do teor alcoólico por 24 horas, após este período foram mantidos em temperatura ambiente seguindo metodologia descrita (BELISÁRIO et. al., 2009).

#### 4.3 Acompanhamento e Avaliação

Após o preparo de concentração de esporos a seco seguindo metodologia descrita em (ALVES; FARIA, 2010) as placas de Petri foram inoculadas com 0,2 ml de uma suspensão de *U. maydis* ( $1,3 \times 10^{-5}$  conídios/ml) e receberam discos de papel filtro previamente esterilizados umedecidos com 2 ml dos extratos hidroalcoólicos nas diferentes concentrações (10%; 35%; 50%; 80%) de *P. pudica* (Buquê-de-noiva), *R. officinalis* (Alecrim), e *C. citratus* (Capim-santo) logo após foram acondicionadas em estufa microbiológica em temperatura de 27°C com variação de  $\pm 2^\circ\text{C}$ . As avaliações foram feitas após 48 horas para verificação do crescimento micelial escolhendo 4 placas aleatoriamente sendo 1 de cada tratamento e controle, a segunda avaliação foi realizada após 7 dias, medido ao final o crescimento micelial total apresentado.

#### 4.4 Avaliação da Micobiota Presente em Grãos de Milho

As placas de Petri umedecidas e postas em incubação apresentaram crescimento micelial após 48h. Após o período de tempo de 7 dias todos os grãos de milho possuíam estruturas reprodutivas aéreas de fungos. Com auxílio de um pincel e KOH esporos foram visualizados e lâminas preparadas dos fungos. Estes foram utilizados para identificação por meio da análise de sua morfologia utilizando chaves de identificação presentes em sites especializados na identificação de fungos.

#### 4.5 Análise Estatística

As médias de crescimento micelial foram obtidas e processadas pelo *Software* J IMAGE. Em seguida a análise estatística dos dados foi realizada por meio do uso do *Software* PAST com um teste de Correlação Linear Simples ( $y=a+bx$ ) para cada tratamento e ANOVA (Análise de Variância) seguida de comparação de médias pelo teste de TUKEY.

## 5 RESULTADOS E DISSCUSÃO

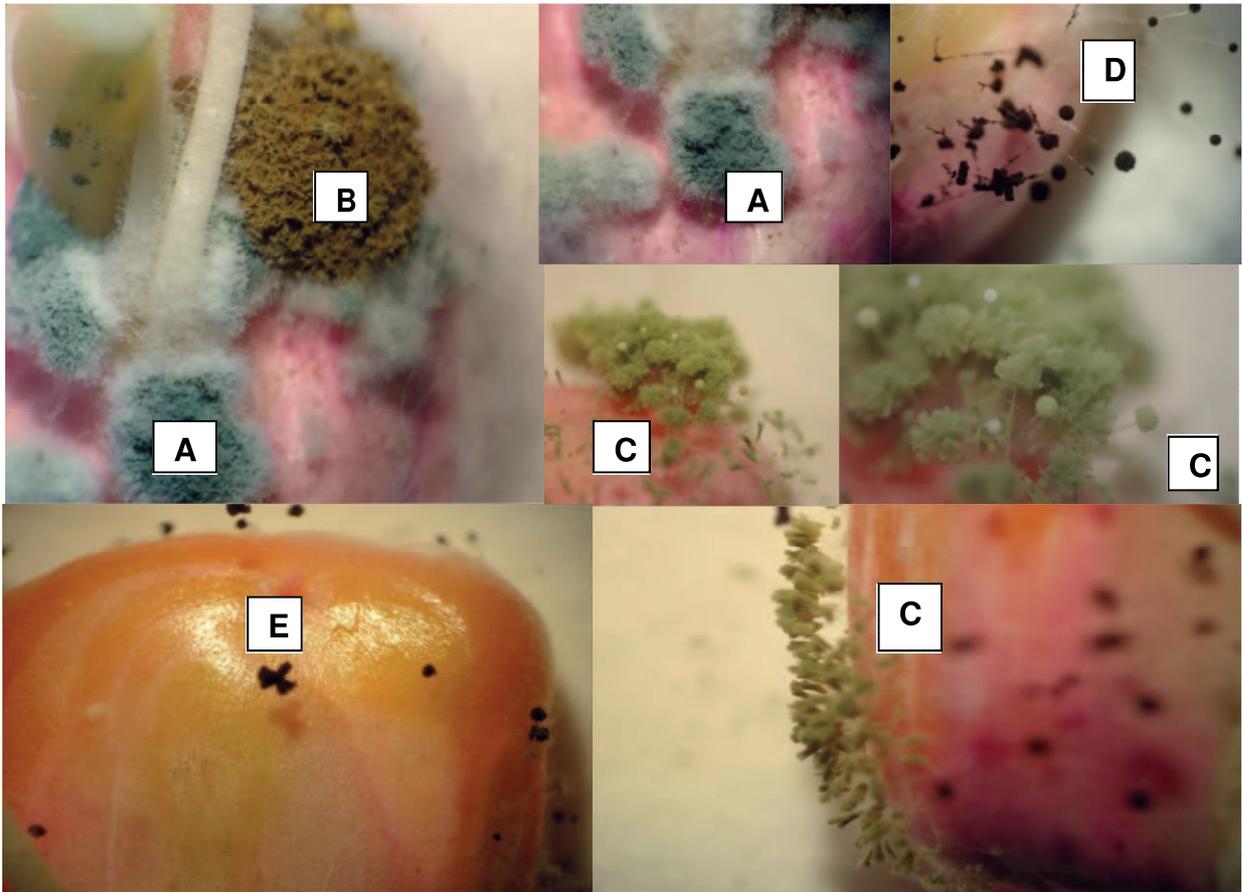
### 5.1 Análise de Micobiota

Foram observadas as presenças de fungos fitopatógenos e entomopatógenos entre os grãos de milho, utilizados no experimento, assim com o fungo tratado no projeto de pesquisa em questão *U. maydis*, sendo este timidamente presente com menor ocorrência em proporção aos demais (Figura – 4).

Segundo (GOULART, 2004) um dos fatores que influenciam a dispersão de inóculos de fungos fitopatógenos é o transporte de grãos advindos de outros plantios de diversas regiões do país. Em relatos da incidência de *U. maydis* em regiões que anda não possuem casos registrados esta é uma das principais vias de entrada da parasitose segundo (FERREIRA; FERNANDES, 1978).

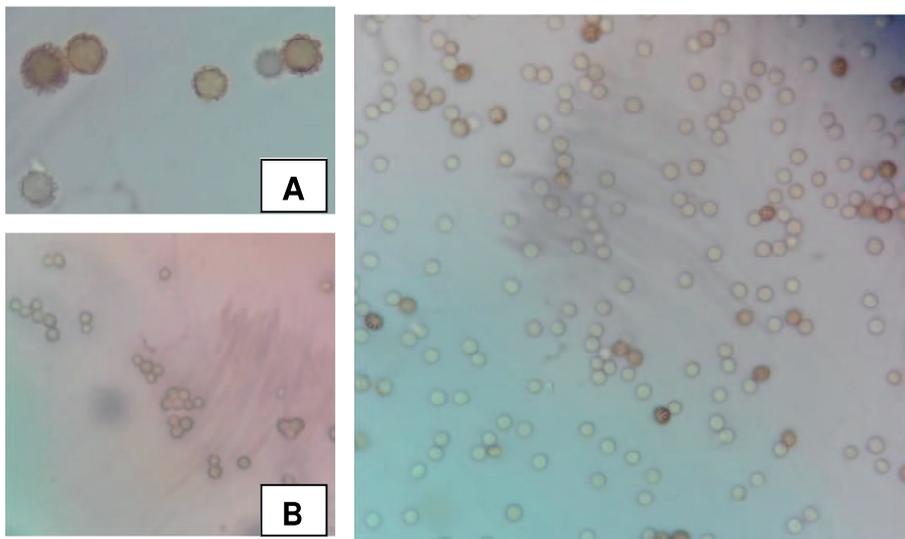
Para efeito de análise e confirmação de espécies fúngicas foram produzidas lâminas a partir das estruturas reprodutivas visíveis sobre os grãos de milho após o experimento feito em laboratório (Figura – 5), e as espécies identificadas mediante chaves taxonômicas disponibilizadas virtualmente foram agrupadas em nível de Ordem na Tabela 3.

Figura – 4. Micobiota de sementes de milho *var.* Potyguar adquiridas do galpão regional de armazenamento de grãos da CONAB agreste localizada na cidade de Esperança – PB.



Micélios Reprodutivos: A – *Metharizium sp.*; B – *Tricoderma sp.*; C – *Aspergillus sp.* D – *Rhizopus sp.*; E – *Penicillium sp.*

Figura – 5. Lâminas Produzidas com esporos para identificação morfológica dos fungos.



Esporos: A – *Thicoderma sp.*; B – *Methazium sp.*; C – *Ustilago sp.*

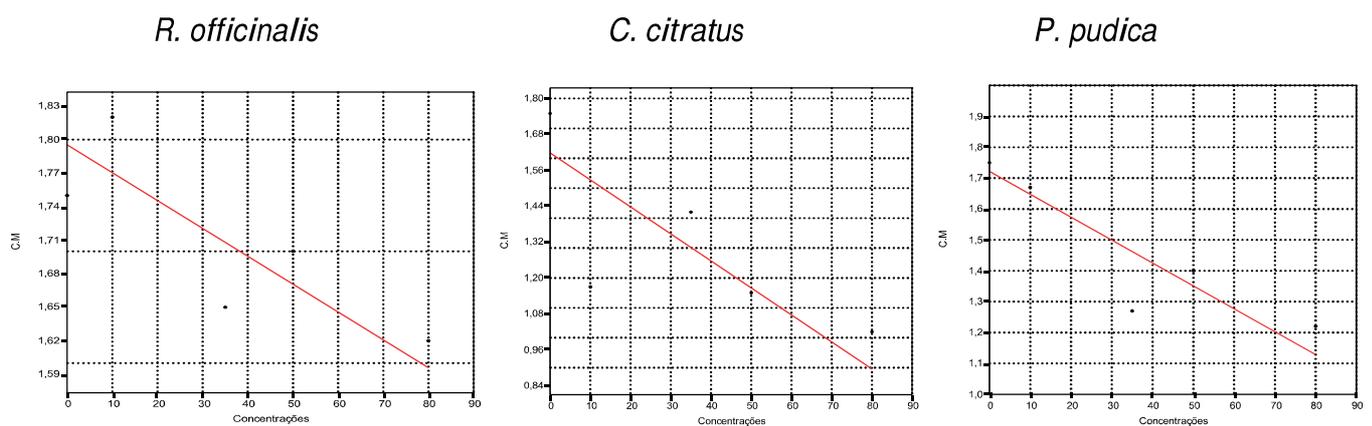
Tabela 1. Fungos identificados em nível de ordem.

Placas de Petri	1	2	3	4
Grãos de Milho	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp. e Fusarium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Metharizium sp.</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Metharizium sp.</i>	-	<i>Thicoderma sp.</i>
	-	<i>Ustilaginales sp.</i>	-	-

## 5.2 Correlação Linear Simples da atividade dos extratos vegetais em suas repetições.

A regressão linear simples demonstrou uma correlação negativa entre o aumento das concentrações dos tratamentos e o desenvolvimento micelial das repetições.

Figura – 6. Correlação linear dos tratamentos.



C.M = Crescimento Micelial; Concentrações (0% – 80%).

### 5.3 ANOVA (Análise de Variância)

A análise de variância demonstrou significância a 5% na atuação dos extratos vegetais mediante suas concentrações sobre o desenvolvimento micelial de *U. maydis*.

Tabela 2- Análise de Variância dos Tratamentos x Repetições a 5%\*\* de significância.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Extratos Vegetais	2,923	2	1,4615	13,98565	1,89E-05	5,110317897**
Concentrações	1,117666667	4	0,279417	2,673844	0,043886	3,767427082**
Interações	0,505333333	8	0,063167	0,604466	0,769116	2,93534053
Entre grupos	4,7025	45	0,1045			

### 5.4 Teste de TUKEY

O teste de Tukey demonstrou que as médias que obtiveram maior inibição micelial significativa pertenceram aos tratamentos com maior concentração alcoólica, se destacando os extratos vegetais de *C. citratus* (10%, 1,17; 50%, 1,15; 80%, 1,02) e *P. pudica* (80%, 1,22).

Tabela 3- Teste de Tukey a 5% de significância\*\*. DMS = 0,657.

Trat. / Con. (Cm)	Controle (0%)	10%	35%	50%	80%
<i>R. officinalis</i>	2,0ab	1,82ab	1,65ab	1,7ab	1,62ab
<i>P. pudica</i>	1,5ab	1,67ab	1,27ab	1,4ab	<b>1,22bc**</b>
<i>C. citratus</i>	2,0ab	<b>1,17bc**</b>	1,42ab	<b>1,15bc**</b>	<b>1,02bc**</b>

Segundo (SANTOS et al., 2013) a utilização de extratos vegetais é uma importante alternativa para o controle de micro-organismos como fungos e bactérias causadoras de moléstias na agricultura extensiva e familiar. A possibilidade de utilização de compostos naturais para o controle de doenças representa um grande avanço conquistado por pesquisas voltadas aos princípios de defesa do solo e preservação do meio ambiente (PASTRO et al., 2012).

A existência de químicos naturais com efeitos sobre o controle de seres vivos que se comportam como pragas agrícolas abrem novos campos para o controle biológico e inibem

por consequência a utilização de químicos e outros defensivos (RAMOS et al., 2015) Vale ressaltar que existe a lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre a regulamentação e fiscalização do uso de agrotóxicos na agricultura para combater o uso indiscriminado destes (BRASIL, 2018).

Uma problemática muito presente diz respeito à denominação e concentração das principais substâncias que são responsáveis pelo efeito do extrato vegetal sobre os microorganismos, carecendo de estudos e métodos mais específicos para a concreta substância Antimicrobiana (OSTROSKY et al., 2008). Diferentes métodos de extração podem determinar uma melhor qualidade da atuação de extratos vegetais, portanto utilizar outros métodos que possam ser mais eficientes é uma boa estratégia para melhor qualidade de inibição (VEGGI, 2008).

Os extratos vegetais possuem uma grande capacidade de extração para diversas substâncias orgânicas e muitas das vezes estas são em sua maioria polares (ALVES et al., 2010). As diferentes concentrações definem também diferentes gradientes de disposições químicas das moléculas com real poder antibiótico.

Os resultados desta pesquisa corroboram com a eficiência fungistática demonstrada pela ação de *C. citratus* a outros grupos de fungos fitopatógenos como *Monilinia sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, e *Rhizopus sp.*, com eficiência também dependente de dosagem (BIBIANO; SÁBER, 2017) outra forma de utilização para o controle de fungos fitopatógenos é a utilização do óleo essencial que possui comprovada ação até mesmo contra *Fusarium proliferatum* (SOUZA et al., 2007) e *F. oxysporum* (Morais, 2004).

A espécie *P. pudica* obteve atividade antifúngica considerável, porém apenas em uma concentração específica de seu extrato (80%, Ver Tabela – 5), talvez devido a presença de quitinases e proteases entre suas substâncias foliares segundo (SOUZA, 2018). Estudos mostram que plantas da família Apocinaceae possuem atividade bioinseticida comprovada contra insetos em estágio larval e adulto (BELO et al., 2009), porém estudos que comprovam a atividade antifúngica ainda são escassos, a família supracitada possui representantes com capacidade de produção de metabólitos tóxicos mas também de interesse para o desenvolvimento de fármacos segundo (OLIVEIRA, 2000).

Dentre uma amplitude de espécies vegetais que podem atuar como inibidoras do crescimento de patógenos se destacam as espécies de importância medicinal (FILHO; YUNES, 1998), isso reforça a tese que ainda possuímos um desconhecimento sobre as diversas utilizações possíveis destas espécies vegetais para a biotecnologia e outras áreas das

ciências (2001) necessitando de estudos mais aprimorados que determinem sua atividade para o uso na agricultura em plantas cultiváveis de interesse econômico (PEIXINHO et al., 2017).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de extratos vegetais hidroalcoólicos se apresenta como uma alternativa viável a inibição do desenvolvimento micelial de *U. maydis in vitro* após período de 7 dias de inoculação em condições de laboratório, obtendo crescimento micelial inicial considerável após o período de 48h.

Dentre os extratos ressalta-se o de *C. citratus* em uma concentração alcoólica de 10%, 50% e 80%, sendo este mais promissor no controle micelial e controle do patógeno, podendo ser considerada sua atividade antifúngica em estudos futuros o desenvolvimento de possíveis tratamentos de sementes de *Z. mays*.

O extrato vegetal hidroalcoólico de *P. pudica* possui capacidade antifúngica considerável e pode ser empregado para estudos de antibiose em vitro de *U. maydis* inicialmente na concentração de 80% e a posteriori em outras concentrações.

Este estudo contribui para meios alternativos da doença do carvão do milho inicialmente *in vitro* e poderá subsidiar futuras pesquisas que visem o controle biológico desta doença.

## REFERÊNCIAS:

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 50p.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. de L. BAHIA, M. V. AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Jequié – BA: **Química Nova**, v. 33, No. 10, 2202-2210, 2010

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.5-8, 2005.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins**, 2015. Disponível em: < [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> . Acesso em: 14 out. 2016.

ARAÚJO, E. S. Látex de *Plumeria rubra* L. (jasmin): **Perfil protéico, Caracterização enzimática e ação contra insetos**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1988. 803 p.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da Fitopatologia. In BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 3. ed., v.1, cap.1, p. 2-12, 1995.

BELISÁRIO, M. R. ; DERESKI, T. M.; MELLO, R. A. de. Estudo Da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico de *Tagetes Patula* L. **UTP - Curitiba**, 2009.

BIBIANO, H. S.; SÁBER, M. L. Extratos de *Cymbopogon citratus* e *Annona muricata* como inibidores do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 9, n. 2, p. 61-72, abr./jun.2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817.v.9.n.22017978>

CASTRO, C. N. de. A agricultura no nordeste brasileiro: Oportunidades e limitações ao Desenvolvimento. **IPEA**, Rio de Janeiro, novembro de 2012.

COSTA, A. S. História da Fitopatologia no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.1, p.155-163, 1975.

DIÁRIO DO SERTÃO, ANOMALIA: Agricultor da região de Cajazeiras colhe milho estranho e comunidade pede explicação ao Globo Rural. Disponível em <<http://www.diariodosertao.com.br/noticias/sertao/190652/anomalia-agricultor-da->

**regiao-de-cajazeiras-colhe-milho-estranho-e-comunidade-pede-explicacao-ao-globo-rural-video.html**> Acesso: 23. abr. 2016.

EMBRAPA. **Unidade de Apoio, Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária (São Carlos, SP)**. Paulo Estevão Cruvinel. Medidor digital multissensor de temperatura para solos. BR n. PI 8903105-9, 26 jun. 1989, 30 maio 1995.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <[www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/plantio.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/plantio.htm)> , abril de 2010.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção de Milho na Agricultura Familiar. **Circular Técnica 159**, Sete Lagoas, setembro de 2011.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Carvão-comum-do-milho no Brasil: Conheça esta Doença. **Circular Técnica 222**, Sete Lagoas, dezembro de 2016.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases: systematic mycology and microbiology Washington: USDA**, 2015. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 3 nov. 2016.

FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P. Manejo ampliado. **Revista Cultivar Grandes Culturas**. Pelotas. n.108, p.24-27. 2008.

FAO, Cumbre Mundial sobre la Alimentación, 1996. Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, párrafo 1. En: **Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial y Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación; Cumbre Mundial sobre la Alimentación**, 13-17 de noviembre de 1996, Roma (Italia). Roma, p. 43.

FERREIRA, A. da S.; FERNANDES, F. T. **Ocorrência de carvão (Ustilago maydis (DC.) Cda.) em cultivares de milho no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo em 1975**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 1978.

FILHO V.C.; YUNES, R. A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, 21(1). Florianópolis. 1998.

GAMA, E.E.G; MEIRELES, W.F; PARENTONI, S. N; PACHECO, A. P. C; XAVIER, M.; CORREIA, L. A. A Situação Atual da Cultura do Milho no Brasil - Produção e Pesquisa In: **Memórias, de la XVIII Reunión Latinoamericana del Maiz**, Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal – INIAF, 31 de outubro de 2015.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T. de História da Fitopatologia. In: GALLI, F. (coord.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 1º. ed.,v.1, cap.1, p. 9-14, 1978.

GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L Introdução. In: **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 1º. ed., cap.1, p. 2-7, 1968.

- GLOBO, Plantações de milho são atacadas por doença nova no Ceará. **Globo Rural**, 22 ago. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2013/08/plantacoes-de-milho-sao-atacadas-por-doencanova-no-ceara.html>. 22/08/2013 06h29>. Acesso em: 26 nov. 2016.
- GOMES, D. Praga prejudica safra de milho deste ano em Itatira. **Diário do Nordeste**, 7 ago. 2013. Disponível em: <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/regional/praga-prejudica-safra-demilho-deste-ano-em-itatira-1.385278>>. Acesso em: 26 nov. 2016.
- GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 72p.
- GUANZIROLI, C. E.; BUAINAIN, A. M.; DI SABBATO, A. Dez anos de evolução da agricultura familiar no Brasil: (1996 e 2006). **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, v. 50, n. 2, p. 351-370, junho de 2012.
- PEIXINHO, G.S.; SANTOS, C.M.G.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R.; BISPO, J.S.; CARVALHO, V.N.. Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasioidiplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.2, p.155-157, 2017.
- HIBBETT, D.S. et al. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research** 111: 509-547. The british mycological society, march 2007.
- JARDINE, C. Perdas: quando a produção não vai para o saco. **O Brasil Agrícola: A Granja**. Nº 639. Pg. 12 –21. 2002.
- JULIATTI, F. C.; ZUZA, J. L. M. F.; SOUZA, P. P.; POLIZEL, A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 34-41, 2007.
- LANVER, D. et al. The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNAseq analysis. **The Plant Cell**, Jan 2018.
- PEGLOW, K.; VELOSO, C. Por que e como utilizar plantas medicinais. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.3, n.3, p.67-8, 2002.
- MIRANDA, R. A. **Economia na Produção**, Sete Lagoas, 2012.
- MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 161-168, 1997.
- MORAES, M.H.D. Análise sanitária de sementes tratadas. Resumos, **VIII Simposio Brasileiro de Patologia de Sementes**. João Pessoa PB. 2004. p. 12.
- OLIVEIRA, F. de. **Fundamentos de Botânica Farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Record, 2008.
- OLIVEIRA, E. de; FERNANDES, F. T.; CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. de A.; FERREIRA, A. da S. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. In: GALVAO, J.

C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Vicosa: UFV, 2004. Cap. 7, p. 227-267.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo: USP. v. 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PATAKY, J. K.; SNETSELAAR, K. M. **Common smut of corn. The Plant Health Instruction**, 2006. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CornSmut.aspx>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

PASTRO, D.C., PASCUALI, L.C., SANDRI, D.O., ZELA, S.P., SILVA, F.D. Diagnóstico de extratos vegetais com potencial para o controle fúngico. In: **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia: Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14;394 p. 2012.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CARMAGO, L. E. A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

RAMOS, E. P.; SOUZA, W.C.O.; NUNES, M.C.; NASCIMENTO, L.C. Métodos alternativos no manejo da fusariose do abacaxizeiro 'Pérola'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Póscolheita de frutas, flores e hortaliças, 001. Anais**. Aracaju-SE. 2015.

REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. ed., v.1, cap.1, p. 3-17, 2011.

RODRIGUES JUNIOR, C.J. Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogênicos. Lisboa: **Junta de Investigações Científicas do Ultramar**, 1980.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v.56, n.4, p.1267-1, 1999.

SANTOS, P. L. dos et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 2562-2576, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/137597>>.

SILVA, L.M., ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SOUZA, A.E.F., ARAÚJO, E. & NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira** 32: 465-471. 2007.

SOUZA, B. da S. Avaliação Toxicológica das Proteínas do Látex da *Plumeria pudica* em Modelo de Camundongos. **Dissertação (Dissertação em Ciências Biomédicas)** UFPI – Parnaíba, 2018.

SUZANE, C. Seca provoca perdas em lavouras de milho de Sergipe, **Globo Rural**: Carira - SE, 02 de setembro 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/globo-rural/noticia/2018/09/02/seca-provoca-perdas-em-lavouras-de-milho-de-sergipe.ghtml>>

WEBSTER, J.; WEBER, R.; 2007. **Introduction to Fungi** 3th ed. New York: Cambridge Press.

VEGGI, P. C.. Obtenção de Extratos Vegetais por diferentes Metodos de Extração: estudo experimental e simulação dos processos. 2009. 143 p. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254860>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

VILLANUEVA, C. “Huitlacoche” (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. **Micologia Neotropical Aplicada**, v. 10, p. 73-81, 1997.

## APÊNDICE

## ROTEIRO PARA PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

- Lavagem das folhas em solução de hipoclorito de sódio [1%], para desinfecção e retirada de outros fitopatógenos;
- Acomodação das folhas em estufa térmica com circulação a temperatura constante de 70C°;
- Maceração das folhas em Liquidificador de cozinha
- Pesagem em balança de Precisão
- Armazenamento em potes translúcidos
- Homogeneização com concentrações de álcool.
- Filtragem após 72h em ambiente fora do contato com a luz
- Acomodação em frascos de penicilina 30 ml em estufa térmica a 50°C pra volatização do álcool no período de 1 dia.
- Retirada e acondicionamento em temperatura ambiente.

