

Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de andiroba e copaíba e suas diferentes combinações no controle do fungo *Sclerotium rolfsii*

Ruthe Lima de Souza¹, Fabricio Rivelli Mesquita², William Ferreira Alves^{2*}

¹ Discente da Universidade Federal do Acre, Centro Multidisciplinar/Curso de Engenharia Agrônômica, Cruzeiro do Sul, Acre/Brasil, ² Professor da Universidade Federal do Acre, Centro Multidisciplinar/Químicos e da Natureza, Cruzeiro do Sul, Acre/Brasil. *wfa23@yahoo.com.br

Recebido em: 19/11/2018 Aceito em: 20/01/2019 Publicado em: 12/02/2019

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito antifúngico dos óleos essenciais de andiroba e copaíba, 100% massa em gramas do óleo de andiroba, e 100% massa em gramas do óleo de copaíba e mais, as proporções em massa de óleos de andiroba/copaíba, nas proporções (m/m), A10/C90, A20/C80, A50/C50, A80/C20, e A90/C10, sobre o fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 7 x 5, sendo o primeiro fator os dois óleos individuais (Andiroba e Copaíba), e as cinco diferentes combinações. E o segundo as concentrações 25, 50, 75 e 100 µL, para o patógeno *S. rolfsii*, e um controle, com quatro repetições. As concentrações dos óleos foram diluídas em (BDA), vertidos em placas de Petri. Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para as placas, e acondicionado em BOD sob temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 12 horas. Os óleos essenciais de andiroba e copaíba apresentaram potencial significativo de controle para o fungo *S. rolfsii*, e conclui-se que as concentrações que apresentaram melhor potencial de controle contra o fungo, de acordo com as análise de HCA e PCA, foram A10/C90 e A20/C80.

Palavras-chave: Análise multivariada. Controle alternativo. Fitopatógeno.

Evaluation of the antifungal activity of andiroba and copaíba essential oils and their different combinations in fungus control *Sclerotium rolfsii*

ABSTRACT

The objective was to evaluate the antifungal effect of the essential oils of andiroba and Copaíba, 100% mass in grams of Andiroba oil, and 100% mass in grams of the Copaíba oil and more, the mass proportions of andiroba / copaíba oils, in the (m / m), A10 / C90, A20 / C80, A50 / C50, A80 / C20, and A90 / C10, on the phytopathogen *S.rolfsii*. The experiment was carried out in a completely randomized design, in factorial 7 x 5, the first factor being the two individual oils (Andiroba and Copaíba), and different combinations. And the second was the concentrations 25, 50, 75 and 100 µL for the pathogen *S.rolfsii*, with four replicates and one control. The concentrations of the oils were diluted in (BDA), poured into Petri dishes. Mycelial discs with 0.5 cm diameter were transferred to the plates and conditioned in BOD at a temperature of 25 ± 1 ° C and photoperiod of 12 hours. The essential oils of Andiroba and Copaíba presented significant control potential for the fungus *Sclerotium rolfsii*, and at concentrations that presented with better potential of control against the fungus, according to the analysis of HCA and PCA, were A10 / C90 and A20/C80.

Keywords: Multivariate analysis. Alternative control. Fitopatógeno.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o ranking de oitavo maior produtos de tomate do mundo, com cerca de 63 mil hectares cultivados e produção que atinge 3,7 milhões de toneladas por ano (MAKISHIMA, MELO, 2005). Em termos de produção e consumo, ocupa a segunda posição dentre as hortaliças, sendo que a maior parte da colheita se destina ao consumo in natura e o restante é destinado à agroindústria (FILGUEIRA, 2008).

Desde os primórdios, a história da domesticação das plantas pelo homem, é marcada pela presença de fitopatógeno que reduzem a produtividade, desagrega valor ao produto e reduz o tempo de armazenamento (PUNJA, UTKHEDE, 2003). Muitas são as doenças que acometem a cultura do tomate entre elas a podridão de esclerócio causado pelo *Sclerotium rolfsii*. Trata-se de um patógeno de difícil controle, pois apresenta uma vasta gama de hospedeiro além de forma estruturas de resistência os esclerócios com cerca de 1 mm de diâmetro, de cor branca a castanha, que lhe confere a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo em condições adversas, até que ocorra condições favoráveis ao seu desenvolvimento (YAQUB, SHAHZAD, 2008).

No contexto mundial, buscam-se alternativas para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e ecologicamente correta (KIMATI et al., 1997), paralelamente tem se verificado o aparecimento de pesquisas que sugere a utilização de produtos naturais, como substâncias de origem vegetal e agentes biológicos, que apresentem efeito inibitório sobre os fitopatógenos e ao mesmo tempo, não causem danos aos ecossistemas (MORANNDI, BETIOL, 2009).

A diversidade de substâncias ativas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais, no intuito de explorar suas propriedades fungitóxicas (FRANZENER et al., 2007).

Os extratos e óleos essenciais tem se destacado nesse cenário. Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, de baixo peso molecular, geralmente líquidas e odoríferas, constituído por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2002). São substâncias que podem ser produzidas em qualquer órgão da planta (raízes, caules, folhas e frutos), que tem a finalidade de proteger a planta contra agentes externos como microrganismos e insetos (LIMA et al., 2006; SIQUI et al., 2000). A maioria das plantas é resistente aos diferentes patógenos, e essa resistência pode estar relacionada à existência de agentes microbiostáticos como os compostos fungistáticos que são naturalmente produzidos pela planta (SALGADO et al., 2001).

Agentes microbiostáticos tem, em comum, a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos (APPCC, 1999).

O fato é que, a presença de compostos químicos com propriedades antimicrobianas nos tecidos de plantas superiores tem sido verificada em quase todas as plantas, e em vários tecidos (INGHAM, 1973). Nesse contexto o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antifúngico dos óleos essenciais individualizados, 100% massa em gramas do óleo de Andiroba, e 100% massa em gramas do óleo de Copaíba e mais, as proporções em massa de óleos de andiroba/copaíba, nas proporções (g/g), 10/90, 20/80, 50/50, 80/20, e 90/10, sobre o fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* agente etiológico da podridão de esclerócio do tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e obtenção do fitopatógeno

O isolado de *Sclerotium rolfsii* foi obtido de plantas de tomate que apresentavam sintomas de seca e sinais (massa micelial branca) no colo da planta. Para o isolamento o material vegetativo foi levado para o laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Acre – Campus Floresta. Meio de cultura BDA foi preparado e repique da massa micelial do colo foi transferido para placas com o meio de cultura.

Origem dos óleos

Os óleos essenciais de Copaíba e Andiroba foram obtidos através do laboratório de Química do Solo da Universidade Federal do Acre – UFAC. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 7 x 5, sendo o primeiro fator os dois óleos individuais (Andiroba e Copaíba), e diferentes combinações. E o segundo as concentrações 25, 50, 75 e 100 µL, para o patógeno *S. rolfsii*, e um controle, com quatro repetições. As concentrações dos óleos foram diluídas em (BDA), vertidos em placas de Petri. Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para as placas, e acondicionado em BOD sob temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 12 horas (ABREU et al., 2014; BRITO et al., 2017)

Condução do experimento e avaliação estatística

As avaliações foram realizadas mensurando o crescimento micelial, considerando o diâmetro (cm) médio das colônias em dois sentidos perpendiculares.

As avaliações do crescimento micelial, foram realizadas pela medição diária do *S.rolfsii*, a cada 24 horas, mensurando-se o diâmetro em milímetros das colônias a partir do momento em que foram repicados os discos de micélio contendo o isolado até que tratamento controle (BDA) ocupasse 2/3 da placa.

Os dados foram utilizados no cálculo do índice de crescimento micelial (ICM) conforme a fórmula descrita por Salgado et al., (2003):

$$\text{ICM} = \frac{C1}{N1} + \frac{C2}{N2} + \dots + \frac{Cn}{Nn}$$

As variáveis contidas na equação para o cálculo do índice de crescimento micelial (ICM) são as variáveis do crescimento micelial do primeiro até o último dia (C1, C2,...Cn) e o número de dias da avaliação (N1, N2,...Nn).

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), proposta por Garcia et al. (2012), onde o diâmetro da testemunha (DT), e o diâmetro do tratamento (DTRAT), são as variáveis envolvidas.

$$\text{PIC} = \frac{DT - DTRAT}{DT} \times 100$$

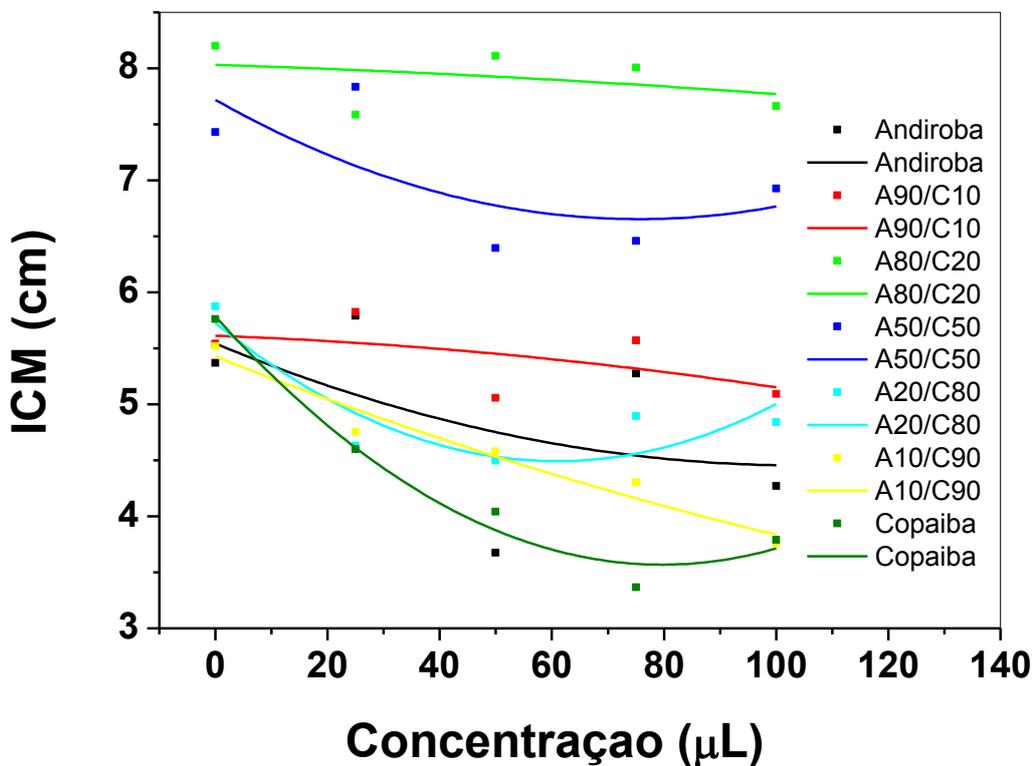
Os dados foram submetidos á análise de variância e posteriormente comparados pelo teste de teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para o tratamento estatístico multivariado dos resultados foram utilizados a técnica quimiométrica técnica de análise de agrupamento hierárquico (HCA), sendo processados com o auxílio do programa *Pirouette, versão 4.5, informetrix, Inc EUA*. Para a análise da HCA, construiu-se uma matriz de dados (7 x 5), em que as concentrações em linhas e as variáveis ICM em colunas. Todos os dados foram auto escalados, isto permite melhor visualização dimensional das 7 amostras de óleos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise do crescimento micelial do óleo de copaíba, óleo andiroba e das diferentes concentrações da mistura de Copaíba e Andiroba estão apresentados na figura 1.

Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações das misturas de óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e Andiroba (*Carapa guianensis*) e, dos óleos não misturados de Copaíba e Andiroba sobre o índice de crescimento micelial (ICM) do *S.rolfsii*, em meio BDA



Fonte: Fonte do próprio autor

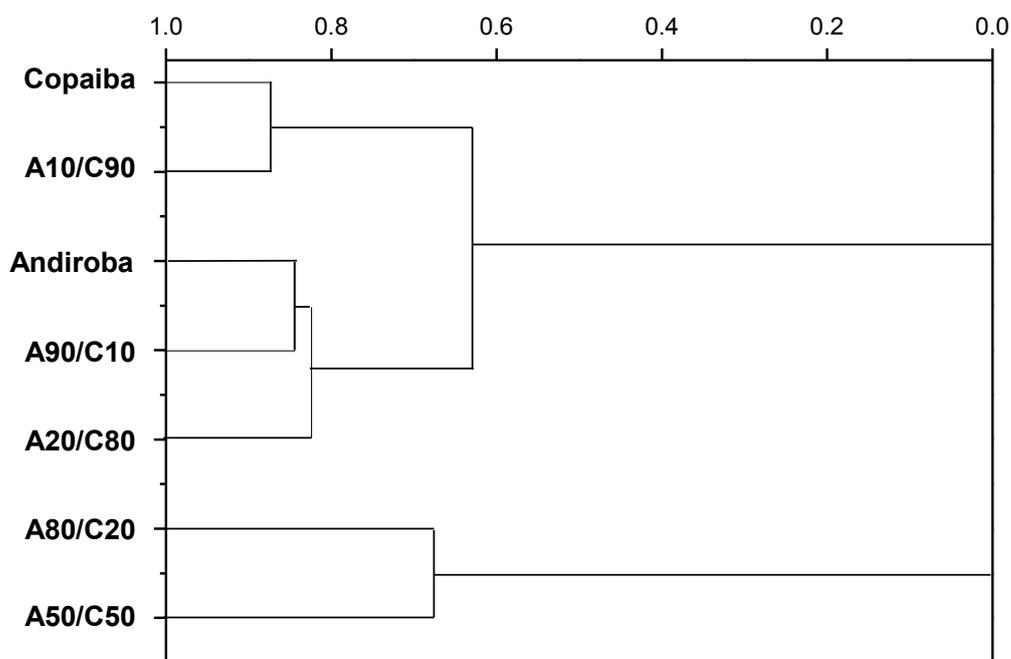
Ao avaliar o crescimento micelial do *Sclerotium rolfsii* observou-se uma redução significativa conforme se aumentou a concentração do óleo de copaíba, indicando sua ação fungistática, Figura 1. A concentração 75 µL inibiu 41,56% do crescimento de *S. rolfsii* quando comparado a tratamento BDA puro. Diniz et al., (2008) observando a ação do óleo essencial de *Mentha arvensis* sob *Sclerotinia sp*, destacaram que 10 µL do óleo inibiu totalmente o desenvolvimento de *Sclerotinia sp*. O efeito fungistático do óleo de copaíba está relacionado à presença de substâncias como diterpenos e sesquiterpenos, cujas principais substâncias responsáveis pela inibição de fungos são o β-cariofileno e seus óxidos derivados. Da mesma maneira Tagami et al., (2009) observaram redução de até 49% do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* sob o extrato bruto aquoso de *L. alba* (erva-cidreira). Na figura 1 o óleo de andiroba possui propriedades fungistáticas uma vez que, a concentração 50 µL inibiu 31,56% do crescimento micelial do *S.rolfsii*. Em um trabalho realizado por Souza et al., (2012) os óleos de andiroba, coco e eucalipto apresentaram capacidade de inibir o crescimento do fungo a medida que sua concentração foi aumentada, diferindo da testemunha a partir da

concentração de 1,0 %. Tal fato sugere que o aumento da concentração dos outros óleos pode vir a causar um efeito inibitório no crescimento do fungo.

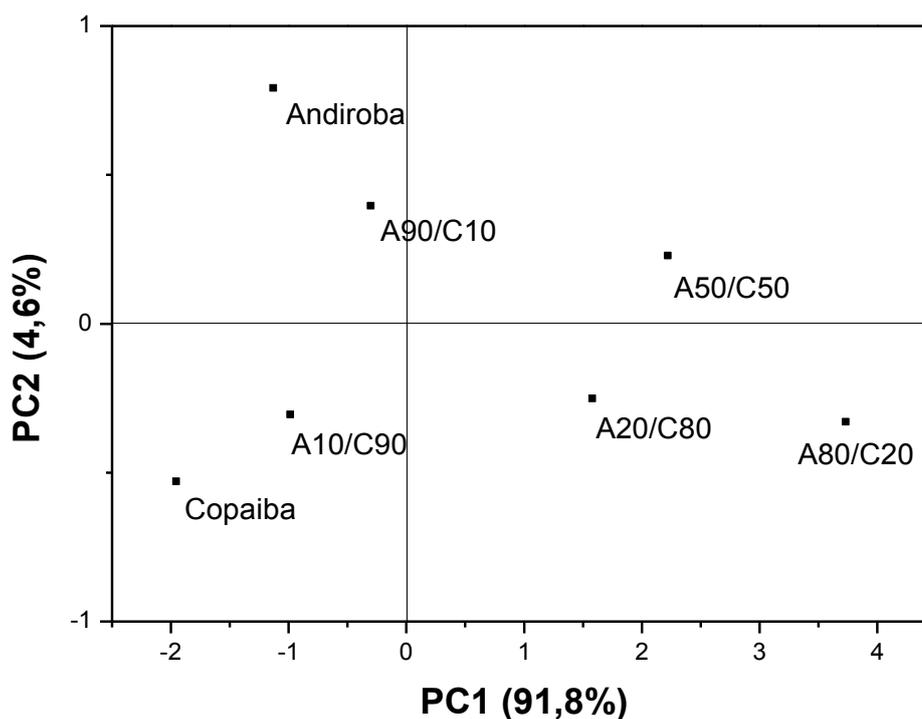
Estudos realizados por Packer e Luz (2007), com óleos essenciais de melaleuca andiroba, copaíba alecrim e alho sobre o *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstraram que os óleos essenciais de melaleuca e alecrim obtiveram maior ação fúngica.

Nas análises de crescimento micelial das misturas dos de copaíba e andiroba (m/m), observou-se que a combinação entre os óleos essenciais de andiroba e copaíba A10/C90 promoveu uma retardação do crescimento micelial do *S. rolfsii*. A concentração 100 μ L A10/C90 inibiu o crescimento micelial do patógeno em 31,91%. Este resultado também pode ser observado, pela análise estatísticas multivariada. Na Figura 2 (a), os resultados de HCA demonstram que a mistura de A10/C90 possui similaridade com o óleo de copaíba, ou seja, as distâncias entre os óleos são próximas, indicando que possuem ações antifúngicas semelhantes. Os resultados das análises de PCA, Figura 2 (b), em que apresenta 96,4% dos dados, corroboram com os resultados de HCA, no qual no eixo PC1, juntamente com eixo PC2 verifica-se pequena distância entre o óleo de Copaíba com a mistura A10/C90.

Figura 2 - Dendograma obtido na análise de agrupamento hierárquico dos resultados das análises de ICM vs concentração dos óleos e das misturas.



(a)



(b)

Fonte: fonte do próprio autor

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os óleos essenciais de Andiroba e Copaíba apresentaram potencial significativo de controle para o fungo *Sclerotium rolfsii*, e foram possíveis observar pela análise multivariada (HCA e PCA) a ação inibitória das diferentes proporções de combinação de óleos essenciais.

AGRADECIMENTO

A UFAC/CNPq pela bolsa de iniciação científica e a FAPAC.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. G. P.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, J. B.; ARAUJO, M. L.; ARAUJO, J. M. Potencial fungitoxico dos óleos de murmuru (*Astrocaryum ulei* Mart.) e coco (*Cocos nucifera* L.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* no maracujá. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19; p. 1515-1521, 2014.

AMORIM, A. C. L.; CARDOSO, M. das G.; PINTO, J. E. B. P.; SOUZA, P. E. de; DELÚ FILHO, N. Fungitoxic activity avaluation of the hexane and metanol extractts of copaíba plant leanes *Copaifera langsforsffi* Desfon. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 314-322, 2004.

BENINI, P. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KLAIS, E. C.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINE, R. M.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B. Efeito *in vitro* do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 677-683, 2010.

CARVALHO, F. I. M., DANTAS FILHO, H. A.; Estudo da qualidade da gasolina tipo a e sua composição química empregando análise de componentes principais, **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 33-38, 2014.

DINIZ, S. P. S. S.; COELHO, J. S.; ROSA, G. S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, R. R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 9-11, 2008.

DERBALAH, A. S.; DEWIR, Y. H.; EL-SAYED, A. E. Antifungal activity of some plant extracts against sugar beet damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1021-1029, 2011.

De BRITO, R.S.; ALVES, W.F.; MOREIRA, J.G.V.; Avaliação do efeito da inibição da antracnose do maracujazeiro com a utilização do óleo de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 2, p. 43-48, 2017.

DOMINGUES, R. J.; YOUNG, M. C. M.; TÖFOLI, J. G.; MATHEUS, D. R. Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, 99 *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 149-151, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa. p. 421-428, 2008.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FORMIGHIERI, A. P.; STANGARLIN, J. R.; MEINERZ, C. C.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillus-veneris* (L.) no controle de fitopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 487-496, 2010.

INGHAM, J. L. Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. **Phytopathol. Z.** v. 78, p. 314-335, 1973.

MORANDI, A. B. M.; BETIOL W. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas: Controle Biológico de doença de plantas no Brasil. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, v. 1, p. 7-8, 2009.

KIMATI, H.; GIMENEZ-FERNANDES, N.; OAVE, J. S.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETIOL, W. Guia de fungicidas agrícolas- recomendações por cultura. Jaboticabal: **Grupo Paulista de Fitopatologia**. v. 1, p. 112-120, 1997.

LIMA, I. O.; GUERRA OLIVEIRA, R. A.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.; Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.

MAKISHIMAN,; MELO, W. O Rei das Hortaliças. Revista Cultivar Hortaliças e Frutas. **Embrapa Hortaliças**, v. 5, n. 29, p. 28-32, 2005.

MORAES, L. A. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 183-186, 2002.

PACKER, J. F.; LUZ, M. S. Método para a avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, p. 115-23, 2011.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, J. A.; SOUZA, P. E.; SHAN, A. Y. K. V.; GONÇALVES, L. D. Constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus* e sua atividade biológica. **Poços de Caldas, Sociedade Brasileira de Química**, 2001.

SINAI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C. HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S.. Óleos essenciais – Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. p. 38-42, 2000.

SOUZA, R. M. S; SERRA, I. M. R. S; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 42-47, 2012.

TAGAMI, O. K.; GASPARIN, M. D. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; MORAES, L. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294, 2009.

YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Effect of seed pelleting with *Trichoderma sp.* and *Gliocladium virens* on growth and colonization of roots of sunflower and mung bean by *Sclerotium rolfsii*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 2, p. 947-953, 2015.