



## Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*)

Samara da Silva Oliveira<sup>1\*</sup>, Rogério Eiji Hanada<sup>1</sup> e Rychaellen Silva de Brito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Rio Branco, Acre/Brasil. Discente da Universidade Federal do Acre, Mestranda do Curso de Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre/Brasil. \*[agroufac174@gmail.com](mailto:agroufac174@gmail.com).

Recebido em: 19/11/2018

Aceito em: 20/01/2019

Publicado em: 12/02/2019

### RESUMO

A cebolinha (*Allium fistulosum* L.) é infectada por *Colletotrichum theobromicola*, agente causador da antracnose. Objetivou-se identificar os componentes majoritários do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliar sua atividade antifúngica contra *C. theobromicola* em condições *in vitro*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e a composição química do óleo foi determinada por CG-MS. Para determinar a atividade antifúngica, foi adotado o métodos de diluição em ágar e a inibição do crescimento micelial e produção de esporos foram analisadas. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os componentes do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe mais abundantes foram: p-mentha-1 (7), 8-dieno (15,55%) e (-) -Zingibereno (47,75%). Todas as concentrações proporcionaram inibição do crescimento micelial, com valores para 150µl (52%) e 200µl (68,60%). O aumento da concentração do óleo essencial também proporcionou redução da esporulação do fungo em todas as concentrações testadas. Os resultados validam o efeito dos óleos essenciais de gengibre sobre *C. theobromicola* no tratamento da antracnose da cebolinha.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica. Óleo essencial. Antracnose.

## Chemical composition and antifungal activity of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil on *Colletotrichum theobromicola*, causador of allium fistulosum (anthracnose)

### ABSTRACT

Chives (*Allium fistulosum* L.) are infected by *Colletotrichum theobromicola*, the causative agent of anthracnose. The objective was to identify the major components of the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe and to evaluate its antifungal activity against *C. theobromicola* under *in vitro* conditions. The essential oil was obtained by hydrodistillation and the chemical composition of the oil was determined by GC-MS. To determine the antifungal activity, agar dilution methods were adopted and the inhibition of mycelial growth and spore production were analyzed. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5%. The most abundant components of the essential oil of *Z. officinale* Roscoe were: p-mentha-1 (7), 8-dieno (15.55%) and (-) -Zingiberene (47.75%). All concentrations provided inhibition of mycelial growth, with values for 150µl (52%) and 200µl (68.60%). Increasing the concentration of the essential oil also provided a reduction in sporulation of the fungus at all concentrations tested. The results validate the effect of the essential oils of ginger on *C. theobromicola* in the treatment of chives anthracnose

**Keywords:** Antifungal activity. Essential oil. Anthracnose.

## INTRODUÇÃO.

A cebolinha (*Allium fistulosum* L.), conhecida popularmente como cebolinha verde ou comum, pertence à família Alliaceae (FILGUEIRA, 2000). Por ser uma espécie condimentar é bastante apreciada pela população brasileira para dar aroma e sabor a uma diversidade de pratos típicos (GAMA et al., 2016).

A cebolinha é infectada por diversos patógenos que ocasionam prejuízos aos produtores, como *Colletotrichum theobromicola* (Delacroix) responsável pela antracnose (MATOS et al., 2017). Para o controle dessa doença, não há fungicidas registrados (AGROFIT, 2017) e uma das possíveis formas de manejo seria a adoção de métodos de controle alternativo advindos de produtos naturais. Óleos essenciais são substâncias naturais, oriundas do metabolismo secundário das plantas que se caracterizam pela volatilidade e oleosidade, apresentam diversas aplicações industriais e uma delas é como agentes antimicrobianos (PANDEY et al., 2017).

Há várias vantagens no uso de óleos essenciais na agricultura, pois são compostos naturais, não deixam resíduos, são considerados seguros, baixo custo e podem ser utilizados em concentrações relativamente baixas (SHOLBERG, GAUNCE 1995). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais já são bem documentadas e podem fornecer alternativas aos fungicidas convencionais (Perricone et al., 2015). Fungos como *Aspergillus flavus*, *Neurospora sitophila* e *Penicillium digitatum* são completamente inibidos pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (SONKER et al., 2015).

*A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. clavatus* são inibidos pelos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), cravo (*Syzygium aromaticum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* [DC] Stapf.) e gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.). (BOŽIK et al., 2017). Entre as plantas medicinais e aromáticas que produz óleo essencial, o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta herbácea, perene e pertencente à família Zingiberaceae (SALMOM et al., 2012) e seu óleo essencial apresenta compostos químicos de natureza diversa (LÓPEZ et al., 2017), como antimicrobiana (BELLIK et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi identificar os componentes majoritários do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliar sua atividade antifúngica contra *C. theobromicola* em condições *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS.**

Os trabalhos foram realizados no laboratório de fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia no período de março a agosto de 2018.

### *Obtenção do óleo essencial de Gengibre*

O óleo essencial foi cedido pelo Dr. Francisco Célio Maia Chaves responsável pelo laboratório de Produtos Naturais e Fitoquímica da EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. O óleo foi obtido por hidrodestilação e a extração foi realizada no aparelho tipo Cleavenger e armazenado na geladeira a 4°C até o teste e análise.

### *Análise da Composição Química do óleo essencial*

O óleo essencial foi analisado em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890b (CG System). Foi utilizado hélio como gás de arraste com a velocidade de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; taxa de Split 1:20 com volume injetado de 1 µL. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 240°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60°C por 2 min, seguido de um incremento de 3°C por min até atingir 240°C, sendo mantida constante por 15 minutos. Em todas as análises a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. A identificação dos constituintes químicos foi feita por comparação dos seus espectros de massa com os espectros de massa disponíveis no banco de dados do equipamento (biblioteca Willey 7), com a literatura e pelo índice aritmético de retenção relativo (IA) à série de alcanos C9-C22 (ADAMS, 2007). A porcentagem relativa desses constituintes foi realizada pela integração da área dos cromatogramas de íons totais obtidos a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (ROSADO et al., 2011).

### *Avaliação da Atividade Antifúngica sobre C. theobromicola*

A atividade antifúngica foi realizada no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi utilizado o isolado *C. theobromicola*, registrado com número (INPA 1809) onde estava armazenado pelo Método Castellani. Foram utilizadas placas de Petri de 90 mm x 15 mm com meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), preparado com 200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar por litro de água. Com o meio de cultura pronto, foi acrescentado 100 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico Ampicilina para evitar contaminação por bactéria. Alíquotas do óleo essencial de gengibre correspondente a 0, 10, 50, 100, 150 e 200 µl foram incorporadas

ao meio de cultura pelo método de diluição em ágar e colocado 20 ml da mistura em placas de Petri. Após a solidificação, discos de micélio (7 mm de diâmetro) do isolado *C. theobromicola* foram depositados no centro das placas. Posteriormente foram seladas com papel aderente e mantidas em câmara de crescimento (B.O.D.) a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h (FERREIRA et al., 2012).

A partir do sétimo dia após a repicagem foram realizadas avaliações das colônias. O crescimento micelial foi obtido pela medida do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de um escalímetro. Com os dados obtidos, foi determinado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC), utilizando a fórmula proposta por Bastos (1997).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis concentrações (0, 10, 50, 100, 150 e 200 µl) e cinco repetições, onde cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para análises dos dados foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT 7.6 Beta.

#### *Inibição da esporulação de C. theobromicola*

A avaliação da esporulação fúngica realizou-se 30 dias após a repicagem. Para tanto, 10 mL de água destilada foi acrescentada sobre as colônias nas placas de Petri. Posteriormente, com uma lâmina de microscópio, realizou-se uma raspagem superficial do meio de cultura e a suspensão foi filtrada em gaze, com o auxílio de um funil de vidro e recolhida em um béquer. A contagem do número de esporos procedeu-se em câmara de Neubauer.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis concentrações (0, 10, 50, 100, 150 e 200 µl) e cinco repetições, onde cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para análises dos dados foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT 7.6 Beta

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO.**

Os principais componentes dos óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) detectados por GC-MS foram (+) - a-pineno (3,86%), Camphene (9,31%), p-mentha-1(7),8-dieno (15,55%), β-Citral (6,41%), α-Curcumine (5,55%), (-)-Zingibereno (47,75%), α-farneseno (7,75%), β-Bisabolene (6,04%), β-sesquifelandreno (9,6%).

Os resultados diferiram pelos observados por Machado et al., (2003) que detectaram os constituintes majoritários, respectivamente:  $\alpha$ -zingibereno (20,6%; 24,3%), geranial (21,6%; 17,7%),  $\beta$ -sesquifelandreno (8,5%; 11%),  $\alpha$ -farneseno (6,9%; 8%), cineol (6,0%; 7%), neral (8,2%; 4,9%), geraniol (4,5%; 6,9%) e  $\gamma$ - curcumeno (6,0%; 0,0%), respectivamente. Já Dabague et al., (2011), avaliaram o teor e a composição do óleo essencial de rizomas de gengibre e constataram o geranial em maior concentração.

Estes estudos mostraram grandes variações na composição química do óleo essencial de gengibre. Estas variações de composição química dos óleos essenciais de gengibre podem ser explicadas por vários fatores, entre eles, as diferentes regiões geográficas, por fatores genéticos, como idade da folha e variações sazonais (LOPÉS et al., 2017) e também a secagem e armazenamento pós-colheita, afetam na composição química dos óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, o tipo de material vegetal utilizado e o método de extração de um óleo essencial (NAKATSU et al. 2000).

Em relação a atividade antifúngica do óleo essencial de *Z. officinale* foi constatado que independente das concentrações testadas, todas inibiram o crescimento micelial de *C. theobromicola*, apresentando efeito fungistático. O tratamento controle obteve valores de diâmetro de colônia em torno de 9 cm, obtendo-se diferença significativa em relação as demais concentrações, com valores de 7.4 cm (150  $\mu$ l), 5.5 cm (100  $\mu$ l), 4.2 cm (150  $\mu$ l) e 2.9 cm (200 $\mu$ l). Em todas as concentrações houve inibição do crescimento micelial (PIC), com inibição acima de 50% para as concentrações 150  $\mu$ l (52%) e 200  $\mu$ l (68,60%). A Tabela 1 demonstra que a atividade antifúngica do óleo aumentou conforme o aumento das concentrações estudadas.

As pesquisas realizadas por Bastos e Albuquerque (2004) corroboram com o presente trabalho. Esses autores verificaram que o óleo essencial de *P. aduncum* na concentração acima de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> inibiu em 100% tanto o crescimento micelial quanto a germinação de conídios de *C. musae*.

**Tabela 1-** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Z. officinale* sobre o crescimento micelial de *C. theobromicola*, agente causal da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Crescimento médio micelial (cm)	Percentual de inibição (%)
0	9.0a	**
10µl	7.4b	17
50µl	6.4c	28
100µl	5.5d	38
150µl	4.2e	52
200µl	2.9f	68,80
<b>SMD</b>	<b>0.572</b>	
<b>CV%</b>	<b>4.94</b>	

Diniz et al., (2008) investigaram *in vitro*, a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. arvensis* frente aos patógenos *Aspergillus sp.*, *Penicillium rubrum*, *Sclerotinia sp.*, *Fusarium moniliforme* e *Corynespora cassiicola* e constataram que o óleo essencial de *M. arvensis*, em concentração de 100 µL, foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento das diferentes espécies de fungos fitopatógenos.

O aumento da concentração do óleo essencial proporcionou redução na esporulação do fungo em todas as concentrações testadas. No entanto, segundo o Teste de Tukey, apenas no tratamento controle houve diferença significativa em relação as concentrações testadas (Tabela 2).

Em trabalho *in vitro* avaliando o efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais das espécies aromáticas, como *Ocimum. selloi* Benth. (alfavaquinha), *Mentha arvensis* L. (hortelã japonesa) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo-da-índia) sobre o crescimento micelial e germinação dos basidiósporos de *M. pernicioso*, os autores constataram uma redução gradativa do crescimento miceliano de *M. pernicioso* com doses crescentes dos óleos essenciais, obtendo-se inibição total a partir da concentração de 0,75 µL.mL<sup>-1</sup> todos os óleos essenciais testados (Chaussê et al. 2011).

**Tabela 2** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Z. officinale* sobre a inibição da esporulação de *C. theobromicola*, agente causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Esporulação (cm <sup>2</sup> )
0	42,8a
10µl	16,3b
50µl	10,96b
100µl	12,86b
150µl	12,86b
200µl	14,66b
<b>SMD</b>	<b>7.165</b>
<b>VC%</b>	<b>14,17</b>

A tendência atual nas pesquisas com produtos naturais é a obtenção de princípios ativos contidos nas espécies vegetais para uma possível aplicação em microrganismos, entre eles, os fungos. As pesquisas envolvendo plantas medicinais têm crescido significativamente em número e importância principalmente quanto aos aspectos químicos, etnobotânicos e atividade biológica (ABRANTES et al., 2013).

## CONCLUSÃO.

O óleo essencial de gengibre apresenta vários compostos químicos em sua composição e a atividade antifúngica do respectivo óleo pode estar ligada a ação conjunta desses componentes que inibe tanto o crescimento micelial de *Colletotrichum theobromicola*, quando a esporulação do patógeno. Concentrações altas do óleo essencial de gengibre, como 200µL, reduz significativamente o desenvolvimento do fungo. Assim, trabalhos avaliando o efeito desse óleo essencial direto na planta são importantes para propor medidas de controle alternativo no manejo de doenças em plantas.

## REFERÊNCIAS

ABRANTES, M., LIMA, O. E., ARAÚJO, M., DE MEDEIROS, P., MENEZES, C. P., QUEIROGA, F., MILAN, E. P. Antifungal activity of essential oils on non *Candida albicans* yeasts. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 227–233, 2013.

AGROFIT. 2017. **Agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 01 ago. 2017.

- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de Piper aduncum no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555–557, 2004.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.
- BELLIK, Y. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 40-44, 2014.
- BOŽIK, M., CÍSAŘOVÁ, M., TANČINOVÁ, D., KOUŘIMSKÁ, L., HLEBA, L., KLOUČEK, P. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 146–152, 2017.
- CHAUSSÊ, C., BOMFIM, D., DIAS, S., DALVA, S., MIDLEJ, V., CORRÊA, L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 492–496, 2011.
- DABAGUE, I. C. M., DESCHAMPS, C., MÓGOR, A. F., SCHEER, A. P., CÔCCO, L. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 79–84, 2011.
- 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.
- FERREIRA, J. B.; NEVES, Y. Y. B.; NASCIMENTO, G. O.; FIGUEIREDO, A.L.V.F.; VENTURI N, N. Óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, Agente causal da antracnose em palmáceas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, 2012.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed, Viçosa, Minas Gerais: UFV, 2000, 402 p.
- GAMA, G. O.; SOUZA, T. C.; QUEVEDO, L. F. Avaliação do desenvolvimento de mudas de cebolinha produzidas em três tipos de substratos comerciais na Região de Dourados – MS. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e da Terra**, v. 5, p. 36-42, 2016.
- LÓPEZ, E. I. C., BALCÁZAR, M. F. H., MENDOZA, J. M. R., ORTIZ, A. D. R., MELO, M. T. O., PARRALES, R. S., DELGADO, T. H. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 1511-1524, 2017.
- MACHADO, G. C. et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26, 2003, Maringá. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2003.
- MATOS, K. S.; SANTANA, K. F. A.; CATARINO, A. M.; HANADA, R. E. First report of antracnose on welsh onion (*Allium fistulosum*) in Brazil caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatum*. **Plant Disease**, p. 101- 1055, 2017.
- PANDEY, A. K., KUMAR, P., SINGH, P., TRIPATHI, N. N., BAJPAI, V. K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, n. 7, p. 1–14, 2017. .
- PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA M., A. BEVILACQU Bioatividade de óleos essenciais: uma revisão sobre sua interação com componentes de alimentos . **Frente Microbiol**, n. 6 :76. 2015.
- SALMON, C. N. A.; BAILEY-SHAW, Y. A.; HIBBERT, S.; GREEN, C.; SMITH, A. M.; WILLIAMS, L. A. D. Characterisation of cultivars of Jamaican Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HPTLC and HPLC. **Food Chemistry**, n. 131, p. 1517-1522, 2012.
- SHOLBERG, P. L.; GAUNCE, A. P. Fumigation of fruit with acetic-acid to prevent postharvest decay. **Hortscience**, n. 30, v. 6, 1271–1275, 1995.



SINGH, M., KHAN, M. M. A.; NAEEM, M. Effect of nitrogen on growth, nutrient assimilation, essential oil Content, yield and quality attributes in *Zingiber officinale* Rosc. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, p. 171-178, 2016.

SONKER N.; PANDEY A. K.; SINGH, P. Efficiency of *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp essential oil as a mycotoxicant against postharvest mycobiota of table grapes. **Journal of the Science of Food Agriculture**, n. 95, p. 1932–1939, 2015.

ROSADO, L. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NICULAU, E. S.; ALVES, P. B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço cv. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 291-296, 2011.