

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM PALMÁCEAS

Josimar Batista Ferreira¹, Ygoor Yvaney Bessa Neves², Gleisson de Oliveira Nascimento³, Angelo Luiz Valente de Figueiredo⁴, Nelson Venturin⁵.

1. Professor Doutor da Universidade Federal do Acre, Campus Floresta - Cruzeiro do Sul/Acre – Brasil (josimarferreira@gmail.com)
2. Mestrando em Ciências Florestais pela Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG – Brasil
3. Mestrando em Ciências Florestais pela Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG – Brasil
4. Graduando em Agronomia pela Universidade Federal do Acre, Campus Floresta - Cruzeiro do Sul/Acre – Brasil
5. Professor Doutor da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG – Brasil

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

RESUMO

A Amazônia é o centro da biodiversidade de várias espécies de plantas frutíferas, nativas e plantas medicinais. O açaieiro, principalmente nas mudas apresenta várias doenças fitossanitárias destacando-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e fusariose (*Fusarium solani* e *F. moniliforme*). O presente estudo teve por objetivo verificar a viabilidade da utilização de óleos essenciais de buriti, murmuru e patauá *in vitro* na inibição de crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, isolado de plantas de açaí. Material com sintomas de antracnose foi coletado em viveiros da região do Alto Juruá e os óleos essenciais foram adquiridos junto à empresa Juruá Eco Extrativismo. Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro das culturas purificadas foram transferidos para placas contendo de meio MEA 2% (extrato de malta e agar), submetidos à câmara de crescimento BOD à temperatura de 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C e fotoperíodo de 12 horas. Com base nos resultados da avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial, foram testados três óleos essenciais (murmuru, buriti e patauá) nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 50 µL/mL em meio MEA 2% e testemunha sem qualquer adição. Verificou-se que as temperaturas com melhor resposta de crescimento do patógeno foram a de 25° e 30°C. E dentre os óleos essenciais estudados se destacou o óleo de buriti com maior efeito inibidor, em que, concentrações a partir de 15, 20 e 50 µL/mL apresentaram maior efeito inibidor. Todos os óleos utilizados mostraram-se como possíveis alternativas no biocontrole de antracnose apresentando crescimento inferior quando comparado com a testemunha.

PALAVRAS CHAVE: Óleos essenciais, *Euterpe oleraceae*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

ESSENTIAL OILS IN CONTROL *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN PALMACEAS

ABSTRACT

The Amazon is the biodiversity center of various fruit trees species both, native and medicinal plants. The acai tree has several plant diseases, Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and Fusariosis (*Fusarium solani* and *F. moniliforme*). This study aimed to verify the feasibility of the use of buriti, murmuru, pataua *in vitro* essential oils in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelial growth, isolated from Acai plants. Açaí plants infected by Anthracnose were collected in a Tree Nursery located on region Alto Juruá, Acre, Brazil in the neighborhood and the essential oils were purchased from Juruá Eco Extrativismo company. Mycelial discs measuring 0.5 cm in diameter extracted from the purified cultures were transferred to plates containing 2% MEA (malt extract and agar), and then they were submitted to the temperatures of 15°, 20°, 25°, 30° and 35°C and photoperiod of 12 hours inside a BOD growth chamber. Based on the temperature effect result over the mycelial growth were tested three essential oils (murmuru, buriti and pataua) at 1, 5, 10, 15, 20 and 50 µL/mL concentrations in plates containing 2% MEA. It was verified that the temperatures of 25° e 30°C had the best effect in the pathogen growth. Also Buriti oil showed higher inhibitory effect at 15, 20 e 50 µL/mL concentrations. As a conclusion, all oils used showed to be possible alternatives as a Anthracnose biocontrol.

KEY WORDS: Essential oils, *Euterpe oleraceae*, *Colletotrichum gloeosporioides*

INTRODUÇÃO

A Amazônia é o centro da biodiversidade de várias espécies de plantas frutíferas, nativas e plantas medicinais, que também se encontram espalhadas em diversas regiões do mundo (LEDO et al., 2003). Dessa forma, estima-se que cerca de 500 doenças afetem plantas de importância econômica, sendo a maioria causada por fungos. As quais, em sua maioria, disseminam-se por ventos ou respingos de chuvas e orvalho, que provocam infecções em folhas, frutos e ramos (LEDO et al., 2003).

Dentre as inúmeras espécies que ocorrem na Amazônia, destacam-se as palmeiras, famílias palmáceas, nessa família destacam-se espécies importantes, como: açaí, rabo-de-peixe, buriti, coqueiro entre outros. Neste sentido, essas espécies fazem parte do ecossistema, fornecendo alimento para o homem e alimentação e abrigo para diversos grupos de animais.

O açaí é uma palmeira tipicamente tropical, encontrada em estado silvestre, fazendo parte da vegetação florística das matas de terra firme, várzea e igapó de toda a Amazônia. Fornece variada matéria prima, sendo seus frutos utilizados para a produção do tradicional vinho de açaí, suco comestível amplamente utilizado na alimentação popular, que se caracteriza pelo alto valor energético e nutricional, utilizados pelas populações nativas para suprir múltiplas necessidades. Na fase de mudas o açaí apresenta alguns problemas de fitossanidade, dentre as doenças que atacam essa espécie, destacam-se os patógenos *Fusarium solani* e *Fusarium moniliforme*, transmitidos pelas sementes e *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose. Nos últimos anos a demanda pelo açaí tem crescido de forma gradativa, aumentando a procura tanto no mercado interno como externo. Dessa forma o governo acreano tem trabalhado com sistemas de produção estratégica, incluindo o açaí, visando o fortalecimento da economia no setor primário

particularmente daqueles produtores localizados em áreas desmatadas e com aptidão para o seu cultivo.

Devido essa espécie contribuir de forma direta na renda do Vale do Juruá e no desenvolvimento da região e pelo fato de doenças em plantas está contribuindo significativamente na redução da produção de alimentos e no fornecimento à população, faz-se necessário um estudo mais detalhado no uso de produtos que atuem no controle de fitopatógenos.

Portanto, este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade da utilização de óleos essenciais de buriti, murmuru e patuá, *in vitro*, na inibição de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Euterpe oleraceae*.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Acre, Campus Floresta Centro Multidisciplinar – CMULTI, no período compreendido entre os meses de agosto a novembro de 2010.

Isolado Utilizado

O material infectado com sintoma de Antracnose (*C. gloeosporioides*) foi coletado em viveiros na região do Alto Juruá Acre, Brasil. Para isolar, fragmentos dos materiais enfermos foram lavados com água, passados no álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e em água esterilizada, sendo, colocados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo em média 20 mL de meio de cultura MEA 2% (extrato de malte ágar). Posteriormente, foram acondicionadas em BOD a 25°C por fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Em seguida as colônias foram purificadas e mantidas sob refrigeração para preservação.

Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro das culturas purificadas foram transferidos para placas contendo 20 mL de meio MEA 2% e colocadas em BOD diferentes, sendo submetidas à temperatura de 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por isolado. Cada tratamento foi composto de 6 placas de Petri. Dessa forma, por isolado, foram utilizadas 30 placas.

Na avaliação do crescimento micelial foram realizada a medição a cada 24 horas, do diâmetro das colônias, em posição ortogonal, durante sete dias, a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura, obtendo-se sete leituras. A atividade antifúngica das concentrações dos óleos essenciais foram avaliadas conforme SOUZA et al., (2009) através da inibição do crescimento micelial do patógeno. Utilizou-se cada óleo essencial das espécies vegetais nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 50µL/mL em meio de cultura MEA 2%. A testemunha consistiu do disco do fungo cultivado em meio MEA 2%, sem qualquer adição.

Desta forma, os óleos essenciais das plantas foram primeiramente adicionados ao meio MEA 2% e foram esterilizados em autoclaves, para obter um meio livre de contaminantes e após isso foram vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Com o auxílio de um vazador de 0,5 cm de diâmetro foram retirados discos do meio de cultivo contendo um isolado de *C. gloeosporioides*, com aproximadamente 7 dias. Cada placa foi inoculada no centro, com um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélios da cultura monospórica (GRIGOLETTI JÚNIOR & LAU, 1999).

As placas foram incubadas à temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do efeito das diferentes concentrações de óleo essencial sobre o

crescimento micelial foi realizada diariamente, após 24 horas da inoculação, medindo-se o diâmetro da área de crescimento micelial em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas). Quando o crescimento micelial de qualquer das placas cobrir totalmente a superfície do meio de cultura foram encerradas as avaliações.

O índice de crescimento micelial (ICM) foi calculado e os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e quando significativos à análise de regressão. O ICM foi determinado pela Equação 01:

$$ICM = [(C1/N1)+(C2/N2)+(C3/N3)+(C4/N4)+(C5/N5)+(C6/N6)+...+(Cn/Nn)]$$

em que:

ICM – Índice de Crescimento Micelial;

C1,C2,Cn = Crescimento micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação;

N1,N2,Nn = Número de dias após a inoculação.

Com a média dos resultados obtidos foram determinadas as ações fungitóxica dos óleos através da concentração inibitória mínima (CIM), expressa em microlitros por mililitros ($\mu\text{L}/\text{mL}$), que representa a mais baixa concentração necessária para causar total inibição do crescimento micelial dos fungos (SILVA & BASTOS, 2007).

Foram realizadas avaliações, calculando-se a porcentagem de inibição do crescimento dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a Equação 02.

$$PIC = \frac{(DTe - DTr)}{DTe} * 100$$

em que:

PIC = Porcentagem de Inibição de Crescimento

DTe = diâmetro da testemunha

DTr = diâmetro do tratamento

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $3 \times 7 \times 5$ (3 (óleos) x 6+1 (concentrações + testemunha) x 5 (repetições)).

Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade sendo esta realizada utilizando-se o programa SISVAR® (FERREIRA et al., 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da temperatura no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

Com relação ao efeito da temperatura no crescimento micelial, verificou-se pelo índice de crescimento micelial (ICM), que as temperaturas de 25° e 30°C proporcionaram ICM correspondente a 8,33cm e 8,66cm, respectivamente, diferindo estatisticamente das demais temperaturas. Enquanto que a temperatura de 35°C foi a que proporcionou menor ICM, igual a 2 cm (Figura 01).

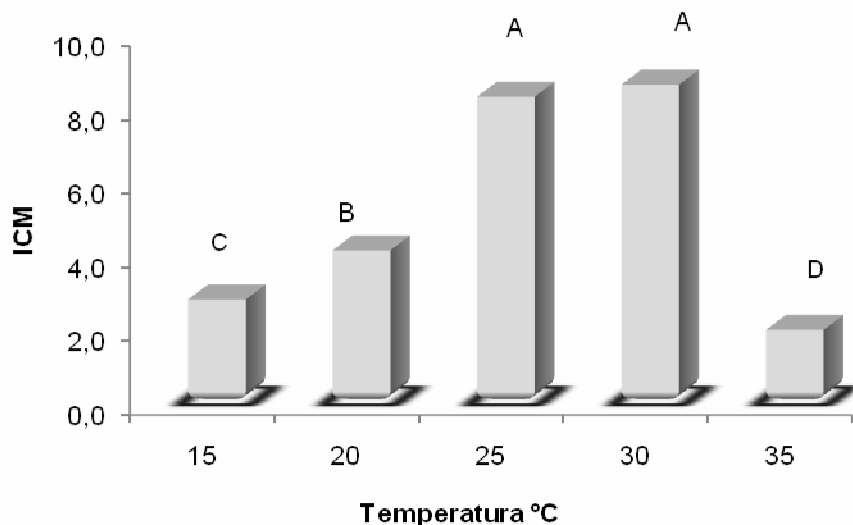


FIGURA 01 - Efeito da temperatura pelo Índice de Crescimento Micelial - ICM de *C. gloeosporioides* isolado de planta de *Euterpe oleraceae*, em diferentes temperaturas. UFAC, Cruzeiro do Sul, AC, 2010. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Da mesma forma, em estudo realizado por SALES-CAMPOS et al., (2008), no cultivo de uma linhagem de *Pleurotus ostreatus*, de ocorrência na Amazônia, em meio à base de serragem da espécie madeireira Simarouba amara, estes autores testaram cinco temperaturas de incubação (22, 25, 27, 30 e 35°C) e verificaram que a de 25°C foi a mais indicada para o crescimento micelial.

Porém, de acordo com estudo feito por VARGAS-ISLA & ISHIKAWA (2008), avaliando as condições ótimas do crescimento micelial *in vitro* de uma linhagem de *L. strigosus* isolada da Amazônia brasileira, verificaram que, dentre as temperaturas testadas (25, 30, 35, 40 e 45°C), a temperatura mais favorável foi a de 35°C.

Sensibilidade micelial de *C. gloeosporioides* aos óleos essenciais

Ao avaliar o efeito dos óleos essenciais de buriti, murmurú e patauá sobre o patógeno *C. gloeosporioides* e verificar qual deles obteve maior efeito inibidor, observa-se que dentre os óleos utilizados, o óleo de buriti apresentou maior efeito inibidor quando comparado com os demais óleos. Por outro lado, os óleos de murmurú e patauá não diferiram estatisticamente (Figura 02).

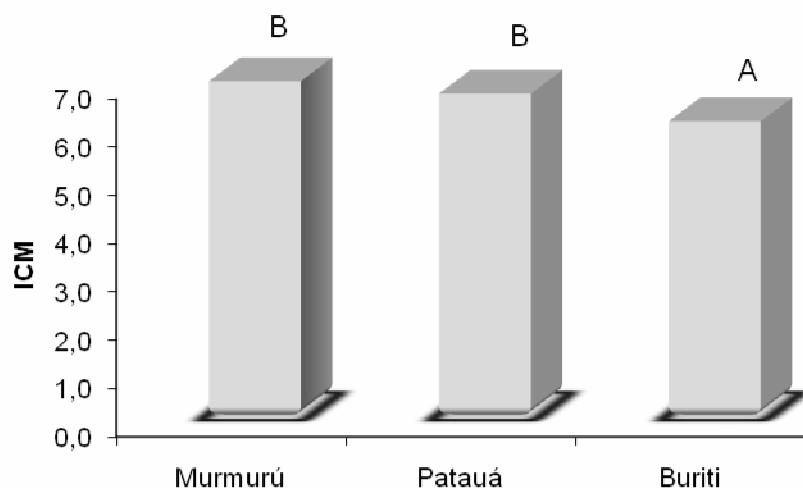


FIGURA 02 - Efeito dos óleos de murmurú, patauá e buriti sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de planta de açazeiro. UFAC, Cruzeiro do Sul, AC, 2010. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Verificou-se que as concentrações de 15, 20 e 50 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram maior efeito inibidor. Porém as concentrações 1, 5 e 10 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram crescimento mediano e não diferiram estatisticamente. Vale salientar que todas as concentrações apresentaram potencial inibidor inferior quando comparados com a testemunha (Figura 03).

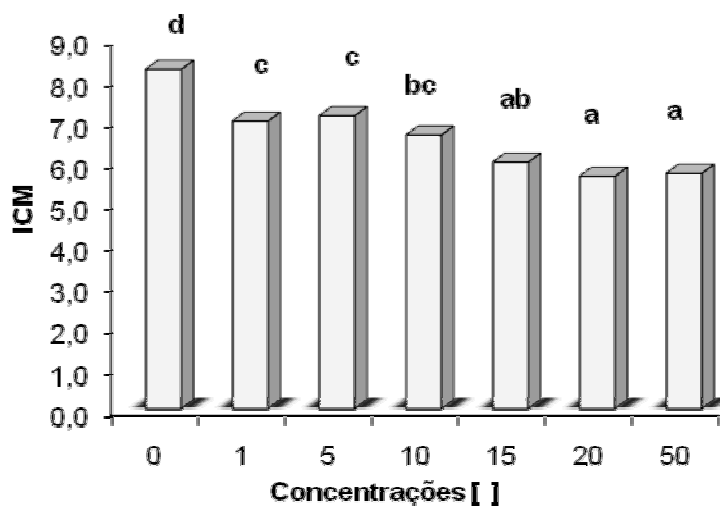


FIGURA 03- Efeito das concentrações dos óleos sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de planta de açazeiro. UFAC, Cruzeiro do Sul, AC, 2010. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi possível analisar a equação de regressão pelo o Índice de Crescimento Micelial - ICM para *C. gloeosporioides* submetidos a diferentes concentrações dos óleos: buriti, murmurú e patauí. Observou-se que a testemunha apresentou crescimento micelial superior quando comparado com as demais concentrações e que à medida que se aumentava as concentrações o crescimento foi reduzido (Figura 04).

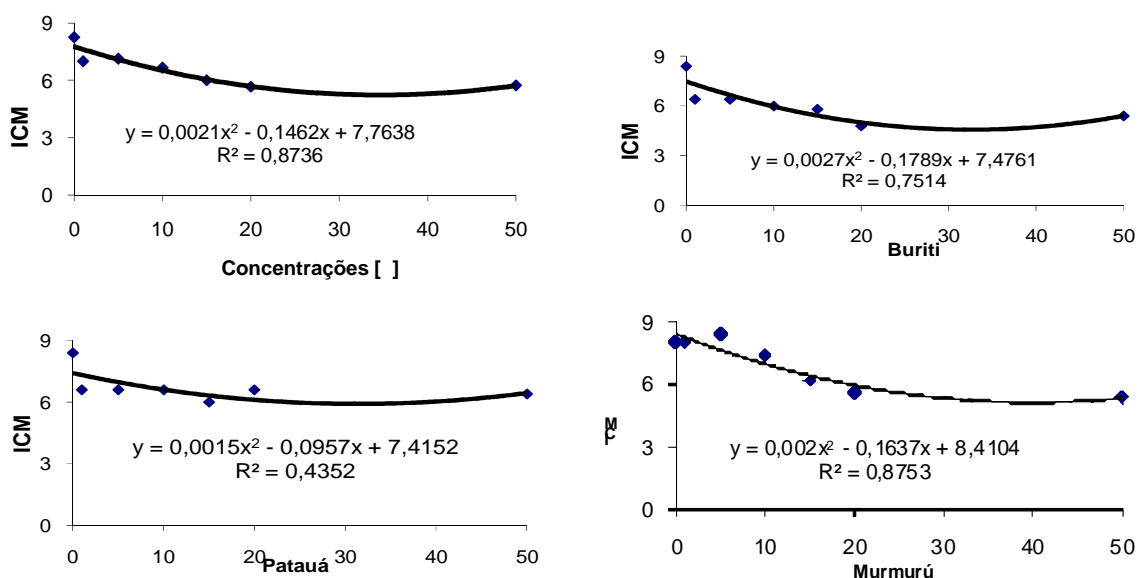


FIGURA 04- Equação de regressão para o Índice de Crescimento Micelial - ICM para *C. gloeosporioides* isolado de planta de açaizeiro, submetidos à diferentes concentrações de óleos de murmurú, patauí e buriti.

Zacaroni (2009), avaliando o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* fs. *cubensis*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bipolaris sorokiniana*, observou efeito inibitório para todos os patógenos, porém seus resultados diferiram na concentração de inibição total do crescimento micelial.

Trabalho realizado por Souza-Júnior et al.(2009) enfatiza que trabalhos realizados com óleos essenciais e todas as concentrações testadas inibiram em 100% a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* em maracujazeiro amarelo. Verificando-se que no período de 7 dias os esporos permaneceram sem germinar, não ocorrendo, conseqüentemente, o crescimento micelial do fungo e, comprovando-se, portanto, o efeito fungicida dos óleos essenciais e não somente fungistático.

Porém, Bastos & Albuquerque (2004), relatam que são escassos na literatura trabalhos que verificam efeito de óleos essenciais de plantas sobre a germinação de esporos de espécies do gênero *Colletotrichum*, bem como as concentrações mínimas inibitórias ao fungo.

Para o óleo de patauí, em todas as concentrações apresentou inicialmente um efeito estimulante, ou seja, crescendo mais que a testemunha. Porém, a partir do 6º dia 80% das placas com concentração de 15, 20 e 50µL/mL, apresentaram efeito

inibidor, pela análise de regressão teve crescimento inferior ao da testemunha, porém com efeito inibitório inferior aos demais óleos (Figura04 e Tabela 01).

Já o óleo de buriti foi o que apresentou maior efeito inibidor, diferindo-se estatisticamente quando comparado com os demais óleos Além do mais, as concentrações de buriti destacaram-se pelo crescimento irregular do patógeno (Figura 05). Na análise de regressão observa-se redução acentuada do ICM à medida que se aumentava as concentrações (Figura 04).

Já o óleo de buriti foi o que apresentou maior efeito inibidor, diferindo-se estatisticamente quando comparado com os demais óleos Além do mais, as concentrações de buriti destacaram-se pelo crescimento irregular do patógeno (Figura 05). Na análise de regressão observa-se redução acentuada do ICM à medida que se aumentava as concentrações (Figura 04).

TABELA 01 - Média do Crescimento diário, concentrações e as diferentes Porcentagens de Inibição de Crescimento (PIC) para os óleos de *Astrocaryum murumuru* Mart. (murmuru), *Oenocarpus sbataua* Mart. (patauá) e *Mauritia flexuosa* L.f. 1782 (buriti).

Conc. [] μL/mL	<i>Patauá</i>		<i>Buriti</i>		<i>Murmuru</i>	
	Média (cm)	PIC (%)	Média	PIC (%)	Média (cm)	PIC (%)
0	8,4	-	8,4	-	8,0	-
1	6,6	21,43	6,4	23,81	8,0	0
5	6,6	21,43	6,4	23,81	8,4	-5,0
10	6,6	21,43	6,0	28,57	7,4	7,50
15	6,0	28,57	5,8	30,95	6,2	22,50
20	6,6	21,43	4,8	42,86	5,6	30,00
50	6,4	23,81	5,4	35,71	5,4	32,50

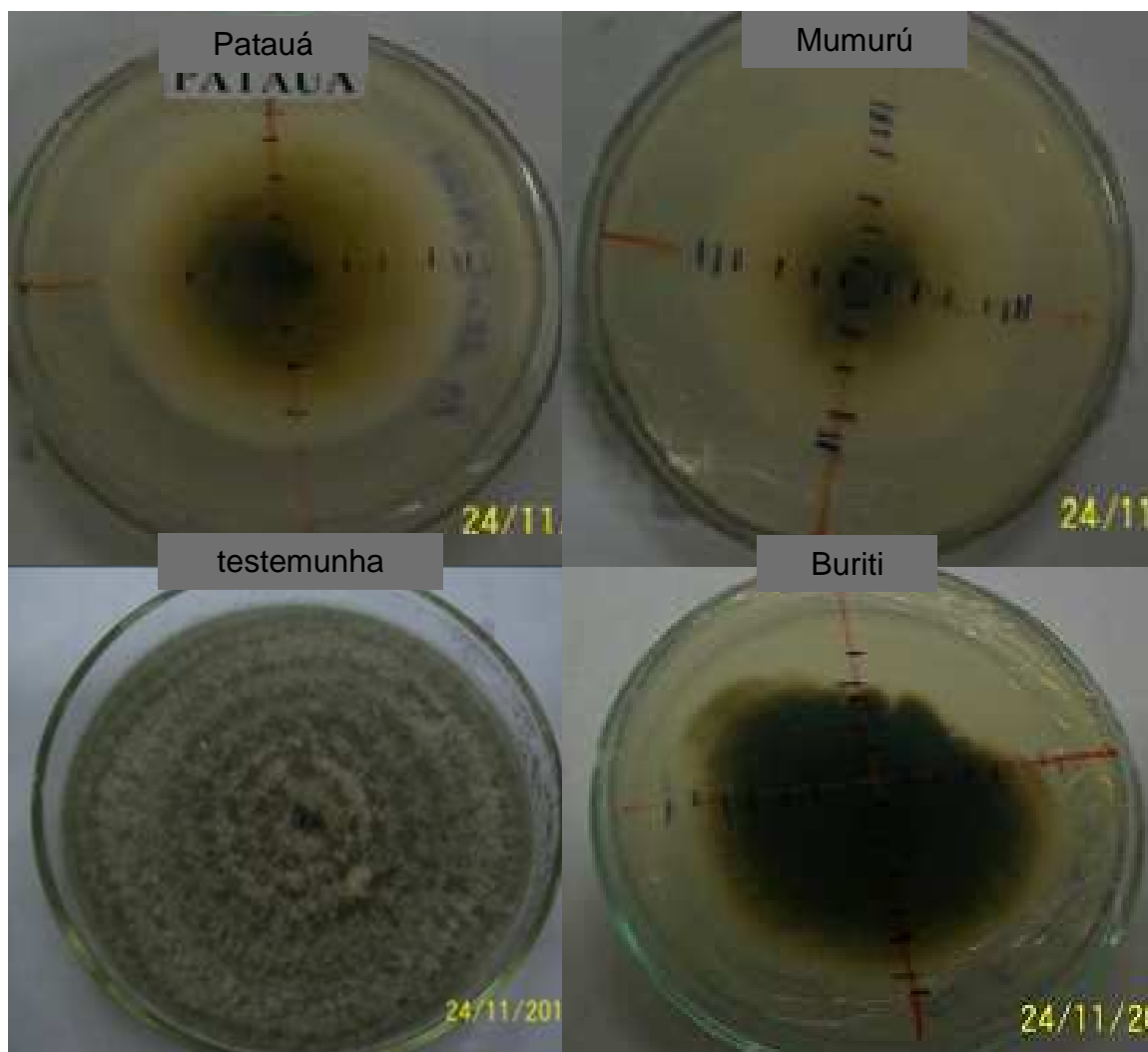


FIGURA 05: Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* evidenciando comportamentos dos óleos essenciais comparados à testemunha em meio de cultura MEA 2%.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido concluiu-se que a temperatura ideal para o crescimento do patógeno *C. gloeosporioides* isolados de mudas de açaizeiro é de 25° a 30°C. Os óleos essenciais de *Astrocaryum murumuru*, *Oenocarpus bataua* e *Mauritia flexuosa* nas concentrações de 15, 20 e 50µL/mL apresentaram efeito inibitório à *C. gloeosporioides*, destacando-se o óleo de buriti com maior efeito inibidor, identificado como uma possibilidade no biocontrole de antracnoses.

REFERÊNCIAS

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, S. B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, **29** (5): 555-557.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** (Sistema para análise de variância para dados balanceados). Lavras, UFLA, 1992, 79p.

FRANKE, I. L.; BERGO, C. L. AMARAL, E. F.; ARAÚJO, E. A. Aptidão Natural Para o Cultivo de Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart. e *Euterpe precatória* Mart.) no Estado do Acre. **Comunicado Técnico**, nº 142, EMBRAPA, 2001, p 1-5.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; LAU, D. Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da erva mate, de cinco regiões do estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, 38: p 67-75, 1999.

LEDO, A. S.; NUNES, A. M. L.; MENEZES, A. J. E. A.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L. **Doenças de Plantas no Trópico Úmido Brasileiro**. EMBRAPA, 2003, 305 p.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F.; JESUS, M. A.; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, n. 11, p. 1633-1635, 2008.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, 32 p.143-145, 2007.

SOUZA-JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P. MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, 22 (3): 77-83, 2009.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Efeito "In Vitro" do Extrato Aquoso de Nim (*Azadirachta indica*) e Alho (*Allium sativum* L.) em *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 4393-4396, nov. 2009.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N.K. Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. **Mycoscience**, v.49, p.215-219, 2008.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial Fungitóxico do Óleo Essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os Fungos Fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Acta Amazonica**, vol. 39, n. 1, p. 193-198, Manaus, 2009.