

# AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISES DE FUNGITOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

## EVALUATION *IN VITRO* OF DIFFERENT METHODS OF ANALYSIS FUNGITOXICITY OF ESSENTIAL OILS

Rúbia Borges Cruz SARMENTO-BRUM<sup>1</sup>; Gil Rodrigues dos SANTOS<sup>2</sup>;  
Henrique Guilhon de CASTRO<sup>2</sup>, Clebson Gomes GONÇALVES<sup>3</sup>;  
Carlos Henrique CARDON<sup>4</sup>; Evelynne Urzêdo LEÃO<sup>5</sup>; Renato de Almeida SARMENTO<sup>2</sup>.

1. Professora, Mestre, Ciências Agrárias e Biotecnológicas, Universidade Federal do Tocantins – UFT, Gurupi, TO, Brasil. binhabio@uft.edu.br; 2. Professor, Doutor, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFT, Gurupi, TO, Brasil. 3. Mestrando em Produção Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, MG, Brasil. 4. Graduando em Agronomia, UFT, Gurupi, TO, Brasil. 5. Doutoranda em Proteção de Plantas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

**RESUMO:** Os problemas ambientais causados por fungicidas sintéticos têm elevado as buscas por métodos alternativos de controle de doenças de plantas. Objetivou-se avaliar o efeito do óleo essencial de capim citronela, sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, em diferentes métodos de avaliação de fungitoxicidade *in vitro*. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com quatro repetições, onde os fatores foram compostos por quatro métodos de avaliação da fungitoxicidade *in vitro* do óleo essencial (óleo essencial diluído em Tween 80 (0,5%) e incorporado ao meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) ainda fundente; óleo essencial diluído em Tween 80 (0,5%) e distribuído na superfície do BDA; óleo essencial diluído em Tween 80 (0,5%) e distribuído em papel filtro fixado na superfície interna da tampa da placa de Petri; óleo essencial puro e distribuído na superfície do meio de cultura; e testemunha) e por cinco épocas de avaliação (2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação). Foram utilizados 0,25µL mL<sup>-1</sup> do óleo do capim citronela em todos os tratamentos. Dos tratamentos avaliados o uso do óleo puro distribuído na superfície do meio de cultura foi mais eficiente na redução do diâmetro micelial em todas as avaliações. Neste método a taxa de crescimento micelial foi de 9, 02 mm dia<sup>-1</sup>, atingindo na última época de avaliação 79,77 mm.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais. Crescimento micelial. *Cymbopogon nardus*. *Rhizoctonia solani*.

## INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais causados pelos fungicidas sintéticos usados na agricultura têm elevado as buscas por métodos alternativos, seguros, viáveis e eficientes no controle de fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2010).

Muitas plantas medicinais, aromáticas e condimentares apresentam propriedades antimicrobianas. Estas possuem maior biodegradabilidade, sendo, portanto, menos prejudiciais ao meio ambiente (OOTANI et al., 2011).

O capim citronela (*Cymbopogon nardus*) é uma planta muito utilizada na Indonésia como chá calmante e digestivo. Seu óleo essencial apresenta atividade repelente e ação bactericida e fungicida. Sua fungitoxicidade deve-se a presença de monoterpenos e sesquiterpenos. Segundo Oliveira et al. (2011), o capim citronela apresenta majoritariamente em sua composição química os compostos citronelal, geraniol e citronelol. Castro et al. (2010) apresentaram como compostos majoritários, estudando a mesma espécie de planta, o citronelol, geraniol e elemol. Os monoterpenos citronelal e geraniol atuam na defesa da planta, e

podem inibir o crescimento de fungos (CASTRO et al., 2007).

*Rhizoctonia solani* é um importante fitopatógeno habitante de solo que causa doenças em uma grande variedade de culturas em todo o mundo (TSAI et al., 2012). Dentre os sintomas provocados por este fitopatógeno, que pode variar entre as culturas, o tombamento é o mais comum (ABOELLI; MOHAMMED, 2011). Devido a complexidade do padrão de comportamento, como também dos constituintes bioquímicos dos fungos de solo, não há fungicidas eficazes contra *R. solani* em leguminosas (ANITHA; ARUN DAS, 2011). Assim, é importante buscar métodos alternativos para o manejo de doenças ocasionadas por esse fitopatógeno.

Vários autores demonstraram a eficiência de óleos essenciais de plantas na redução do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Porém, observa-se que não se tem adotado uma metodologia padrão, o que dificulta muitas vezes a comparação e discussão de resultados.

Santos et al. (2010a) observaram a ação do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*, diluído em Tween 80 e distribuído na superfície do meio de cultura, sobre os fungos *Alternaria* spp., *Botrytis*

spp., *Colletotrichum* spp. e *Fusarium* spp. e observaram redução significativa do diâmetro micelial dos fitopatógenos. Utilizando a técnica do papel de filtro fixada na superfície interna da tampa da placa de Petri, Lee et al. (2008) verificaram a fungitoxicidade dos compostos voláteis de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas da família Myrtaceae, sobre os fungos *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* e *Fusarium circinatum*. Ao utilizar o extrato de alho (*Allium sativum*) adicionado ao meio BDA ainda fundente, Santos et al. (2010b) observaram o efeito do extrato no crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* e verificaram uma redução significativa no seu desenvolvimento. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do óleo essencial do capim citronela, sobre o fungo *R. solani*, em diferentes métodos de avaliação de fungitoxicidade *in vitro*.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, na Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Gurupi. O fungo *Rhizoctonia solani* foi repicado de cultura armazenada na Coleção Micológica do Laboratório de Fitopatologia. Para a repicagem foram utilizadas placas de Petri de 90 x 15 mm com 20 mL de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). No centro da placa foi colocado um disco de BDA, de 0,6 cm de diâmetro, contendo micélio fúngico.

Para obtenção do óleo essencial, folhas de Citronela (*Cymbopogon nardus*) foram desidratadas à temperatura ambiente. A extração foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger. O sobrenadante foi coletado e armazenado em frasco estéril. Foi testada uma única concentração do óleo essencial ( $0,25\mu\text{L mL}^{-1}$ ).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com dois fatores (4 métodos x 5 épocas de avaliação). Os tratamentos foram: Método 1 (M1) – o óleo essencial foi diluído em Tween 80 (0,5%) e foi incorporado ao meio de cultura BDA ainda fundente; Método 2 (M2) – o óleo diluído em Tween 80 (0,5%) foi distribuído na superfície do meio de cultura com uma alça tipo Drigalsky; Método 3 (M3) – o óleo foi diluído em Tween 80 (0,5%) e distribuído em papel filtro qualitativo de 3 cm de diâmetro fixado na superfície interna da tampa da placa de Petri; Método 4 (M4) o óleo puro foi distribuído na superfície do meio de cultura com uma alça tipo Drigalsky.

Após a aplicação dos tratamentos, foi colocado no centro da placa um disco de 0,6 cm de diâmetro de BDA contendo o material fúngico. As placas foram vedadas com fita PVC, identificadas e armazenadas à temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas por medições do diâmetro micelial

(média de duas medidas diametralmente opostas) a cada 48 horas, a partir da instalação do experimento, perdurando até a quinta avaliação (dois, quatro, seis, oito e dez dias de incubação).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). No fator qualitativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, e no fator quantitativo foram ajustadas equações de regressão com base no teste “t” dos coeficientes a 5% de probabilidade e no coeficiente de determinação ( $r^2$ ). As análises foram realizadas por meio do sistema computacional SAEG (RIBEIRO JÚNIOR; MELO, 2008).

De acordo com os resultados (Tabela 1), em todos os tratamentos foram obtidos valores de crescimento micelial menores que a testemunha até a quarta avaliação (8 dias de incubação). De todos os métodos avaliados a utilização do óleo puro (M4) foi mais eficiente na redução do diâmetro micelial em todas as avaliações. No método em que o óleo diluído foi incorporado ao meio BDA ainda fundente (M1) o fungo apresentou um diâmetro micelial maior que nos outros métodos avaliados. Venturoso et al. (2010) avaliando a fungitoxicidade de extratos vegetais submetidos a diferentes formas de esterilização destacaram que a temperatura pode limitar a bioatividade do extrato vegetal, uma vez que o princípio ativo da planta pode ser termosensível. Ainda, Triana e González (2009), por meio do método de incorporação do óleo ao meio de cultura ainda fundente, observaram que o óleo de nim (*Azadirachta indica*) reduziu em 56% o crescimento micelial de *R. solani*.

Soylu et al. (2010) avaliaram o efeito volátil e de contato dos óleos de orégano (*Origanum syriacum* var. *bevanii*), lavanda (*Lavandula stoechas* var. *stoechas*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Botrytis cinerea*, e observaram que o efeito volátil foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial do patógeno. Nascimento et al. (2008) observaram o efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) puro e diluído em Tween 80, distribuídos na superfície do meio de cultura, sobre *Alternaria alternata*, e estes verificaram que a concentração de  $100\mu\text{g L}^{-1}$  do óleo puro e diluído em Tween 80 a 25, 50 e 75% não apresentaram diferença significativa na redução do diâmetro micelial do patógeno. Tyagi e Malik (2011) avaliando a fungitoxicidade do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sobre os fungos que causam deterioração de alimentos, observaram que o efeito volátil do óleo, no método do papel filtro, apresentou uma zona de inibição maior que o óleo no método de difusão em agar.

**Tabela 1.** Valores médios do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* submetido a 0,25µL mL<sup>-1</sup> de óleo essencial de Citronela, sob quatro métodos de avaliação de fungitoxicidade *in vitro* (M1 = óleo diluído e incorporado ao meio fundente; M2 = óleo diluído e distribuído na superfície do meio de cultura; M3 = óleo diluído e distribuído em papel filtro; M4 = óleo puro distribuído na superfície do meio de cultura), em cinco épocas de avaliação.

Métodos	Dias de incubação <sup>1</sup>				
	2	4	6	8	10
Testemunha	72,93	84,00	84,00	84,00	84,00
M1	12,81 <sup>a</sup>	31,04 <sup>a</sup>	50,07 <sup>a</sup>	71,30 <sup>a</sup>	84,00 <sup>a</sup>
M2	10,31 <sup>ab</sup>	27,58 <sup>b</sup>	45,28 <sup>b</sup>	65,34 <sup>b</sup>	84,00 <sup>a</sup>
M3	9,19 <sup>b</sup>	27,16 <sup>b</sup>	47,30 <sup>ab</sup>	70,37 <sup>a</sup>	84,00 <sup>a</sup>
M4	7,90 <sup>b</sup>	24,51 <sup>b</sup>	44,50 <sup>b</sup>	62,28 <sup>b</sup>	79,21 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P> 0,05).

Independente da metodologia aplicada, trabalhos abordando a fungitoxicidade de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o fungo *R. solani* mostram que a utilização dos óleos essenciais são promissores para o controle alternativo do patógeno. Benini et al. (2010) utilizaram o óleo puro distribuído na superfície do meio de cultura e observaram que alíquotas de 20, 40 e 60 µL do óleo essencial de alfavacão (*Ocimum gratissimum*) inibiram totalmente o crescimento micelial de *R. solani*.

Conforme as equações de regressão (Tabela 2), o Método 4 foi o mais eficiente na redução do crescimento micelial diário do fungo *R. solani*. Utilizando-se o Óleo Essencial Puro (M4) foi obtido na última época de avaliação valor significativamente menor que nos outros tratamentos (Tabela 1). Neste, observou-se uma taxa de crescimento micelial de 9,02 mm dia<sup>-1</sup> (Tabela 2), atingindo na última época de avaliação 79,77 mm.

**Tabela 2.** Equações de regressão e coeficiente de determinação do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* submetido a 0,25µL mL<sup>-1</sup> de óleo essencial de Citronela, sob quatro métodos de avaliação de fungitoxicidade *in vitro* (M1 = óleo diluído e incorporado ao meio fundente; M2 = óleo diluído e distribuído na superfície do meio de cultura; M3 = óleo diluído e distribuído em papel filtro; M4 = óleo puro distribuído na superfície do meio de cultura).

Métodos	Equações de regressão	r <sup>2</sup>
Testemunha	$\hat{y} = 81,79$	
M1	$\hat{y} = -4,95 + 9,13^{**}EA$	0,99
M2	$\hat{y} = -8,46 + 9,11^{**}EA$	0,99
M3	$\hat{y} = -10,24 + 9,64^{**}EA$	0,99
M4	$\hat{y} = -10,43 + 9,02^{**}EA$	0,99

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste "t"; EA: Épocas de Avaliação.

A variação do desenvolvimento do fungo quando submetido aos diferentes métodos de análise de fungitoxicidade *in vitro* revela que é possível fazer comparações com outros estudos em que foi utilizado um método diferente. Cabe ao pesquisador selecionar o método que seja mais viável a sua realidade de trabalho ou que facilite o desenvolvimento do seu experimento.

É importante ressaltar que para estudos que objetivam testes *in vivo*, a metodologia utilizada *in vitro* deve se aproximar de sua aplicabilidade mais viável na cultura. Carnellosi et al. (2009) avaliaram a ação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. Os

autores realizaram testes *in vitro*, com a distribuição do óleo essencial na superfície do meio de cultura, e testes *in vivo*, em que o óleo foi aplicado no fruto. Abdolahi et al. (2010) usaram metodologias de contato tanto para o ensaio *in vitro*, em que os óleos essenciais das plantas ajovan (*Carum copticum*), funcho (*Foeniculum vulgare*) e alcarávia (*Carum carvi*) foram incorporados ao meio de cultura, quanto para o ensaio *in vivo*, em que os óleos foram pulverizados em tomates para o controle de *Penicillium digitatum* e *A. alternata*.

A metodologia utilizada em um experimento deve estar de acordo com os objetivos da pesquisa. A comparação de resultados, independente do método utilizado, é importante para

o desenvolvimento do controle alternativo de doenças de plantas por óleos essenciais de plantas medicinais. Verificou-se variações no diâmetro micelial médio do fungo *R. solani* quando submetido aos métodos de avaliações de

fungitoxicidade *in vitro* do óleo essencial de capim citronela. O óleo essencial puro distribuído na superfície do meio de cultura foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *R. solani*.

---

**ABSTRACT:** Environmental problems caused by synthetic fungicides have increased the search for alternative methods of control of plant diseases. The objective was to evaluate the effect of essential oil of citronella grass, on the fungus *Rhizoctonia solani*, in different methods of *in vitro* fungitoxicity. We used a randomized design in a factorial design with four replications, where the factors were composed of four methods for assessing the *in vitro* fungitoxicity of the essential oil of citronella grass (essential oil diluted in Tween 80 (0.5%) and embedded in the culture medium PDA (potato dextrose agar) still melting, essential oil diluted in Tween 80 (0.5%) and distributed on the surface of the PDA; oil essential diluted in Tween 80 (0.5%) and distributed on filter paper attached to the inner surface of the lid of the Petri dish, pure essential oil and distributed on the surface of the culture medium, and control) and five evaluation periods (2, 4, 6, 8 and 10 days of incubation). Was used 0.25 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> of citronella oil in all treatments. Of the treatments evaluated the use of pure oil distributed on the surface of the culture medium was more effective in reducing the mycelial diameter in all evaluations. In this method the rate of mycelial growth was 9,02 mm day<sup>-1</sup>, reaching in last evaluation 79,77 mm.

**KEYWORDS:** Medicinal plants. Mycelial growth. *Cymbopogon nardus*. *Rhizoctonia solani*.

---

## REFERÊNCIAS

- ABDOLAH, A.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; JAVADI, T.; MESHKATALSADAT, M. H. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 30, p. 341–352, mai. 2010.
- ABOELLI, A. H.; MOHAMMED, N. M. Effect of some chemicals on growth, melanogenesis, pathogenicity and metabolic activities of *Rhizoctonia solani*. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 10, p. 143-152, out. 2011.
- ANITHA, A.; ARUN DAS, M. Activation of rice plant growth against *Rhizoctonia solani* using *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* and Salicylic Acid. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 07-12, 2011.
- 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**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 677-683, out./dez. 2010.
- CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.4, p. 399-406, abr. 2009.
- CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, mai. 2007.
- CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2 p. 308-314, abr./jun. 2010.
- LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, II. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 23-28, jan. 2008.
- NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; LIMA, R. K.; SALGADO, A. S. P.; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80

sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3; p. 503-508, 2008.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 8-16, out. 2011.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W. S.; MELLO, A. V.; DIDONET, J.; PORTELLA, A. C. F.; NASCIMENTO, I. R. Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 609-618, jul/ago. 2011.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; MELO, A. L. P. **Guia Prático para Utilização do SAEG**. Viçosa: Folha. 2008. 288p.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYANA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 154-159, abr./mai. 2010a.

SANTOS, M. B.; SANTOS, C. Y.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. R. S.; SANT'ANNA, H. L. S.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. Efeito inibitório *in vitro* de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 13-17, out. 2010b.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 70-77, mar./abr. 2010.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 143, p. 183-189, ago. 2010.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, Guildford, v. 22, p. 1707-1714, abr. 2011.

TRIANA, A. C.; GONZÁLEZ, D. R. Efecto Del OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). **Fitosanidad**, La Habana, v. 13, n. 4, p. 271-276, dez. 2009.

TSAI, Y.; LIN, M.; KO, W. A simple method for production of uniform inoculums of *Rhizoctonia solani* with strong pathogenicity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 85-88, ago. 2012.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; CONUS, L. A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 499-505, mai. 2010.