

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE FITOPATÓGENOS

Elaine Cristina P. de Oliveira, CNPq/EMBRAPA, ecp.oliveira@yahoo.com.br

Osmar Alves Lameira, Lab. Biotecnologia /EMBRAPA, osmar@cpatu.embrapa.br

Sueny Kelly Santos de França, Graduanda UFRA, suenykelly@hotmail.com

Rosemary Corrêa da Costa, Mestranda UFRA, rosecorreacosta@yahoo.com.br

RESUMO: Entre as inúmeras espécies vegetais da flora brasileira com ação medicinal e que apresentam substâncias químicas biologicamente ativas, cita-se o gênero *Copaifera*, compreendendo diversas espécies produtoras de um óleo-resina extraído do tronco das árvores de grande porte, que podem atingir até 40 m de altura.). Dentre as inúmeras espécies que compõem o gênero *Copaifera*, está a *Copaifera reticulata* Ducke, encontrada principalmente na Amazônia e na região nordeste do Brasil. No que se refere à constituição química das espécies de *Copaifera*, observa-se em todas, a presença de diterpenos como o ácido copálico e de sesquiterpenos como beta-bisaboleno e beta-cariofileno, efetivos contra fungos. o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke em diferentes concentrações no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos, dos gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Phytophthora*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras de óleo de copaíba utilizadas nos testes foram procedentes da Floresta Nacional do Tapajós - FLONA, no quilômetro 67, localizada no município de Belterra, Pará. Para esta análise foram utilizados óleos provenientes de coleta realizada no verão, em outubro de 2008. As espécies fúngicas utilizadas foram: *Phomopsis sp.*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora sp.*, todas obtidas da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Os resultados mostraram que todas as concentrações utilizadas no controle da inibição micelial do fitopatógeno *Phytophthora sp.* mostraram-se eficientes em relação à testemunha, sendo a concentração de 750 µL a de maior poder inibitório. O fitopatógeno *C. gloeosporioides* foi inibido eficientemente em todas as concentrações. Já para o fungo *Phomopsis sp.* as concentrações utilizadas apresentaram eficiência, porém inferiores se comparadas com os dois outros fungos avaliados.

PALAVRAS CHAVE: Óleo, Fitopatógenos, Controle biológico, Concentrações.

INTRODUÇÃO

Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies animais e vegetais que a compõem e suas relações filogenéticas, seus microorganismos e suas interações com outros seres ainda são pouco conhecidos (Souza et al., 2004).

Desde que o homem começou a cultivar plantas para sua alimentação, deu-se início um processo de desequilíbrio no ambiente de cultivo, que de certa forma favorece o surgimento de pragas e doenças (Innecco, 2006). De uma maneira geral, as doenças causadas por fitopatógenos são provocadas principalmente por fungos, bactérias, nematóides e vírus, que além de provocarem perdas nas fases de pré e pós-colheita, depreciam a qualidade dos frutos, prejudicando a sua aparência e/ou alterando suas características físicas e químicas (Junqueira et al., 2006).

Na composição química das plantas medicinais, as substâncias denominadas metabólitos secundários podem atuar nas interações entre a espécie vegetal e o fitopatógeno, como ativador do sistema defensor da planta hospedeira ou diretamente contra os patógenos fúngicos. Os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais com bioatividade contra fungos geralmente apresentam caráter atóxico para humanos e animais, maior ação fungitóxica e menor fitotoxicidade quando comparados com os fungicidas sintéticos (Santos, 2003). Por outro lado, plantas medicinais têm sido vistas como fonte de substâncias fungitóxicas (Bonaldo et al., 1998), as quais, quando comparadas com fungicidas sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o meio ambiente, podendo, em alguns casos, até superá-los em sua ação fungicida.

Entre as inúmeras espécies vegetais da flora brasileira com ação medicinal e que apresentam substâncias químicas biologicamente ativas, cita-se o gênero *Copaifera*, compreendendo diversas espécies produtoras de um óleo-resina extraído do tronco das árvores de grande porte, que podem atingir até 40 m de altura (Veiga Júnior e Pinto, 2002). Dentre as inúmeras espécies que compõem o gênero *Copaifera*, está a *Copaifera reticulata* Ducke, encontrada principalmente na Amazônia e na região nordeste do Brasil.

Alguns trabalhos descrevem os sesquiterpenos, principalmente os lactônicos, extraídos de óleos essenciais, como metabólitos secundários que apresentam atividade fungitóxica reconhecida. No que se refere à constituição química das espécies de *Copaifera*, observa-se em todas a presença de diterpenos como o ácido copálico e de sesquiterpenos como beta-bisaboleno e beta-cariofileno, efetivos contra fungos (Pinto et al., 2000; Tappin et al., 2004).

Outros fungos prejudiciais à agricultura, como, por exemplo, as espécies *Phomopsis sp.*, isolada da cultura do bacuri, *Colletotrichum gloeosporioides*, isolada da cultura da pimenta de cheiro e *Phytophthora sp.*, isolada da cultura do mamão, causam danos consideráveis aos vegetais (Webster; Gunell, 1992), necessitando, assim, de um controle biológico extremamente eficaz e que seja inofensivo ao meio ambiente.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke em diferentes concentrações no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos, dos gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Phytophthora*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras de óleo de copaíba utilizadas nos testes foram procedentes da Floresta Nacional do Tapajós - FLONA, no quilômetro 67, localizada no município de Belterra, Pará. Para esta análise foram utilizados óleos provenientes de coleta realizada no verão, em outubro de 2008. (Figura 1).



Fig. 1. Coleta do óleo de copaíba na FLONA no verão.

As espécies fúngicas utilizadas foram: *Phomopsis sp.*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora sp.*, todas obtidas da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental conservadas pelo método de Castelani e/ou provenientes de culturas recentes desprovidas de contaminação.

Para crescimento micelial, os patógenos foram cultivados em meio de cultura BDA (batata, destrose e agar). A seleção do meio de cultura BDA foi motivada para a melhor produção de esporos para os fitopatógenos que o mesmo promove.

Discos de 2 mm dos fungos obtidos a partir de cultivos conservados pelo método de Castelani e/ou de cultivos recentes desprovidos de contaminação, foram repicados para placas de petri contendo meio BDA sintético previamente fundido, autoclavados a 120°C, por 20 minutos e um atm de pressão. Em seguida cultivados por 07 dias à temperatura de 25°C.

Após o tempo de cultivo foram retirados discos do micélio do fitopatógeno contendo 2 mm e inoculados placas contendo meio BDA sintético previamente fundido contendo as três diluições do óleo-resina de *C. reticulata*. A diluição do óleo-resina de *C. reticulata* foi feita após o meio de cultura ser autoclavado a 120°C por 20 minutos e um atm de pressão e espera até a temperatura de 47°C aproximadamente, para então ser adicionado o óleo-resina. Nas avaliações do crescimento micelial *in vitro* foi utilizada régua milimetrada, onde foi determinado o diâmetro médio (cm) das colônias (média de duas medidas opostas). As avaliações foram realizadas com três a cinco dias de cultivo *in vitro*, de acordo com o crescimento da testemunha em placa, respeitando o comportamento de cada cultura.

A amostra utilizada na verificação da inibição fitopatogênica foi de óleo-resina puro de *C. reticulata* em três concentrações 250µL, 450µL e 750µl com cinco repetições cada e para fins comparativos os fungicidas derosal para os fitopatógenos *Phomopsis sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides* e ridomil para *Phytophthora sp.* nas concentrações de 10ppm. Como testemunha foi utilizado apenas 100 mL do meio BDA sintético contendo disco micelial de 2 mm do fitopatógeno.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial contendo três espécies fitopatógenas x três concentrações de óleo de copaíba e cinco repetições. A análise estatística foi feita através da análise de variação, comparando as medidas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR.

RESULTADOS

A análise de variância da atividade antifúngica do óleo-resina de *Copaifera reticulata* para os fitopatógenos *Phomopsis sp.*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora sp.* são apresentados na Tabela 1. Foi observado que todas as concentrações utilizadas no controle da inibição micelial dos fitopatógenos mostraram-se eficientes em relação à testemunha.

Tabela 1. Crescimento (cm) micelial *in vitro* de fitopatógenos em meio de cultura BDA sintético tratados com óleo-resina de *C. reticulata* coletado no verão.

Fitopatógenos	Concentração (µL)		
	250	450	750
Testemunha	9,00 c	9,00 c	9,00 c
<i>Phytophthora sp.</i>	3,25 a	3,42 a	3,22 a
<i>C. gloeosporioides</i>	4,15 a	3,80 a	3,25 a
<i>Phomopsis sp.</i>	7,87 b	6,57 b	6,25 b

Médias seguidas da mesma letra dentro da coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na tabela 1, observa-se que todas as concentrações utilizadas no controle da inibição micelial do fitopatógeno *Phytophthora sp.* mostraram-se eficientes em relação à testemunha, sendo a concentração de 750 µL a de maior poder inibitório (Fig. 2). O fitopatógeno *C. gloeosporioides* (Fig.3) foi inibido eficientemente em todas as concentrações, sendo também a concentração de 750 µL a de maior poder inibitório como observado na tabela 1. Já para o fungo *Phomopsis sp.* (Fig.4) as concentrações utilizadas apresentaram eficiência, porém inferiores se comparadas com os dois outros fungos avaliados.

Os resultados mostraram de uma maneira geral, que à medida que se aumentava a concentração do óleo-resina de *C. reticulata* a inibição do crescimento micelial *in vitro* era mais eficiente. Eficiência semelhante na inibição do crescimento micelial *in vitro* das mesmas espécies fúngicas tratadas nesse trabalho, foi obtida por Oliveira et al. (2006) quando utilizou óleo-resina da *Copaifera duckei*.

O uso do óleo-resina de *C. reticulata* por Oliveira (2004), de *A. sativum* por Chalfoun e Carvalho (1987) e de *C. longa* por Singh e Raí, (2000) demonstram que o uso de plantas consideradas medicinais tem sido eficiente na redução do crescimento micelial e germinação *in vitro* de escleródios de *M. phaseolina*.

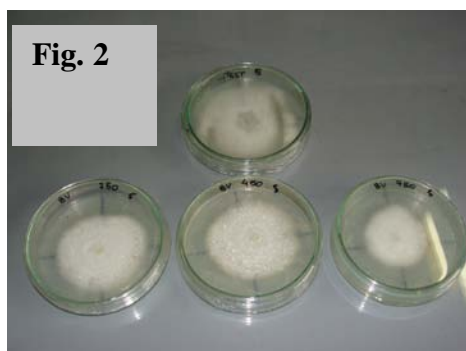


Fig. 2. Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Phytophthora sp.* em três concentrações de óleo de copaíba, comparando com a testemunha..

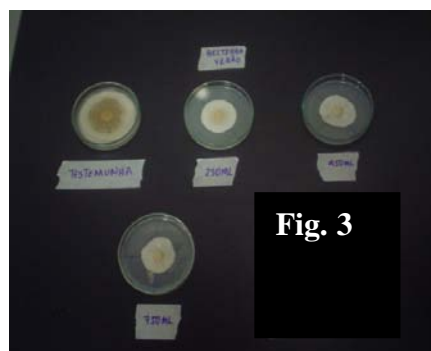


Fig. 3. Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* em três concentrações de óleo de copaíba, comparando com a testemunha..

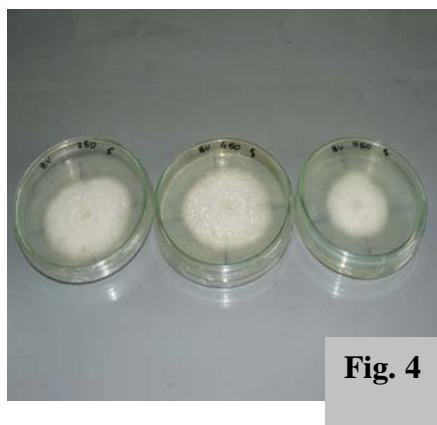


Fig. 4. Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Phomopsis sp.* em três concentrações de óleo de copaíba.

CONCLUSÕES

As concentrações utilizadas de *C. reticulata* Ducke na inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fitopatógenos são mais eficientes que a testemunha.

O fitopatógeno *Phytophthora sp.* apresenta maior sensibilidade aos efeitos fungicidas do óleo-resina de *C. reticulata*. Os resultados obtidos mostram que é possível

utilizar o óleo-resina de copaíba, para controle biológico do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio à pesquisa e pelas bolsas concedidas ao primeiro e quinto autor. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará – FAPESPA, pela iniciativa de apoiar as pesquisas científicas do Estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R. Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial de fungos patogênicos e na indução de fitoalexinas. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7, Maringá, 1998. **Resumos...** Maringá: EDUEM, 1998. p.548.

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234-235, 1987.

INNECCO, R. Uso de óleos essenciais como defensivo agrícola. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 98, Belém, 2006, **Palestras...**Embrapa: Belém, 2006, p. 158.

JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; BRAGA, M.F.; SILVA, D.G.P.da. Potencial de defensivos de origem vegetal e mineral para o controle de doenças em frutíferas tropicais. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 52, Belém, 2006, **Palestras...**Embrapa: Belém, 2006, p. 158.

OLIVEIRA, E.C.P. **Identificação da época de coleta do óleo de copaíba (*Copaifera spp*) no município de Mojú, PA e avaliação na inibição do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos.** Belém: UFRA, Dissertação. 2004a. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais).

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; POLTRONIERI, L.S. Avaliação do óleo de copaíba (*Copaifera* spp) na inibição do crescimento micelial in vitro de fitopatógenos. **Revista Ciências Agrárias**, n.45, jan/jun., 2006.

PINTO, J.E.B.P.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. **Compêndio de plantas medicinais**. UFLA/FAEPE. Lavras, 2000. 208p.

SANTOS, A.F.dos; BEZERRA, J.L.; TESSMANN, D.J.; POLTRONIERI, L.S. Ocorrência de *Curvularia senegalensis* em pupunheira e palmeira real no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v 28(2), p.204. 2003.

SINGH, R. & RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Micróbios**. 102:165-173. 2000.

SOUZA, A. Q. L. de.; SOUZA, A. D. L. de.; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M. de.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n.2, p.185, 2004.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2004.

VEIGA Junior, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25. n.2. p.273-286, 2002.

WEBSTER, R.K.; GUNELL, P.S. **Compendium of rice diseases**. St. Paul: APS, 1992, 62p.