

Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*

GONÇALVES, A.H.¹; PEREIRA, A.S.¹; SANTOS, G.R.S.¹; GUIMARÃES, L.G.L.^{2*}

¹Universidade Federal do Tocantins, Campus de Universitário de Gurupi, Rua Badejós, s/n, CEP: 77.402-970, Gurupi-TO, Brasil. ²Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dom Bosco, Departamento de Ciências Naturais, Praça Dom Helvécio, 74, CEP: 36.301-160, São João Del Rei-MG, Brasil, *Autor para correspondência: lguimaraes@ufs.edu.br

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial fungitóxicos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Lippia sidoides*, e de seus constituintes majoritários, sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. A caracterização química do óleo de *L. sidoides* demonstrou a presença do carvacrol (33,27%) e o 1,8-cineol (24,41%) como seus componentes majoritários. Enquanto que o citral (77,6%) foi o constituinte majoritário do óleo essencial de *C. citratus*. A avaliação do potencial fungitóxico dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários foi realizada por meio de ensaios *in vitro*, avaliando a inibição do crescimento micelial dos microrganismos. Ambos os óleos essenciais inibiram totalmente o crescimento micelial de *R. solani* na concentração de 400 µg mL⁻¹. O crescimento micelial de *S. rolfsii* foi inibido pelo óleo essencial de *C. citratus* na concentração de 300 µg mL⁻¹ e pelo óleo essencial de *L. sidoides* na concentração de 400 µg mL⁻¹. Em relação aos constituintes majoritários, o 1,8-cineol não apresentou efeito fungitóxico nas concentrações avaliadas. No entanto, o carvacrol e o citral foram mais efetivos que os óleos essenciais havendo ausência de crescimento micelial de *R. solani* e de *S. rolfsii* nas concentrações de 200 µg mL⁻¹ e 225 µg mL⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., carvacrol, citral, controle alternativo.

ABSTRACT: Fungitoxicity *in vitro* of essential oils from *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. and their major constituents in the control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. The objective of this study was to evaluate the fungitoxic potentials of the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Lippia sidoides*, and of its major constituents, on the mycelial growth of phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. The chemical characterization of *L. sidoides* oil showed the presence of carvacrol (33.27%) and of 1,8-cineole (24.41%) as its major components, whereas citral (77.6%) was the major constituent of *C. citratus* essential oil. The evaluation of the fungitoxic potential of the essential oils and of its major constituents was performed through *in vitro* assays, the microorganisms mycelial growth inhibition. Both essential oils totally inhibited the mycelial growth of *R. solani* at 400 µg mL⁻¹. Regarding the major constituents, the 1,8-cineole did not show fungitoxic effect at the concentrations evaluated. However, the carvacrol and the citral were more effective than the essential oils and there was no mycelial growth of *R. solani* and of *S. rolfsii* at the concentrations of 200 µg mL⁻¹ and 225 µg mL⁻¹, respectively.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., carvacrol, citral, alternative control.

INTRODUÇÃO

No Brasil o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos alimentos mais populares fazendo parte da dieta alimentar de toda a população. É um alimento que possui propriedades

nutricionais e funcionais capazes de atender muitas necessidades básicas da alimentação humana destacando-se, principalmente, como fonte proteica. No entanto, seu cultivo apresenta sérios problemas

Recebido para publicação em 11/12/2014

Aceito para publicação em 17/04/2015

10.1590/1983-084X/14_166

fitossanitários que limitam sua produtividade, sendo importante, neste contexto, as pragas e doenças.

Apodridão radicular causada por *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn pode matar a planta antes da formação das vagens provocando redução de até 100% no rendimento de grãos (Casa et al., 2011). Já a podridão do colo, outra doença muito comum no feijoeiro, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., ocorre em regiões de clima tropical e subtropical, em condições de temperatura e umidade relativa do ar elevadas e seguidas por períodos secos (Blum et al., 2003).

Pesquisadores têm estudado os efeitos de extratos e de óleos essenciais de plantas no controle de pragas e doenças que acometem as culturas. Trabalhos têm demonstrado o potencial dos óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos como *Alternaria solani*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum musae*, *Corynespora cassiicola*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Pseudocercospora griseola*, dentre outros (Balbi-peña et al., 2006; Almeida et al., 2006; Abdolahi et al., 2010; Carlos et al., 2010; Martins et al., 2010; Hojos et al., 2012).

As plantas medicinais *Lippia sidoides* Cham. e *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf, conhecidas como alecrim-pimenta e capim-limão, respectivamente, se destacam por apresentarem altos teores de óleo essencial em suas folhas. O óleo essencial de *L. sidoides* geralmente possui como constituinte principal o timol (Fontenelle et al., 2007). Diversos trabalhos demonstram seus efeitos antibacteriano (Botelho et al., 2007), fungicida (Fontenelle et al., 2007; Silva et al., 2011), larvicida (Furtado et al., 2005; Souza et al., 2011) e antimicrobiano (Silva et al., 2008). Já a espécie *C. citratus* produz um óleo essencial rico em citral, sendo que estudos têm atribuído atividades biológicas para o mesmo, tais como: inseticida (Lima et al., 2008), antimicrobiana (Santos et al., 2009), antibacteriano (Pereira et al., 2004), antifúngica (Guimarães et al., 2011), entre outras.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente e avaliar o efeito dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *C. citratus* e de seus constituintes majoritários no controle de *R. solani* e *S. rolfsii*, patógenos de solo que acometem o feijoeiro comum.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e extração dos óleos essenciais

As folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham. – Verbenaceae) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. – Poaceae) foram coletadas no mês de janeiro de 2011, no

município de Itumirim, Minas Gerais, Brasil. A espécie *L. sidoides* foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA, estando sua exsicata registrada no Herbário ESAL localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com número de registro 01943.

A extração dos óleos essenciais foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. As folhas frescas de cada espécie vegetal foram picadas e colocadas em balão de fundo redondo de 4 litros de capacidade, recobertas com água, sendo o processo de extração realizado em período de 2 horas mantendo a solução em ebulição. O hidrolato coletado foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 900 x g por cinco minutos; posteriormente, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar baixa temperatura e ao abrigo da luz.

Análises cromatográficas dos óleos essenciais

As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Thermo DSQ II, sendo o equipamento operado nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida DB-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) (Folsom, CA, USA); com a seguinte programação da temperatura na coluna: 60 – 240 °C (3 °C min⁻¹); temperatura do injetor: 250 °C; gás carreador hélio; injeção com taxa de split (20:1) com volume injetado de 2 µL de uma solução 1:1000 em hexano. O espectrômetro de massas (EM), foi operado nas seguintes condições: energia de impacto de 70 eV; temperatura da fonte de íons e da interface: 200 °C. Foi injetada, nas mesmas condições das amostras, uma série homóloga de n-alcenos (C₉H₂₀ C₂₆H₅₄).

Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice de retenção calculado para cada constituinte, foi comparado com o tabelado, de acordo com Adams (2007). As análises quantitativas foram realizadas utilizando cromatógrafo gasoso Focus equipado com detector de ionização de chamas (DIC), operado em condições similares aquelas do CG-EM, exceto o gás de arraste, sendo utilizado o nitrogênio.

Obtenção dos isolados

Os isolados de *R. solani* foram obtidos de plantas de feijão com sintomas típicos de “mela” apresentando folhas com teia micelial, manchas necróticas grandes de formato irregular e borda escura. Ao microscópico ótico, foi possível verificar micélio sem formação de esporos, hifas septadas grossas em ângulo de 90° com constrição e septo

próximos ao ponto de origem da ramificação. De acordo com Barnett & Hunter (1972), estas descrições permitem classificar os isolados como pertencentes à espécie *Rhizoctonia solani*. Já o *S. rolfsii* foi obtido de plantas com sintomas de murcha devido à podridão do colo do caule com presença de micélio claro e escleródios escuros formados na base sobre a superfície do solo. Ao microscópio ótico foi possível verificar micélio estéril com hifas septadas sem formação de esporos, típicos do fungo *Sclerotium rolfsii*, conforme descrição de Barnett & Hunter (1972).

Para o isolamento pequenos fragmentos de folhas e hastes lesionadas foram previamente imersos em soluções de álcool (50%) por 30 segundos e de hipoclorito de sódio (1,0%) por 40 segundos, e posteriormente lavados em água destilada estéril por três vezes e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). As placas de Petri foram incubadas a $22 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, sob luz fluorescente. Os fungos foram identificados por microscopia óptica de acordo com a caracterização de suas estruturas vegetativas. Nas placas de Petri apresentando isolados de *S. rolfsii*, foi possível verificar a formação de escleródios arredondados de coloração inicialmente claros e posteriormente marrons sobre o meio de cultura.

Ensaio de inibição do crescimento micelial

Foram avaliadas as atividades fungitóxicas dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. citratus*; de seus constituintes majoritários 1,8-cineol (Acrós - 99%), carvacrol (Aldrich - 98%) e citral (Aldrich, 95%), e dos fungicidas comerciais Vitavax®-Thiram 200 SC (carboxina, 200 g i.a. L⁻¹ e thiram, 200 g i.a. L⁻¹) e Opera® (piraclostrobina, 133 g i.a. L⁻¹ e epoxiconazol, 50 g i.a. L⁻¹) em diferentes concentrações, sobre o crescimento e/ou inibição micelial das culturas fúngicas.

Os óleos essenciais e seus constituintes majoritários foram diluídos em éter etílico em capela asséptica de fluxo laminar. Em seguida foram solubilizados em água destilada contendo leite em pó (10 mg mL⁻¹) como emulsificante. Posteriormente, a solução resultante foi incorporada ao meio de cultura BDA, previamente esterilizado e fundido a uma temperatura entre 45 - 50 °C, obtendo as concentrações adequadas para cada microrganismo (determinadas por ensaios prévios). Depois, transferiu-se 20 mL desta mistura (composto, leite em pó e BDA) para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, previamente esterilizadas. Após a solidificação, discos de aproximadamente 6 mm de diâmetros contendo micélios dos fungos (retirados de culturas com 7 dias em BDA) foram repicados para o centro das placas, as quais foram vedadas

com filme plástico e incubadas à temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 96 horas. Paralelamente, prepararam-se duas testemunhas; uma composta apenas do fitopatógeno e do meio de cultura (testemunha absoluta) e outra contendo BDA, éter etílico e leite em pó (testemunha relativa).

As concentrações utilizadas sobre o fitopatógeno *R. solani* foram de 25, 100, 200, 300 e 400 µg mL⁻¹ para o óleo essencial de *L. sidoides*; de 50, 75, 100, 150 e 200 µg mL⁻¹ para o carvacrol; de 50, 250, 500, 750 e 1000 µg mL⁻¹ para o 1,8-cineol; 100, 200, 300, 400 e 600 µg mL⁻¹ para o óleo essencial de *C. citratus* e de 25, 50, 100, 150 e 200 µg mL⁻¹ para o citral. Sobre o fitopatógeno *S. rolfsii* foram utilizadas as concentrações de 25, 100, 200, 300 e 400 µg mL⁻¹ para o óleo essencial de *L. sidoides*; de 25, 75, 125, 175 e 200 µg mL⁻¹ para o carvacrol; de 50, 250, 500, 750 e 1000 µg mL⁻¹ para o 1,8-cineol; 50, 100, 200, 275 e 300 µg mL⁻¹ para o óleo essencial de *C. citratus* e de 150, 175, 200, 225 e 250 µg mL⁻¹ para o citral.

Para a avaliação dos fungicidas comerciais, empregou-se a mesma metodologia, porém os mesmos foram diluídos apenas em água destilada, sendo a solução adicionada ao meio de cultura, de forma a obter as concentrações utilizadas, que foram de 1, 10, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹ para o Opera®, sobre os dois fitopatógenos; de 0,1, 1, 5, 10 e 15 µg mL⁻¹ do Vitavax®-Thiran sobre *S. rolfsii* e de 1, 5, 10, 15 e 25 µg mL⁻¹ deste mesmo composto sobre *R. solani*.

As medidas do crescimento micelial das culturas dos respectivos fungos foram realizadas quando as colônias fúngicas da testemunha absoluta atingiram toda a superfície do meio. Para tal, foram traçadas duas retas cruzadas pela placa de Petri passando pelo centro do disco de 6 mm. As leituras foram realizadas pelas medidas do diâmetro de crescimento das colônias. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada dosagem em relação à testemunha absoluta.

Os tratamentos foram dispostos de forma inteiramente casualizada, com três repetições e em esquema fatorial com arranjo de 7 x 5, sendo sete compostos e cinco concentrações. Foi feita a análise de regressão para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos em relação à concentração, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). A partir das equações de regressão foram calculados valores de IC₅₀.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *L. sidoides* e de *C. citratus*, seguidos pelos seus tempos de retenção, índices de retenção calculados e tabelados

e os seus teores encontram-se na (Tabela 1).
A análise da composição química do óleo

de *L. sidoides*, demonstrou a predominância de monoterpenos fenólicos (37,93%), acompanhada

TABELA 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais e os respectivos teores expressos em percentagem.

Compostos	TR ^a	IRC ^b	IRT ^c	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	
α-pineno		5,80	935	932	t	-
Sabineno		6,88	974	969	t	-
β-pineno		7,28	989	974	t	-
Mirceno		7,31	992	988	-	12,90
α-felandreno		7,93	1006	1002	0,11	-
α-terpineno		8,25	1018	1014	7,70	-
orto-cimeno		8,55	1026	1022	1,82	-
1,8-cineol		8,81	1033	1026	24,41	-
Z- β-ocimeno		9,25	1045	1032	-	0,30
γ-terpineno		9,71	1058	1054	5,28	-
cis-sabineno hidratado		10,18	1070	1065	1,43	-
Terpinoleno		10,89	1090	1086	0,37	-
6,7-epoximirceno		10,94	1091	1090	-	t
trans-sabineno hidratado		11,33	1102	1098	0,92	-
Linalol		11,26	1100	1095	-	1,09
Cis-para-met-2-en-1-ol		12,28	1124	1118	-	t
Ipsdienol		12,98	1141	1140	-	t
Citronelal		13,38	1151	1148	-	0,91
E-isocitral		13,79	1161	1177	-	1,01
Umbelulona		14,14	1169	1167	-	t
terpinen-4-ol		14,59	1180	1174	2,95	-
Z-isocitral		14,59	1180	1160	-	1,67
α-terpineol		15,21	1194	1186	0,83	-
Trans-carveol		15,74	1207	1215	-	t
Verbenona		15,76	1207	1204	0,22	-
Cis-carveol		16,17	1217	1226	-	0,23
Citronelol		16,52	1220	1223	t	0,25
Metil-éter-timol		16,64	1228	1232	3,45	-
Metil-éter-carvacrol		17,02	1237	1241	t	-
Neral		17,09	1238	1235	-	31,28
Geraniol		17,52	1248	1249	-	t
Geranial		18,42	1269	1264	0,18	46,32
Timol		19,24	1288	1289	0,40	-
2-undecanona		19,27	1291	1293	-	0,39
Carvacrol		19,72	1299	1298	33,27	-
timol acetato		21,55	1364	1355	0,22	-
Carvacrol acetato		22,35	1361	1365	0,59	-
α-copaeno		22,78	1371	1374	t	-
Geraniil acetato		22,97	1376	1379	-	0,43
β-bourboneno		23,12	1379	1387	t	-
β-elemeno		23,38	1386	1389	0,55	-
E-cariofileno		24,58	1414	1417	2,73	-
Trans-α-bergamoteno		25,18	1429	1432	t	-
α-humuleno		26,03	1450	1452	1,89	-
allo-aromadendrano		26,20	1454	1458	t	-
γ-muuroleno		26,83	1469	1478	t	-
germacreno D		27,06	1475	1484	0,83	-
Butil hidroxi anisol		27,21	1481	1488	t	-
Epi-cubenol		27,66	1490	1493	0,71	-

continua...

TABELA 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais e os respectivos teores expressos em porcentagem.

continuação...					
2-tridecanona	27,76	1492	1495	-	t
γ-cadineno	28,35	1507	1513	t	-
Cubebol	28,45	1509	1514	0,61	-
Hediculariol	29,75	1543	1546	0,25	0,15
Spatulenol	30,79	1569	1577	1,94	-
Óxido de cariofileno	30,99	1574	1582	0,13	-
Ledol	31,84	1596	1602	t	-
II epóxido humuleno	32,06	1602	1608	0,91	-
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5-alfa-ol	33,08	1629	1639	1,08	-
α-cadinol	33,77	1648	1652	0,81	-
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol	34,82	1676	1685	0,20	-
Grupos de compostos					
Hidrocarbonetos monoterpênicos				15,28	13,20
Monoterpenos oxigenados				30,94	83,58
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				6,64	-
Sesquiterpenos oxigenados				6,00	0,15
Monoterpenos fenólicos				37,93	-
Total identificado				96,79	96,93

^aTR = Tempo de retenção (minutos); ^bIRC = índice de retenção calculado em relação a n-alcenos de C₆-C₁₇, em uma coluna DB-5; ^cIRT = índice de retenção tabelado (Adams 2007); t = trace (<0.10%); Um traço (-) indica não detectado.

de monoterpenos oxigenados não fenólicos (30,94%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (15,28%). Comparativamente, para o óleo de *C. citratus* observou-se uma proporção elevada de monoterpenos oxigenados não fenólicos (83,58%) e a menor taxa de hidrocarbonetos monoterpênicos (13,20%). No óleo essencial de *L. sidoides* foram encontrados como constituintes majoritários o 1,8-cineol (24,41%) e o carvacrol (33,27%). Em relação ao óleo essencial *C. citratus* observou-se altos teores dos isômeros, geranial (46,32%) e neral (31,28%), sendo a mistura destes dois isômeros denominada de citral. A composição química para o óleo essencial de *C. citratus* encontra-se de acordo com a observada em vários estudos. Sacchetti et al. (2005) relataram a presença de 65 a 86% de citral no óleo essencial desta espécie. Guimarães et al. (2008) relataram a presença de neral (31,89%), geranial (37,42%) e mirceno (23,77%). Em estudos recentes, Aquino et al. (2014) encontraram teores de 43,69% de neral e 34,05% de geranial, valores semelhantes aos encontrados nesta trabalho.

Os resultados encontrados para a composição química do óleo essencial de *L. sidoides*, diverge dos resultados encontrados em diversos estudos, que demonstram a presença do timol como constituinte majoritário para o óleo essencial desta espécie. Como aqueles de Cavalcanti et al. (2004), Fontenelle et al. (2007) e Aquino et al. (2014), que encontraram teores de timol iguais 80,8%, 59,65% e 30,24%, respectivamente. Por outro lado, alguns estudos corroboram com a presença do carvacrol como constituinte majoritário do óleo essencial de *L.*

sidoides, como aqueles apresentados por Cavalcanti et al. (2010), que encontraram 46,09% de deste composto em acessos coletados em Poço Redondo (SE), Lima et al. (2011), constataram a presença do carvacrol (31,68%), p-cimeno (19,58%), 1,8-cineol (9,26%) e o γ-terpineno (9,21%) como constituintes majoritários do óleo essencial de plantas nativas da região de Itumirim, MG.

Esta variação pode estar associada a diversos fatores capazes de influenciar a produção e a composição química dos óleos essenciais. De acordo com Sangwan et al. (2001), as características genotípicas relacionadas com os fatores ambientais podem ser determinantes no controle biossintético dos metabólitos secundários, incluindo os óleos essenciais. Barros et al. (2009) afirmam que as condições climáticas podem influenciar as atividades enzimáticas em determinada espécie vegetal e, conseqüentemente, interferir na biossíntese de determinados metabólitos secundários. No entanto, apesar do óleo essencial de *L. sidoides* apresentar diferenças quantitativas e qualitativas dos resultados apresentados pela literatura para os óleos essenciais dessa mesma espécie coletada em outras regiões, não é possível afirmar se esta variação se deve a existência de quimiotipos ou a fatores ambientais, uma vez que elas foram coletadas em regiões geograficamente distintas, estando as plantas submetidas a fatores edafoclimáticos diferentes.

As atividades fungitóxicas do óleo essencial de *C. citratus* e do citral, sobre a inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *R. solani* e *S. rolfsii* estão apresentadas na (Figura 1).

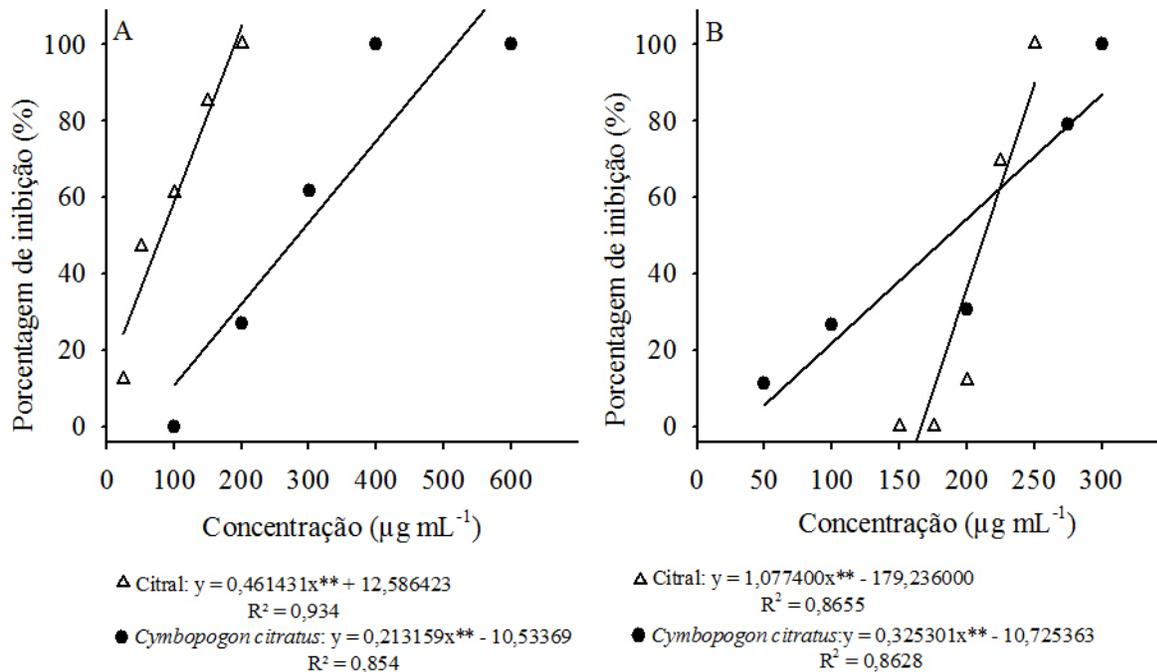


FIGURA 1. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e de seu constituinte majoritário sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (A) e *Sclerotium rolfsii* (B).

Observou-se diferença significativa para as diferentes concentrações de óleo essencial sobre a inibição do crescimento micelial dos microrganismos estudados. Em relação à testemunha relativa de cada microrganismo não houve diferença significativa entre seus crescimentos miceliais e os apresentados pelas testemunhas absolutas. De acordo com as análises estatísticas de regressão, as inibições dos crescimentos miceliais dos fitopatógenos *R. solani* e *S. rolfsii*, diante das concentrações do óleo essencial de *C. citratus* e do citral, apresentaram comportamento linear (Figura 1). Em relação ao *R. solani*, observou-se que o óleo essencial de *C. citratus* inibiu 100% de seu crescimento micelial na concentração a partir de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que, para o citral esta mesma inibição foi observada na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já sobre o *S. rolfsii*, o óleo essencial e o citral causaram 100% de inibição sobre o crescimento micelial nas concentrações de 300 e $225 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Observou-se que nas concentrações inferiores a $225 \mu\text{g mL}^{-1}$ o citral causou menor inibição sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii* quando comparado ao óleo essencial de *C. citratus*, ocorrendo o inverso a partir desta concentração.

Os efeitos do óleo essencial de *L. sidoides* e de seu constituinte majoritário, carvacrol, sobre a inibição micelial dos fitopatógenos estudados encontram-se na (Figura 2).

Em relação ao 1,8-cineol, um dos constituintes majoritários do óleo essencial de *L.*

sidoides, não foi observada atividade fungitóxica sobre a inibição micelial dos fitopatógenos *R. solani* e *S. rolfsii*, uma vez que a mesma foi igual a zero para ambos os fitopatógenos em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, Derbalah et al. (2012), citam este composto como sendo ativo no controle do *S. rolfsii* em ensaios *in vivo*. No entanto, tais autores não avaliaram o efeito do composto puro. O óleo essencial de *L. sidoides* quando na concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou inibição de 100 % sobre o crescimento micelial dos dois fitopatógenos estudados. O carvacrol se mostrou mais ativo, sendo capaz de causar esta mesma inibição quando presente nas concentrações de 200 e de $225 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre *R. solani* e *S. rolfsii*, respectivamente.

A inibição micelial dos fungicidas Vitavax®-Thiram e Opera®, que foi avaliada como referência para as atividades apresentadas pelos óleos essenciais e seus constituintes majoritários perante os dois fitopatógenos, é apresentada na (Figura 3). O *R. solani* teve seu crescimento micelial inibido em 100% pelo Vitavax®-Thiram na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que em relação ao Opera®, houve inibição próxima a 90% na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sobre o *S. rolfsii*, o Vitavax®-Thiram quando presente na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi capaz de inibir 100% de seu crescimento, e o Opera® na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou inibição próxima a 100%.

Os valores das concentrações dos óleos

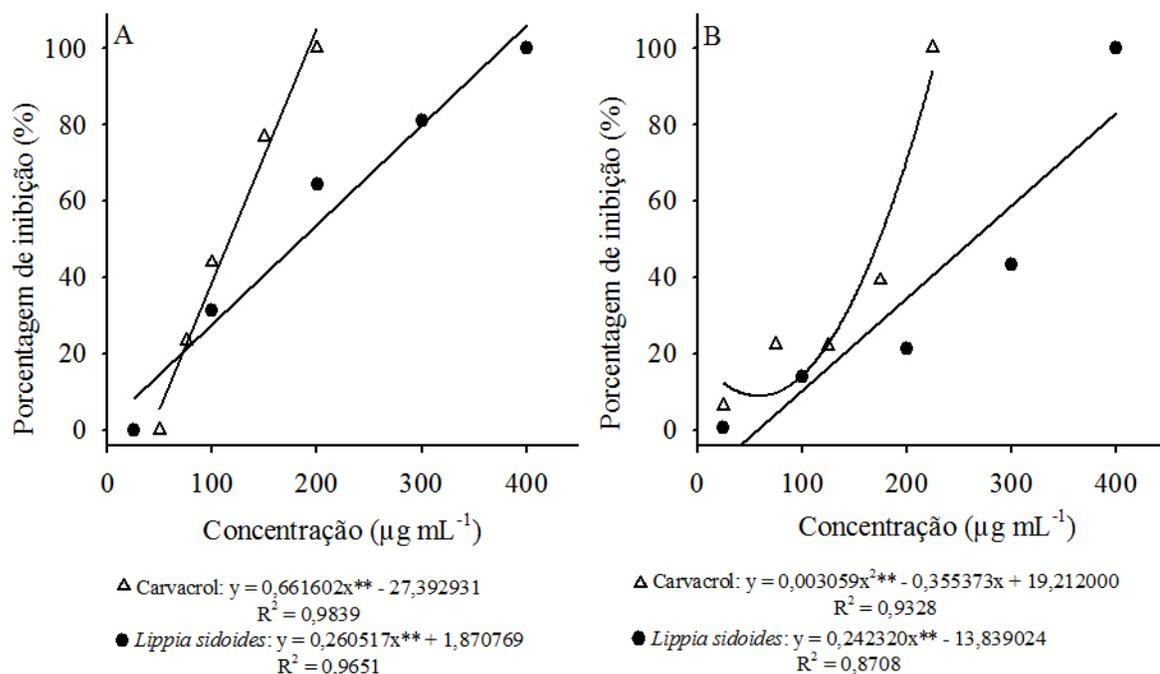


FIGURA 2. Efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* e de seu constituinte majoritário sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (A) e *Sclerotium rolfsii* (B).

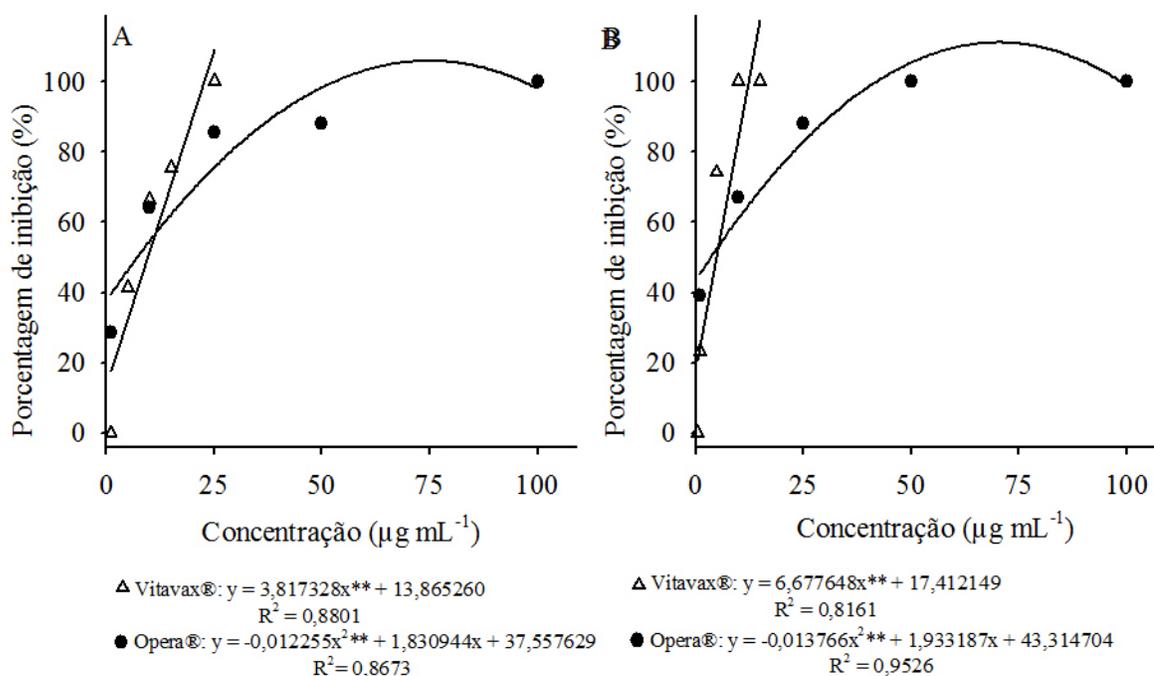


FIGURA 3. Efeito dos fungicidas Opera® e Vitavax®-Thiram sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (A) e *Sclerotium rolfsii* (B).

essenciais, de seus constituintes majoritários e dos fungicidas utilizados como referência, que inibiram em 50% (IC_{50}) o crescimento micelial de *R. solani* e *S. rolfsii* encontram-se na (Figura 4).

Os valores de IC_{50} evidenciam a ação dos constituintes majoritários em relação aos seus óleos essenciais, tais atividades demonstram que

estes constituintes estão relacionados ao efeito fungitóxico apresentado pelos óleos essenciais sobre o crescimento micelial dos microrganismos utilizados.

De acordo com estes resultados, a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* está relacionada diretamente com o citral. Observação

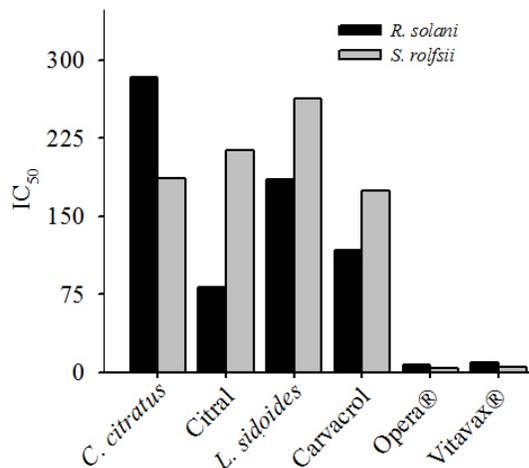


FIGURA 4. Valores de IC₅₀ para a inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* causada pelos compostos avaliados.

semelhante foi feita por Guimarães et al. (2011), que verificaram a inibição do crescimento micelial, do óleo essencial de *C. citratus* e o citral, sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*, com valores de IC₅₀ variando entre 75,0 e 162,18 µg mL⁻¹ para o óleo essencial e entre 58,24 a 126,97 µg mL⁻¹ para o citral.

Em relação às atividades apresentadas pelo óleo essencial de *L. sidoides*, resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2008), que demonstraram a eficiência do óleo essencial desta espécie, sobre a inibição dos crescimentos miceliais de *Aspergillus Niger*, *Penicillium* sp., e *Fusarium oxysporum*, uma vez que o mesmo foi eficiente no controle destes fitopatógenos na concentração de 3 x 10⁻¹ µL mL⁻¹. Estudos *in vivo*, realizados por Cruz et al. (2012), avaliando o efeito do óleo essencial de *L. sidoides* no controle da podridão peduncular em manga, observaram o efeito deste óleo sobre *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria dothidea*, por meio da inibição da formação de lesões.

Apesar da atividade fungitóxica de diversos óleos essenciais serem relatadas sobre os mais diversos microrganismos, pouco se sabe a respeito de seus mecanismos de ação. Trabalhos recentes, como o de Kumar et al. (2008) relatam que as atividades dos óleos essenciais e seus constituintes estão relacionadas com as suas hidrofobicidades, o que faz com os mesmos sejam capazes de interagirem com a camada lipídica das membranas celulares, causando alterações em suas estruturas e as tornando menos seletivas, podendo ocasionar o extravasamento de íons e outros constituintes

celulares. Tais afirmações podem ser comprovadas por trabalhos de Lucas et al. (2012), que demonstram alterações nas membranas de células bacterias, tais como perda de material eletro-denso, alterações no citoplasma e danos na parede celular, este causado pelo óleo essencial de *C. citratus*. Esse óleo essencial apresentou ação antifúngica sobre *Pseudocercospora griseola*, causando danos ultraestruturais nas células dos conídios, sendo observada condensação no citoplasma, fusão dos vacúolos, alterações na estrutura mitocondrial interna, lise de organelas membranosas, ruptura da membrana plasmática e da parede celular (Hojos et al., 2012).

Os resultados fungitóxicos encontrados para os óleos essenciais estudados, bem como de seus constituintes majoritários sobre a inibição do crescimento micelial de *R. solani* e *S. rolfsii*, demonstram o potencial dos mesmos no controle destes fitopatógenos. No entanto, faz-se necessário a realização de estudos *in vivo* para que se possa comprovar a efetividade dos mesmos no controle dos sintomas causados por estes fungos em plantas de feijoeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro e as bolsas concedidas, e ao Prof. José Guilherme Maia, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela realização das análises cromatográficas dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

- ABDOLAH, A. et al. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. **Journal of Food Safety**, v.30, n.2, p.341-352, 2010.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured, 2007. 800 p.
- ALMEIDA JR, G.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, Supl., p.638-641, 2006.
- AQUINO, C.F. et al. Composição química e atividade *in vitro* de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do Maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, supl.1, p.329-336, 2014.
- BALBI-PEÑA, M.I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina – II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p. 401-404, 2006.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minnesota: Burgess Publishing

- Company, 1972. 241p.
- BARROS, E.M.C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Brown (verbenaceae). **Química Nova**, v.32, n.4, p.861-867, 2009.
- BLUM, L.E.B. et al. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.1, p. 96-100, 2003.
- BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v.40, n.3, p.349-356, 2007.
- CARLOS, M.M. et al. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.309-316, 2010.
- CASA, R.T. et al. Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.10, n.1, p.37-43, 2011.
- CAVALCANTI, E.S.B. et al. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.5, p.541-544, 2004.
- CAVALCANTI, S.C.H. et al. Compositions and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 829-832, 2010.
- CRUZ, M.M. et al. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p.1-6, 2012.
- DERBALAH, A.S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against sugar beet damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. **Annals of Microbiology**, v.62, p.1021-1029, 2012.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FONTENELLE, R.O.S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.934-940, 2007.
- FURTADO, R.F. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.843-847, 2005.
- GUIMARÃES, L.G.L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, v.31, n.6, p.1476-1480, 2008.
- GUIMARÃES, L.G.L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.
- HOJOS, J.M.A. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência & Agrotecnologia**, v.36, n.3, p.270-284, 2012.
- KUMAR, A. et al. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.575-580, 2008.
- LIMA, R.K. et al. Composição dos óleos essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e do Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do efeito repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **Bio Assay**, v.3, n.8, p.1-6, 2008.
- LIMA, R.K. et al. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. And monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência & Agrotecnologia**, v.35, n.4, p.664-671, 2011.
- LUCAS, G.C. et al. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.3, p.351-359, 2012.
- MARTINS, J.A.S. et al. Avaliação do efeito do óleo essencial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v.27, n.1, p.49-51, 2010.
- OLIVEIRA, O.R. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Ciência Agronômica**, v.39, n.1, p.94-100, 2008.
- PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.
- SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, 2009.
- SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.621-632, 2005.
- SANGWAN, N.S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, n.1, p.3-21, 2001.
- SILVA, V.A. et al. Eficácia antifúngica dos extratos da *Lippia sidoides* Cham. e *Matricaria recutita* Linn. sobre leveduras do gênero *Candida*. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.5, n.1, p.18-23, 2011.
- SILVA, V.A. et al. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Lippia sidoides* Cham sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.4, p.7-11, 2008.
- SOUZA, W.M.A. et al. Atividade *in vitro* do extrato hidroalcolico de *Lippia sidoides* Cham sobre larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais (família Trichostrongylidae) de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.119-122, 2011.