

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera*) NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE FITOPATÓGENOS¹

Elaine Cristina Pacheco de OLIVEIRA²

Osmar Alves LAMEIRA³

Paulo Luiz Contente de BARROS⁴

Luiz Sebastião POLTRONIERE⁵

RESUMO: Na composição química das plantas medicinais, algumas substâncias podem atuar como ativadoras do sistema defensor da planta hospedeira ou contra os patógenos fúngicos. Na constituição química do óleo-resina das espécies de *Copaifera*, observou-se a presença de diterpenos e de sesquiterpenos, como -bisaboleno e -cariofileno, sendo o óxido desse último efetivo contra fungos. Alguns fungos prejudiciais à agricultura causam danos consideráveis aos vegetais, necessitando de um controle biológico eficaz e que seja inofensivo ao meio ambiente. O objetivo do trabalho é avaliar as atividades antifúngicas do óleo-resina de duas espécies de *Copaifera* no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos. Para crescimento micelial, os patógenos foram cultivados em meio de cultura BDA. As amostras utilizadas para a verificação da inibição fúngica foram óleos puros, sem nenhuma diluição prévia. Os óleos utilizados nos testes pertenciam às espécies *Copaifera reticulata* e *Copaifera duckei*. Para os testes antifúngicos foram utilizadas as espécies *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*. Para o fungo *Rizoctonia solani*, entre os tratamentos testados o óleo-resina das duas espécies de *Copaifera* foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial. O óleo-resina de *C. duckei* foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial dos fungos *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Copaifera*, *Rizoctonia Solani*, *Sclerotium Rolfsii*, Óleo-Resina, Fitopatogênico.

EVALUATION OF THE COPAIBA OIL (*Copaifera*) IN THE INHIBITION OF *IN VITRO* MICELIAL GROWTH PLANT PATHOGENS

ABSTRACT: In the chemical composition of the medicinal plants, some substances can act to activate the defensive system of the landlady plant or against pathogenic funguses. In the chemical constitution of the oil-resin plants like *Copaifera*, the presence of diterpenos and of sesquiterpenos was observed as b-bisaboleno and b-cariofileno, the oxide of the last one known to be effective against pathogenic

¹ Aprovado para publicação em 25.08.06

Parte da Dissertação apresentada pelo primeiro autor

² Bióloga, M.Sc., Bolsista da CAPES. E-mail: elainebiol@yahoo.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr. Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: osmar@cpatu.embrapa.br

⁴ Engenheiro Florestal, Dr. Professor da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém (PA).
E-mail:paulo.contente@ufra.edu.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA).
E-mail:poltroni@cpatu.embrapa.br

fungoses. Some pathogenic fungus to the agriculture cause considerable damages to the vegetables, needing a biological efficient control and harmless to the environment. The objective of this work was to determine the antifungal activities of two copaifera species on in vitro micelial growth of plant pathogens. The plant pathogens were cultivated in BDA culture to determine micelial growth. The control plots were pure oils without any dilution. The oils used were collected from *Copaifera reticulata* and *Copaifera duckei*. Fungus species *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina* were used for the determination of antifungal activities. The oil-resin of the two copaifera species were the most efficient in the inhibition of micelial growth of *Rizoctonia solani* whereas the oil-resin of *C. duckei* was the most efficient in the inhibition of micelial growth of the fungus *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*.

INDEX TERMS: *Copaifera*, *Rhizoctonia Solani*, *Sclerotium Rolfsii*, Oil-Resin, Fitopatogens.

1 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).

Na composição química das plantas medicinais, as substâncias denominadas metabólitos secundários podem atuar nas interações entre a espécie vegetal e o fitopatogênio, 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, 1996). 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.

Silva et al. (1995) citam que algumas destas substâncias, que compõem os óleos essenciais sintetizadas pelas plantas medicinais, são utilizadas em seres humanos por possuírem propriedades antimicrobianas. Estes mesmos compostos secundários podem representar para a planta diversas funções importantes como nas interações planta planta (alelopatia), planta animal (antiherbivoria) e planta microorganismos patogênicos. Sob este último aspecto, tais compostos poderiam participar das respostas de defesa da planta

em um patossistema natural, ou seja, na planta que os produz ou em outros patossistemas, atuando como substâncias fungitóxicas à semelhança dos fungicidas sintéticos e por atuarem desta forma em seres humanos.

Alguns trabalhos descrevem os sesquiterpenos, principalmente os lactônicos, extraídos de óleos essenciais, como metabólitos secundários que apresentam atividade fungitóxica reconhecida. Neste contexto cita-se a pesquisa de Harborne (1994), que confirmou a ação fungitóxica dessas moléculas, demonstrando que 62% dos metabólitos testados apresentaram atividade inibitória parcial e que metade apresentou elevada atividade inibitória contra fungos patogênicos.

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 o -humuleno, e -selineno, -bisaboleno e -cariofileno, sendo o óxido desse último efetivo contra fungos (LANGENHEIM; FEIBERT, 1988; PINTO et al., 2000; TAPPIN et al., 2004).

Outros fungos prejudiciais à agricultura, como, por exemplo, as espécies *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophominia phaseolina*, causam danos consideráveis aos vegetais (WEBSTER; GUNELL, 1992), necessitando, assim, de um

controle biológico extremamente eficaz e que seja inofensivo ao meio ambiente.

Na literatura consultada, alguns trabalhos (CASCON et al., 2000; MIRANDA et al., 2000) demonstraram atividades antimicrobiana e antibacteriana do óleo resina de copaíba. Veiga Jr. e Pinto (2002) em seus estudos demonstraram maiores atividades bactericida e bacteriostática do óleo de *C. multijuga*, frente a *Streptococcus mutans*, enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida e a resina apresentou-se apenas bacteriostática. Nesse sentido, estudo direcionado para determinação da atividade antifúngica do óleo de copaíba é de suma importância, visando minimizar a ação de fitopatógenos. O objetivo do trabalho é de avaliar as atividades antifúngicas do óleo-resina de duas espécies de *Copaifera* no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos.

2 MATERIALE MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras de óleo de copaíba utilizadas nos testes foram procedentes do campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado no município de Mojú (PA). As espécies fúngicas utilizadas foram obtidas da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

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

Os patógenos foram cultivados em meio de cultura previamente fundidos. Após o meio de cultura ser retirado do autoclave e um pouco antes de ser fundido nas placas, o óleo-resina de copaíba e o controle (Dithane M 45) foram adicionados e homogeneizados ao meio de cultura. Em seguida, foram distribuídos em placas de Petri com dimensões de 9 cm de diâmetro e 1,8 cm de profundidade, o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os óleos utilizados nos testes foram extraídos das espécies *C. reticulata* e *C. duckei* procedentes da coleta do mês de outubro de 2003.

Para os testes antifúngicos foram utilizadas três espécies fitopatogênicas, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*. As amostras utilizadas para verificação da inibição fitopatogênica foram os óleos puros, sem nenhuma diluição prévia, e como controle foi utilizado o produto sintético Dithane M 45.

Na montagem dos experimentos, foram adicionados 250 µL do óleo de copaíba para

cada 100 mL de meio de cultura e no preparo do Dithane M 45 foi utilizada uma diluição de 10 ppm para cada 100 mL do meio. Cada placa continha 15 mL de meio. Para cada espécie de fungo foram utilizadas três placas de Petri contendo óleo de *C. duckei*, três placas contendo óleo de *C. reticulata*, quatro placas contendo Dithane M 45 e duas placas como testemunha. As placas de Petri foram colocadas em bancada sob temperatura ambiente.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial contendo doze tratamentos e três repetições. Na avaliação do crescimento micelial, foi utilizada uma régua milimetrada após sete dias de cultivo. A análise estatística foi feita através da análise de variação, comparando as médias pelo teste de Student-Newman-Keuls.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância da atividade antifúngica do óleo-resina de *Copaifera* para os fitopatógenos, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* são apresentados na Tabela 1. Houve diferença significativa apenas na interação tratamentos e espécies fúngicas. Na Tabela 2, são apresentados os resultados do efeito do óleo-resina da *Copaifera* e do Dithane M 45 no comprimento micelial das espécies fúngicas.

Tabela 1-Resumo da análise de variância da avaliação do óleo-resina de *Copaifera* na inibição do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	50 681111	16 293704	24 719 ^{ns}
Fungos	2	7 980000	3 990000	20 009 ^{ns}
Trat. X Fungos	6	4 320556	0 720093	3 611*
Erro	24	4 785833	0 199410	
Total	35	67 767500		
C.V (%)	5 88			
Erro padrão	0,2657			

ns – não significativo * significativo ao nível de 5%

Tabela 2 - Efeito do óleo-resina de espécies de *Copaifera* e do Dithane M 45 na avaliação da inibição do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos.

Tratamento	Comprimento micelial (cm)		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
<i>C. dukei</i>	5,50 a	6,66 a	5,83 a
<i>C. reticulata</i>	5,83 a	8,26 b	6,66 b
Dithane M 45	8,62 b	9,00 b	9,00 c
Testemunha	8,00 b	8,75 b	8,50 c

Médias seguidas da mesma letra dentro das colunas não diferem entre si pelo teste de Student – Newman - Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

Para o fungo da espécie *Rhizoctonia solani*, entre os tratamentos testados os óleo-resinas das duas espécies de *Copaifera* foram o mais eficientes, induzindo maior inibição

no crescimento micelial do fungo (Figura 1). Entretanto, não houve diferença significativa entre as espécies testadas.

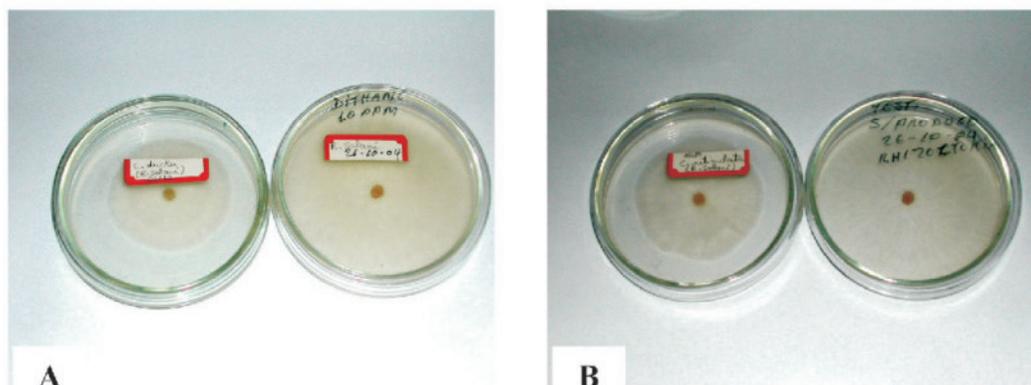


Figura 1-Inibição do crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia solani* por óleo-resina de *Copaifera*. A - *C. duckei* e Dithane M 45; B - *C. reticulata* e Dithane M 45.

O óleo-resina de *C. duckei* foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial do fungo *Sclerotium rolfsii* (Figura 2). Embora o óleo-resina de *C. reticulata* tenha apresentado maior inibição no crescimento micelial do fungo, não diferiu significativamente dos demais tratamentos.

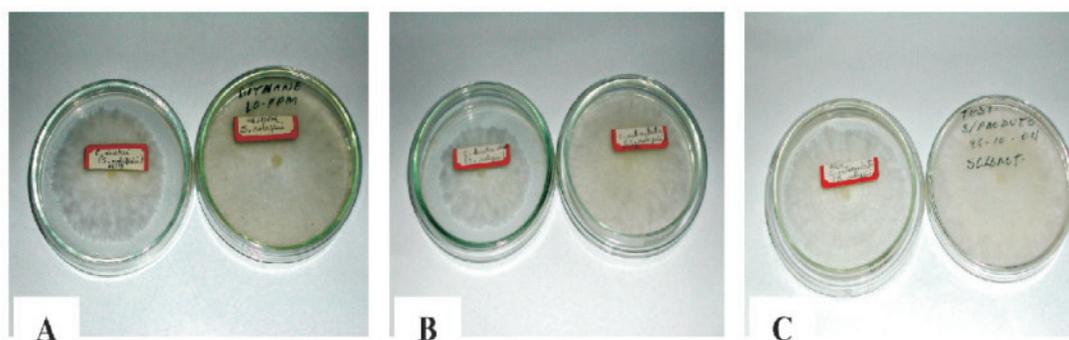


Figura 2-Inibição do crescimento micelial do fungo *Sclerotium rolfsii* por óleo-resina de *Copaifera*. A - *C. duckei* e Dithane M 45; B *C. duckei* e *C. reticulata*; C *C. reticulata* e Dithane M 45.

Na inibição do crescimento micelial do fungo da espécie *Macrophomina phaseolina* o óleo-resina de *C. duckei* foi o que apresentou maior eficiência (Figura 3A). O óleo-resina de *C. reticulata* foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial do fungo

que o Dithane M 45 na dosagem de 10 ppm e a testemunha (Figura 3B).

Comparando-se o Dithane M 45 com a testemunha, esta induziu maior inibição no crescimento micelial para todas as espécies de fungos, não havendo, entretanto, diferença significativa entre os mesmos.

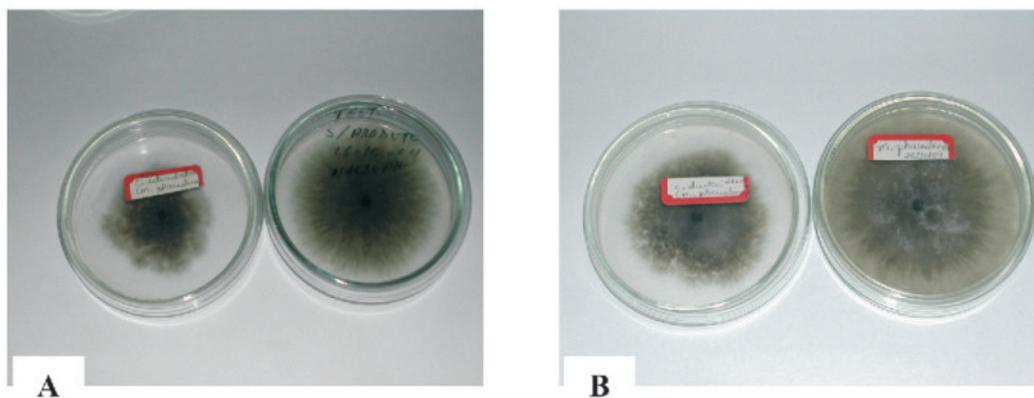


Figura 3-Inibição do crescimento micelial do fungo *Macrophomina phaseolina* por óleo-resina de *Copaifera*. A - *C. duckei* e Dithane M 45; B *C. reticulata* e Dithane M 45.

Diniz et al. (1996) avaliou a ação fungitóxico do bálsamo de copaíba contra os patógenos *Fusarium moniliforme* e *Alternaria* sp., confirmando uma alta redução no desenvolvimento dos esporos desses fitopatógenos. Por sua vez, Morais et al. (2000) confirmaram atividade positiva do óleo-resina de *Copaifera* spp. sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici.

Trabalhos conduzidos por Amorim (2003) demonstraram que os extratos hexânico e metanólico de folhas de *Copaifera langsdorffi*, promoveram a inibição do crescimento micelial das espécies fitopatógenas, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bipolaris sorokiniana*.

Trabalhos conduzidos por Miranda et al. (2000) demonstraram que dentre várias amostras de *Copaifera* spp., armazenadas por mais de dois anos e de diferentes procedências testadas em fungos e bactérias, ocorreu atividade apenas antibacteriana diferenciada, indicando que a procedência e o tempo de armazenamento influenciaram a atividade antibacteriana.

Cascon et al. (2000) utilizando amostras de *Copaifera* spp. e *C. duckei* procedentes dos estados do Amapá, Amazonas e Pará demonstraram, através do Bioautograma, que houve atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* para todas as amostras testadas.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que algumas espécies de *Copaifera* podem apresentar atividade antifúngica. Por outro lado, essa atividade poderá ocorrer, dependendo da espécie fúngica utilizada bem como a concentração do óleo.

4 CONCLUSÃO

a) Para o fungo da espécie *Rhizoctonia solani* entre os tratamentos testados o óleo-resina das duas espécies de *Copaifera* é o mais eficiente na inibição do crescimento micelial.

b) O óleo-resina de *Copaifera duckei* é o mais eficiente na inibição do crescimento micelial dos fungos *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*.

c) O óleo-resina de *C. duckei* e *C. reticulata* tem efeito antifúngico eficiente para o fungo *Rhizoctonia solani*.

d) O óleo-resina de *C. duckei* é mais eficiente como antifúngico para os fungos *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* do que o óleo-resina de *C. Reticulata*.

REFERÊNCIAS

AMORIM, A. C. L. *Caracterização química da Copaifera langsdorffii Desfon e avaliação de sua atividade fungitóxica*. 2003. 94p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)-UFLA, Lavras, 2003.

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., 1998, Maringá. *Resumos...* Maringá: EDUEM, 1998. p.548.

CASCON, V.; GILBERT, B.; ARAUJO, G. L.; ROCHA, L.M.; TEIXEIRA, L.A.; CARVALHO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo resina de *Copifera* spp. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. *Resumos...* Recife:UFPE, 2000. p.223.

DINIZ, S. P. S. S; LOZANO, V.; REZENDE, D.; TONA, N.; SOUZA, L. S. Ação do bálsamo de copaíba no controle do desenvolvimento de *Fusarium moliniforme* e *Alternaria* sp. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.21, ago. 1996. Suplemento.

HARBORNE, J. B. Plant phenolics In: MANN, J.; DAVISON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBONE, J. B. (Ed). *Natural products: their chemistry and biological significance*. Essex: Longman, 1994. 212p.

LANGENHEIM, J. H.; FEIBERT, E.B. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.8, p. 2527-2532, Aug. 1988.

- MIRANDA, R. C. M.; WANDERLEY, T. K. V.; MOURA, W.; ARAÚJO, J. Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) de diferentes procedências. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. *Resumos...* Recife: UFPE, 2000. p.223.
- MORAIS, L. A. S de.; CARMO, M. G. F. do; VIEGAS, E. C. de.; TEIXEIRA, D. F.; CASCON, V.; GILBERT, B. Atividade antifúngica do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) e de frutos de sucupira (*Pterodon ermagnatus*) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. *Resumos...* Recife: UFPE, 2000. p. 124.
- PINTO, A. C. ; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA Jr., V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated sílica gel. *Journal Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 355-360, Jul./Aug. 2000.
- SANTOS, M. M. F. B.dos. *Efeito de extratos de duas formas de Lippia alba sobre o fungo Colletotrichum gloeosporioides (PENZ.), isolado de Citrus* sp. 1996. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - ESALQ, Piracicaba, 1996.
- SILVA, I.; MIRANDA NETO, M. H.; FRANCO, S. L.; CARDOSO, M. L. C.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M. G.; CONEGERO, C. I.; IWANKO, N. S. *Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais*. Cascavel: Assoeste, 1995. 203p.
- 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 Amazonica*, 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 JÚNIOR, 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. 62 p.