

## Efeito do óleo essencial de alecrim pimenta no controle de *Curvularia* em milho.

Talita Pereira de Souza Ferreira<sup>(1)</sup>; Gil Rodrigues dos Santos<sup>(2)</sup>; Dalmácia Souza Carlos<sup>(3)</sup>; Solange Aparecida Ságio<sup>(4)</sup>; Luiz Gustavo de Lima Guimarães<sup>(5)</sup>; Rodrigo Veras da Costa<sup>(6)</sup>.

<sup>(1)</sup> Estudante; Bolsista CNPq-UFT; Universidade Federal do Tocantins; Gurupi, Tocantins; cupufer@gmail.com; <sup>(2)</sup> Professor; UFT; gilrsan@mail.uft.edu.br; <sup>(3)</sup> Mestranda; UFT; dalmaciaadm@yahoo.com.br; <sup>(4)</sup> Bolsista PNPd/CAPES; UFT; solsagio@gmail.com; <sup>(5)</sup> Professor; Universidade Federal São João Del Rei; lguimaraes@ufsj.edu.br; <sup>(6)</sup> Pesquisador EMBRAPA Milho e Sorgo; Sete Lagoas, Minas Gerais; rodrigo.veras@embrapa.br.

**RESUMO:** O milho (*Zea mays* L.) é atacado por doenças que afetam sua qualidade e produtividade. Mancha de *Curvularia* é uma doença que vem a cada ano, no Estado do Tocantins, aumentando sua incidência, principalmente em época chuvosa devido à alta temperatura associada à alta umidade relativa do ar. Pesquisas envolvendo isolados de *Curvularia* são importantes para subsidiar programas de controle alternativo, visto que até hoje não são encontrados pesticidas que impeçam seu desenvolvimento durante o crescimento das plantas de milho. Assim, este trabalho objetivou avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim pimenta sobre o patógeno *Curvularia* sp. Os experimentos *in vitro* foram conduzidos com três repetições e cinco concentrações do óleo: C<sub>1</sub>=2,5 µL mL<sup>-1</sup>; C<sub>2</sub>=5 µL mL<sup>-1</sup>; C<sub>3</sub>= 7,5 µL mL<sup>-1</sup>; C<sub>4</sub>= 10 µL mL<sup>-1</sup> e C<sub>5</sub>= 50 µL mL<sup>-1</sup>. Foram preparadas soluções como controle positivo (água) e dois controles negativos (Tiofanato metílico a 2 µL mL<sup>-1</sup>) aplicados nos fungos *Curvularia* e *Fusarium* em placas contendo BDA. Entre os tratamentos houve 100% de inibição para a concentração de 50 µL mL<sup>-1</sup>. *Curvularia* apresentou resistência elevada ao fungicida e para o *Fusarium*, a inibição foi de 88,32%. As mesmas concentrações do óleo supracitadas foram empregadas para os testes de fitotoxicidade, os quais foram realizados em condições de casa de vegetação utilizando sementes Tractor (Syngenta®). Foram verificados murcha e ressecamento das plantas para as concentrações C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>. O óleo essencial pode ser utilizado como controle alternativo do fungo *Curvularia* sp. na C<sub>3</sub>, onde não verifica-se fitotoxicidade para as plantas de milho.

**Termos de indexação:** *Zea mays*, controle alternativo, atividade fungitóxica.

### INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é extremamente utilizado em uma grande diversidade de pratos alimentares, não somente no Brasil, mas em toda extensão mundial. Além disso, é o principal ingrediente utilizado em formulações para rações de aves e suínos, tornando-se o cereal mais plantado no

mundo (Embrapa 2009). Devido a grande expansão da cultura no mundo, as plantas ficam expostas aos vários agentes fitopatogênicos que utilizam os mais diversos mecanismos de ação sobre a cultura afetando consideravelmente sua produtividade. Recentes levantamentos mostraram aumento na incidência do fungo *Curvularia lunata* provocando manchas foliares em plantas de milho na China e, resultando em perdas de rendimento do milho (Gao et al., 2012).

Na literatura brasileira existem poucos relatos desta doença, porém ocorre com grande incidência nas condições encontradas do Tocantins e tem sido motivo de preocupação nos últimos anos (Vaz-de-Melo et al., 2010).

Por outro lado, atualmente, muito se tem estudado acerca de novos bioprodutos com ação antimicrobiana como alternativa aos fungicidas sintéticos, principalmente estudos relacionados aos óleos essenciais a partir de plantas medicinais (Muthaiyan et al., 2012). Originários do metabolismo secundário das plantas, os óleos vegetais possuem uma complexa composição química, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides, e são considerados fontes de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra micro-organismos (Oliveira et al., 2011; Siani et al. 2000).

Soylu et al. (2010) observaram alterações morfológicas nas hifas de *Botrytis cinerea* quando tratadas com óleo essencial de orégano. Essa propriedade citotóxica dos óleos essenciais é muito importante na aplicação desses extratos vegetais na agricultura, uma vez que podem ser eficazes no controle de fitopatógenos (Bakkali et al., 2008).

Considerando a importância crescente da Mancha de *Curvularia* em milho, aos poucos estudos desenvolvidos para o controle desta doença em áreas tropicais, a crescente busca por métodos alternativos de controle e o potencial antifúngico de óleos vegetais de plantas medicinais, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a fungitoxicidade *in vitro* do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o fitopatógeno *Curvularia* sp. do milho e também sua fitotoxicidade.

### MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de

Fitopatologia do Campus de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins – TO. O fungo *Curvularia* sp. foi inicialmente isolado de plantas de milho procedentes do campo experimental da UFT com sintomas da doença e repicado em meio de cultura BDA. Todos os experimentos deste trabalho foram feitos com apenas um único isolado.

### Obtenção do óleo essencial de alecrim pimenta

Para a extração do óleo essencial de alecrim pimenta foi empregado o método de arraste a vapor, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Guimarães et al., 2008).

### Patogenicidade de *Curvularia* sp.

A patogenicidade de *Curvularia* sp. foi verificada por meio de testes de inoculações em plantas de milho. As sementes do milho foram semeadas em vasos de polietileno contendo substrato e acrescidos de 10g de adubo comercial em cada vaso. Foram feitas 9 covas, sendo que em cada uma foram adicionadas 2 sementes. Não houve necessidade de realizar o desbaste. Quando as plantas atingiram dois pares de folhas verdadeiras, a inoculação pôde ser iniciada. Por meio de um borrifador manual (capacidade 500 mL) contendo suspensão de esporos de *Curvularia* incubados há dez dias em BOD a 25 °C nas concentrações de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  até o ponto de escorrimento sobre as folhas. Testemunhas absolutas foram preparadas utilizando somente água destilada com o mesmo volume utilizado para as concentrações dos esporos. Em seguida, os vasos foram mantidos por 48 h com algodão úmido e fechado com saco plástico visando proporcionar a câmara úmida. A partir de 48 horas após a inoculação, os vasos foram deixados em local sombreado até o surgimento dos primeiros sintomas foliares da Mancha da *Curvularia*.

### Preparo das soluções para atividade biológica

Para preparar as soluções do óleo essencial foram utilizados pequenos frascos de vidro esterilizados com tampa para receber as diferentes concentrações. Uma solução estoque foi preparada para a maior concentração utilizando-se um balão volumétrico de 10 mL. Na sequência, foi adicionado primeiramente o óleo e ajustada a concentração de  $C_5 = 50 \mu\text{L mL}^{-1}$  para um volume de 10 mL; em seguida, foi adicionado Tween 80 (1óleo : 1Tween). Em Câmara de Fluxo Laminar, o balão foi agitado suavemente e depois foi inserida a água destilada esterilizada e após agitação foi obtida uma mistura homogênea. Posteriormente, foram realizadas as demais diluições até que fossem obtidas as concentrações de  $C_1 = 2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_2 = 5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_3 = 7,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_4 = 10 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Como controle negativo e positivo foram preparadas respectivamente as soluções de Tiofanato metílico,

( $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) e água destilada esterilizada.

### Avaliação da fitotoxicidade do óleo essencial

O experimento para o teste de fitotoxicidade foi realizado em condições de casa de vegetação. Foram utilizados 12 vasos de polietileno preenchidos com metade de substrato comercial e metade de solo. Foram adicionados 10 g de adubo NPK (5-25-15) por vaso. No plantio de milho foram utilizadas sementes Traktor (Syngenta®) semeando duas para cada cova. Após a semeadura, os vasos foram irrigados diariamente até que o crescimento das plântulas atingisse 4 folhas definitivas ou 15 dias de plantio. Borrifadores manuais foram empregados para a aplicação dos tratamentos. Cada vaso foi pulverizado com 5 mL das soluções. Decorridas 24 h após a aplicação, a avaliação foi feita conforme a escala de fitotoxicidade adaptada de Freitas et al. (2009).

### Efeito do óleo essencial em *Curvularia* sp.

A fim de verificar o efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial do fitopatógeno, 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das cinco soluções já citadas foi distribuída na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça tipo Drigalsky. Em seguida, um disco de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro foi colocado no centro das placas. As mesmas foram vedadas com filme plástico PVC, identificadas e incubadas em BOD a 25 °C por 10 dias. As avaliações foram realizadas aferindo-se com paquímetro digital o diâmetro micelial do fungo traçando dois eixos ortogonais entre si sobre o centro das placas resultando em uma média aritmética e medidos de dois em dois dias (2, 4, 6, 8 e 10 dias). Todas as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar®.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomas típicos da queima-das-folhas foram verificados após o período de incubação de 48h decorridos da inoculação das plantas. Dentre as 6 concentrações de esporos preparadas ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , e  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) houve maior incidência de manchas foliares a partir da concentração de  $10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Contudo, todas as suspensões de esporos provocaram lesões nas folhas das plantas de milho. De acordo com Agrios (2005), um patógeno pode perder sua capacidade de parasitismo em relação aos seus hospedeiros se sucessivas repicagens em meio de cultura forem realizadas. Por isso, em todos os procedimentos de isolamento, o fungo foi repicado uma única vez.

A **tabela 1** apresenta o diâmetro médio micelial (mm) do fitopatógeno *Curvularia* sp. quando submetido ao óleo essencial de alecrim pimenta. Verificou-se que houve crescimento do fungo

estudado nas concentrações  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_4$ . Já com relação à  $C_5$ , o crescimento foi completamente inibido. O óleo essencial de alecrim pimenta tem como composto majoritário o timol, e é uma espécie nativa do estado do Ceará. De acordo com vários estudos realizados com plantas desta mesma espécie, proveniente da região nordeste do Brasil, foi verificado que apresenta como constituinte de maior porcentagem o isômero do Carvacrol, o composto timol. Cavalcanti et al. (2004) encontraram uma quantidade de 80,8% de timol no óleo essencial de plantas desta espécie. O efeito fungitóxico deste óleo essencial foi caracterizado também por Fontenelle et al. (2007) sobre o crescimento dos fungos das espécies *Microsporum canis*, *Microsporum pachydermatis* e *Candida* spp. evidenciando-se, assim, a ação antimicrobiana do composto timol.

**Tabela 1** – Diâmetro médio micelial (mm) de *Curvularia* sp. sob cinco concentrações ( $C_1=2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_2= 5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_3=7,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $C_4= 10 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $C_5= 50 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) do óleo essencial de *Alecrim pimenta* e sob controle + (água destilada), controle 1 – (fungicida), controle 2 – (fungicida sob *Fusarium* sp.).

Tratamentos	Épocas de avaliação (dias de incubação)				
	2	4	6	8	10
Controle +	26,21a	44,69a	59,44a	68,96a	80,56a
Controle 1 -	25,27a	42,51a	59,44ac	67,4a	78,11ad
Controle 2 -	8,59b	9,14b	9,74b	9,94bc	10,51bc
$C_1$	22,88c	41,32a	55,74ac	68,78a	82,34a
$C_2$	18,97d	36,15c	50,31c	61,07a	77,76a
$C_3$	11,89e	22,61d	29,95d	37,03d	47,98acd
$C_4$	7,37b	13,97e	18,68e	20,76c	29,91bcd
$C_5$	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Controle + (*Curvularia* repicada em BDA + água), Controle 1 – (*Curvularia* repicada em BDA + Tiofanato metílico) e Controle 2 – (*Fusarium* repicado em BDA + Tiofanato metílico).

Comparando-se as médias de crescimento micelial do patógeno para 2 e 4 dias de incubação, verificou-se que o óleo essencial de alecrim pimenta promoveu efeito inibitório a partir da  $C_2$ , onde se observa que em todas as concentrações testadas as médias diferem-se entre si (**Tabela 1**). O fungo apresentou crescimento micelial inibido nos tratamentos  $C_1$  e  $C_2$  para 2 dias e somente para  $C_2$  em 2 e 4 dias. A  $C_1$  não foi eficiente em reduzir o crescimento micelial ao longo do tempo, pois somente na primeira avaliação foi observado efeito inibitório, ou seja, os micélios do fitopatógeno cresceram normalmente no decorrer dos dias

subsequentes (**Tabela 1**). Com isso, a  $C_1$  não é indicada para fungitoxicidade *in vitro*. Esta comparação pode ser mais evidenciada quando se analisa o crescimento do controle positivo (Controle +) em relação aos demais tratamentos. Pode-se inferir que após o 6º dia de incubação, a inibição dos micélios do fungo *Curvularia* não acontece satisfatoriamente, uma vez que na terceira avaliação a  $C_2$  não difere da  $C_1$ , e esta também não difere do controle positivo. As duas últimas avaliações (8 e 10 dias) confirmam que  $C_1$  e  $C_2$  permanecem estatisticamente equivalentes ao crescimento micelial do controle positivo. Para o efeito inibitório poderá ser empregada a  $C_3$ , já que em todas as cinco avaliações houve crescimento reduzido dos micélios fúngicos para a mesma, e para a  $C_4$  e  $C_5$ , e quantidade menor de óleo será necessária. Por outro lado, a aplicação das concentrações mais elevadas pode ser mais eficiente, uma vez que o fitopatógeno pode ser inibido mais rapidamente.

De acordo com os resultados, a  $C_5$  inibiu o crescimento micelial em 100%. Souza Júnior et al. (2009) do mesmo modo, constataram a inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em 100% para as concentrações de 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$  utilizando o óleo essencial de alecrim pimenta quando comparado à testemunha absoluta (0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ).

Para o fitopatógeno *Curvularia* sp., o controle negativo com Tiofanato metílico não apresentou diferença significativa do controle positivo, mesmo com a utilização da concentração acima da dose recomendada. Em todos os dias de incubação, o fungo cresceu com as mesmas medidas. Com isso, conclui-se que o princípio ativo utilizado não foi eficaz no controle deste patógeno em testes *in vitro*. Por outro lado, observando-se o controle negativo 2, verificou-se inibição micelial do gênero *Fusarium* quando submetido ao mesmo fungicida e na mesma concentração. A concentração, acima do recomendado (2  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) inibiu, ao final dos 10 dias, o crescimento com uma porcentagem de inibição de 88,32 %. O teste com fungicida sobre outro fungo fitopatogênico distinto do isolado deste trabalho foi necessário para assegurar as condições adequadas do fungicida, isto é, para verificar que o mesmo não se deteriorou ou não perdeu seu efeito fungitóxico. Deste modo, o óleo de alecrim pimenta foi testado somente com *Curvularia* e o fungicida foi testado com dois fungos diferentes (*Curvularia* e *Fusarium*). Como o *Fusarium* foi inibido eficientemente pelo Tiofanato metílico, sendo que o mesmo não inibiu o crescimento micelial da *Curvularia*, pode-se considerar que o efeito inibitório verificado com o uso do óleo para *Curvularia* foi bastante favorável como controle alternativo da doença estudada.

A fitotoxicidade nas plantas de milho tem como principal sintoma o aparecimento de necrose nas folhas, especificamente nas regiões em que a

solução acumula-se, como nas bordas e nas nervuras foliares ocasionando perda de área foliar verde (Magalhães et al., 2000). No ensaio de fitotoxicidade, as mesmas concentrações utilizadas nos testes *in vitro* também foram empregadas nos testes *in vivo*. Sintomas de fitotoxidez surgiram após 12 h decorridas das aplicações nas folhas. Foi verificado que as concentrações C<sub>4</sub> (10,67% de fitotoxidez) e C<sub>5</sub> (69,33% de fitotoxidez) não podem ser utilizadas em testes de controle da doença na planta, porque provocaram marcha seguida de posterior necrose em algumas regiões foliares. Estes valores foram significativos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. De acordo com o resultado obtido pode-se inferir que a aplicação das soluções com óleo deve ser realizada abaixo da concentração C<sub>3</sub>, onde não ocorreram sintomas visíveis de fitotoxicidade advinda da aplicação do óleo essencial estudado.

## CONCLUSÕES

O óleo essencial de alecrim pimenta pode ser um promissor agente antifúngico provavelmente devido a sua complexa mistura de componentes ativos.

Houve inibição das soluções de óleo preparadas para o fungo fitopatogênico *Curvularia* sp. e os testes de fitotoxicidade realizados em plantas de milho delimitaram a concentração máxima a ser utilizada.

*Curvularia* sp. mostrou-se bastante resistente ao Tiofanato metílico numa concentração aplicada acima do recomendado em testes *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Genetics of Plant disease: Loss of Pathogen Virulence in Culture. 5. ed. Academic Press. 2005. p.133.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446–475,2008.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. 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.

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. 2009. Disponível em< <http://www.embrapa.br/>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2014.

FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential

oil from Alecrim pimenta. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FREITAS, S. P.; MOREIRA, J. G.; FREITAS, I. L. J.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SILVA, V. Q. R. Fitotoxicidade de herbicidas a diferentes cultivares de milho-pipoca. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. esp., p. 1095-1103, 2009.

GAO, S.; LIU, T.; LI, Y.; WU, Q.; FU, K.; CHEN, J. Understanding resistant germplasm-induced virulence variation through analysis of proteomics and suppression subtractive hybridization in a maize pathogen *Curvularia lunata*. **Proteomics**, v. 12, p. 3524–3535, 2012.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. 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.

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

MAGALHÃES, P. C.; DA SILVA, J. B.; DURÃES, F. O. M. Fitotoxicidade de herbicidas aplicados em pós-emergência na fase inicial da cultura do milho. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, 2000.

MUTHAIYAN, A.; MARTIN, E. M.; NATESAN, S.; CRANDALL, P. G.; WILKINSON, B. J.; RICKE, S. C. Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, 2012, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05270.x

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 Medicináveis, Botucatu**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

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

VAZ-DE-MELO, A.; AFFÉRI, F. S.; DOTTO, M. A. PELUZIO, J. M. SANTOS, G. R.; CARVALHO, E. V. Reação de híbridos de milho à *Curvularia* ssp, sob dois níveis de adubação com nitrogênio, no Sul do Tocantins. **Scientia Agraria**, v.11, n.2, p.149-154, 2010.