

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp.

In vitro effect of *Eucalyptus globulus* essential oil on *Penicillium* sp.

Andréia Piati^{1*}; Cristina Fernanda Schneider¹; Márcia de Holanda Nozaki²

Resumo

O fungo *Penicillium* sp. é o agente causal dos bolores, considerada a principal doença pós-colheita em citros, levando à perdas na qualidade e quantidade dos frutos comercializáveis. Além de perdas econômicas, uma vez que nas perdas pós-colheitas estão inclusos os custos, transporte e armazenagem de frutos. O presente trabalho teve por objetivo verificar a ação fungitóxica do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* no controle *in vitro* de *Penicillium* sp., avaliando seu crescimento micelial, produção e a germinação de esporos. O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia da PUC, campus Toledo, e constituiu-se de oito tratamentos, sendo: uso do óleo essencial de eucalipto nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05% e 0,025% adicionados ao meio de cultura BDA (Batata Dextrose-Ágar) autoclavado, testemunha negativa (meio de cultura com adição de 40 mg de ingrediente ativo azoxystrobin/L do fungicida) e testemunha positiva (apenas meio de cultura). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições em cada tratamento. O óleo essencial de eucalipto inibiu o crescimento de forma significativa nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25%, não diferindo estatisticamente do controle com o fungicida azoxystrobin. Os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento em relação a produção de esporos. Já na germinação de esporos, as concentrações de 1% e 0,5% obtiveram controle superior ao tratamento com azoxystrobin e a concentração de 0,25%. As demais concentrações de óleo não obtiveram resultados significativos nas avaliações, igualando-se estatisticamente a testemunha positiva (BDA).

Palavras-chave: Fungo, citros, podridões, eucalipto, controle pós-colheita

Abstract

Penicillium sp. is the casual agent of moulds, considered the main citrus post-harvest disease, causing loss on the quality and quantity of marketable fruits. Besides economic loss, it can be included costs, transportation and fruit storage problems. The present work had the objective to verify the fungitoxic action of *Eucalyptus globules* essential oil on the *in vitro* control of *Penicillium* sp., evaluating mycelial growth, production and spores germination. The experiment was conducted on the Microbiology laboratory of PUC, Toledo campus, with eight treatments: 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05% e 0,025% concentrations of eucalyptus oil added to PDA media (potato-dextrose-agar), negative control (PDA with addition of 40mg of azoxystrobin/L) and positive control (PDA media only). The experimental design was according to a completely randomized design, with five replicates each treatment. The eucalyptus essential oil inhibited significantly the growth in the 1%, 0,5% e 0,25% concentrations, not differing statistically from control with fungicide azoxystrobin. The treatments presented the same behavior for spores production. For spores germination, the 1% e 0,5% concentrations had better

¹ Eng^a Agr^a. Pontifca Universidade Católica do Paraná, PUC. E-mail: deiapiatti@hotmail.com; tina.schneider@hotmail.com

² Prof^a Dr^a do Departamento de Agronomia da Pontifca Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Campus Toledo. E-mail: marcia.nozaki@gmail.com

* Autor para correspondência

control than treatment with azoxystrobin and the concentration of 0,25%. Others oil concentrations did not present significative results on the evaluations, being statistically equal to positive control (PDA).

Key words: Fungus, citrus, moulds, eucalyptus, post-harvest control

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, entretanto grande parte de sua produção é destinada ao mercado interno, respondendo assim por apenas 1,5 a 2% do comércio mundial. Desta produção, grande parte se refere ao cultivo de frutas cítricas, ficando o país como o maior produtor mundial de frutos cítricos, com 1 milhão de hectares plantados com esta cultura. No Brasil, todos os Estados são produtores, produzindo aproximadamente 19 milhões de toneladas de citros, na qual a maior parte da produção é destinada a indústria de suco concentrado, e apenas uma pequena parcela ao consumo *in natura*.

Um grande problema na fruticultura é a ocorrência de doenças pós-colheita, pois elas se apresentam como as causas mais severas de perdas, e seu custo econômico é maior que as perdas ocorridas no campo, uma vez que estão inclusos os custos de colheita, transporte e armazenamento dos frutos. Estas perdas podem oscilar de 10% até 50%, dependendo do produto, da região de cultivo e das tecnologias utilizadas.

Os maiores problemas da citricultura estão relacionados com a ocorrência dos bolores, representando a principal doença pós-colheita no citros. A doença afeta todos os países produtores de citros, atingindo todas as espécies e cultivares cítricas. Destes bolores os mais comuns são o bolor azul e bolor verde, tendo como agente causal o fungo *Penicillium* sp..

Este fungo é capaz de produzir enzimas que degradam os tecidos dos frutos, caracterizando uma podridão mole, com presença de mofo com a coloração respectiva à espécie envolvida, levando a deterioração e conseqüentemente o descarte destes frutos, causando assim grandes perdas de produção. Algumas espécies de *Penicillium* sp. chegam a

produzir uma toxina no alimento infectado, sendo perigoso o consumo do mesmo.

Uma prática muito utilizada para o controle do *Penicillium* sp. é a utilização de fungicidas diretamente nos frutos. Esta medida apresenta boa eficiência, entretanto há grande perigo de intoxicação por ingestão de frutos que retenham resíduos destes produtos. Há também a possibilidade de intoxicação do trabalhador no momento de aplicação.

Neste contexto, a tendência do mercado internacional é a procura por produtos de melhor qualidade, como também pela preservação ambiental, intensificando desta forma a necessidade de métodos e produtos para controles alternativos, que substituam os insumos poluentes, mantendo a qualidade do produto, reduzindo os resíduos de produtos químicos nos frutos e aumentando a segurança e a saúde do consumidor.

As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam propriedades aplicadas em diversas áreas, devido suas conhecidas atividades terapêuticas, como antifúngica, antibacteriana, antissépticas, entre outras. Desta forma, o óleo essencial de eucalipto se apresenta como uma ótima alternativa de fungicida natural, pois já existem relatos de sua eficiência sobre algumas espécies de fungos (STANGARLIN et al., 1999; DE LA CRUZ, 2002; VILELLA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2004). O óleo essencial de eucalipto não apresenta riscos de intoxicação para o homem, como também para o meio-ambiente, o que o torna um produto de baixo impacto ambiental.

Com isso, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o fungo *Penicillium* sp., causador do bolor em citros, avaliando seu controle na fase vegetativa, pelo controle do crescimento micelial da colônia, e na fase reprodutiva, pelo

controle na produção e germinação dos esporos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, *campus* Toledo.

Frutos de laranja apresentando sintomas característicos de bolor foram coletados do município de Céu Azul (PR). O fungo *Penicillium* sp. foi isolado a partir de tecidos lesionados dos frutos infectados (isolamento direto), apresentando sintoma característico. Os isolados foram cultivados em meio BDA a temperatura e fotoperíodo constante e posteriormente foram mantidos em meio BDA para uso nos ensaios.

Inibição do crescimento micelial de Penicillium sp.

Para avaliar o crescimento micelial do fungo, foram realizados diferentes tratamentos. Sendo estes: Tratamento 1 (T1): 1000µL de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*/100mL de meio de cultura BDA (1%); □ Tratamento 2 (T2): 500µL de óleo/100mL de meio (0,5%); □ Tratamento 3 (T3): 250 µL de óleo/100mL de meio (0,25%); Tratamento 4 (T4): 100µL óleo/100mL de meio (0,1%); □ Tratamento 5 (T5): 50µL de óleo/100mL de meio (0,05%); □ Tratamento 6 (T6): 25µL de óleo/100mL de meio (0,025%); Tratamento 7 (T7): Testemunha Negativa: meio BDA+ fungicida azoxystrobin: (40mg i.a./L); e, Tratamento 8 (T8): Testemunha Positiva - somente o meio BDA. O óleo essencial de eucalipto utilizado nos testes tinha 100% de pureza e foi adquirido no comércio local de Toledo, PR.

Nos tratamentos T1 a T6, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi incorporado ao meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) fundente, nas suas devidas proporções, com auxílio de micropipeta. Enquanto que, para o T7, incorporou-se o princípio ativo do fungicida ao meio de cultura e no T8 utilizou-se apenas do meio de cultura sem adição de

óleo essencial ou fungicida.

Após a solidificação do meio de cultura, um disco (5mm de diâmetro) de colônia do fungo com 14 dias de cultivo foi transferido e depositado no centro de cada placa de Petri. Foram realizadas cinco repetições por tratamento. As placas foram mantidas sob temperatura e fotoperíodo ambiente.

As avaliações foram realizadas diariamente através da medição diametricamente oposta do crescimento da colônia do fungo em placa, com auxílio de uma régua graduada (cm). O crescimento foi avaliado até que um dos tratamentos atingisse todo o diâmetro da placa.

Inibição da esporulação de Penicillium sp.

Após a avaliação do crescimento micelial de *Penicillium* sp. em placas, realizou-se a contagem de esporos com o mesmo material obtido anteriormente.

Preparou-se uma suspensão de esporos, para cada tratamento, através da adição de 10mL de água destilada às placas de Petri. Com o auxílio de um pincel, realizou-se leve fricção da colônia fúngica, de modo que fosse liberado as estruturas reprodutivas do fungo do meio de cultura. A solução formada foi filtrada em béquer, com auxílio de funil de vidro e camada de gaze, possibilitando a passagem de suspensão de água contendo esporos e retenção dos demais materiais, tais como hifas.

A suspensão foi então homogenizada e quantificado o número de conídios em câmara de Neubauer (hemacitômetro).

Inibição da germinação de esporos

Após a solidificação do meio, discos de meio de cultura de 2 cm de diâmetro foram obtidos com auxílio de um vazador de metal. Tais discos foram individualmente depositados sobre lâminas de vidro, sobre as quais foram depositadas alíquotas de 40µL de uma suspensão de esporos do fungo (1×10^6

esporos/ mL). O material foi depositado em caixas Gerbox®, e incubado no escuro, em temperatura ambiente, por 24 horas.

Finalizado o período de incubação, foi depositado uma gota do corante azul de algodão (lactofenol) sob cada lâmina, de modo a paralisar a germinação de esporos em todos os tratamentos, além de auxiliar na visualização das estruturas reprodutivas do fungo, procedendo então à determinação ao microscópio ótico.

Foram contabilizados 100 esporos por lâmina, sendo considerados germinados aqueles que apresentaram 2/3 do desenvolvimento tubo germinativo.

Delineamento experimental

Os parâmetros avaliados foram o crescimento da colônia, número e germinação de esporos de *Penicillium* sp.

O delineamento experimental adotado para todos os ensaios foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos, constituídos de cinco repetições cada.

Os dados coletados foram analisados estatisticamente e as diferenças estatísticas estimadas pela análise de variância, usando como comparação das médias o teste de Tukey, a nível de significância de 5%. Como instrumento estatístico utilizou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 1999).

Resultados e Discussão

*Inibição do crescimento micelial de *Penicillium* sp.*

O efeito inibitório do crescimento micelial de *Penicillium* sp. sob diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* encontram-se representados na Tabela 1. Observa-se que os tratamentos com concentrações de 0,25; 0,5 e 1% do óleo essencial apresentaram inibição do crescimento a partir do 2º dia de avaliação, e que estas mesmas doses não diferiram estatisticamente da testemunha negativa (fungicida). As demais concentrações não apresentaram diferença estatística significativa da testemunha positiva (BDA) (Figura 1).

Tabela 1. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Penicillium* sp., em diferentes períodos de avaliação.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)				
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
T1 (1%)	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
T2 (0,5%)	0,00 a	0,24 a	0,34 ab	0,65 ab	0,98 a
T3 (0,25%)	0,00 a	0,30 a	0,84 b	1,31 ab	1,81 a
T4 (0,1%)	0,00 a	0,95 b	1,58 cd	4,64 c	7,19 b
T5 (0,05%)	0,00 a	0,98 b	1,66 d	4,15 c	6,42 b
T6 (0,025%)	0,00 a	0,96 b	1,65 d	3,08 bc	5,85 b
T7 (Fungicida)	0,00 a	0,00 a	0,94 bc	1,24 ab	1,53 a
T8 (BDA)	0,00 a	1,25 b	2,07 d	4,76 c	6,60 b

¹Azoxystrobin: 40 mg i.a./L

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

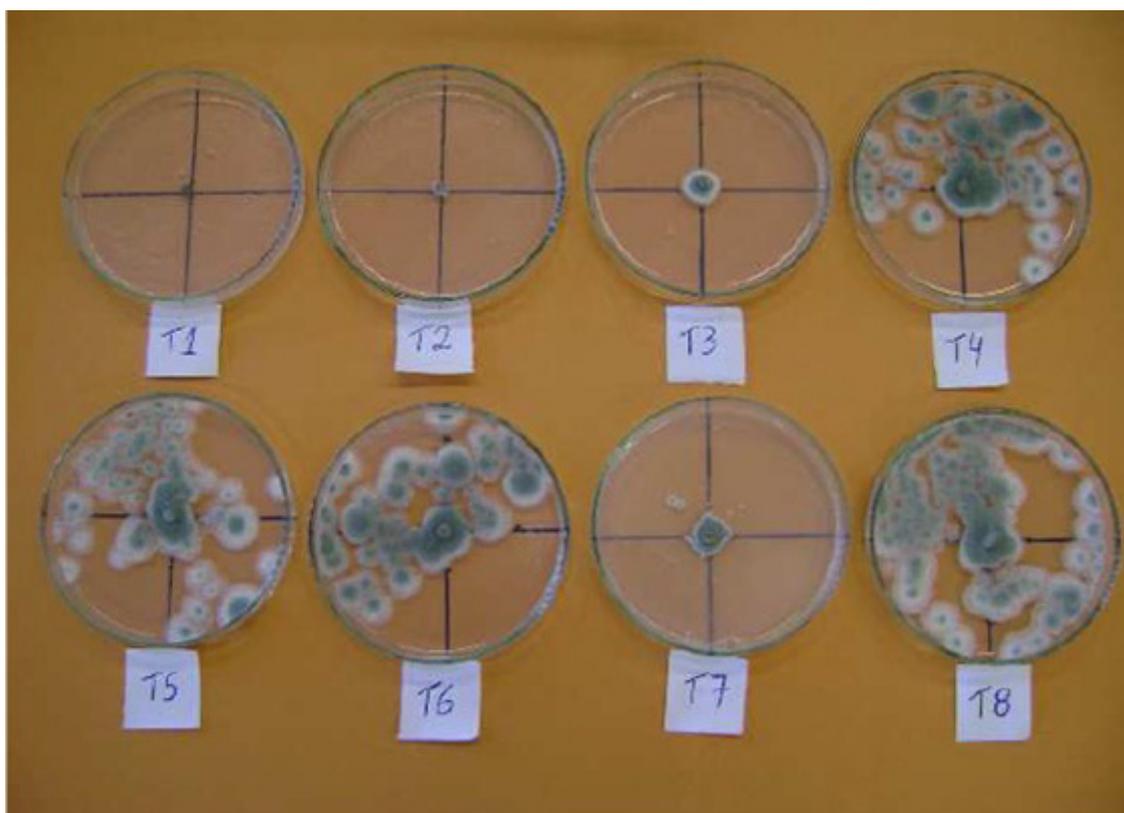


Figura 1. Crescimento micelial de *Penicillium* sp. submetido a diferentes tratamentos, em que: T1 representa concentração de 1% de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*; T2 = 0,5% de óleo; T3 = 0,25% de óleo; T4 = 0,1% de óleo; T5 = 0,05% de óleo; T6 = 0,025% de óleo, T7 = Azoxystrobin (40 mg i.a./L) e T8 = apenas meio BDA.

O fungo apresentou rápido desenvolvimento, completando seu crescimento em toda placa e finalizando a avaliação no período de cinco dias. Sendo que, no primeiro dia após inoculação do fungo nenhum dos tratamentos apresentou crescimento.

Os tratamentos apresentando as menores concentrações do óleo essencial (T4, T5, T6) não foram efetivos no controle de *Penicillium* sp.. Os resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Souza et al. (2004), no qual testando óleo essencial de diferentes condimentos, obtiveram o controle de *Penicillium* sp. em concentrações maiores. Este autores demonstraram 100% de inibição do crescimento micelial de *Penicillium* sp com o óleo de canela em dosagens acima de 500 µg/mL. Já os óleos essenciais de tomilho e alho apresentaram efeito inibidor em doses superiores a 1000 e 1500 µg/mL respectivamente. O óleo de cravo da índia

controlou o fungo na dose de 800 µg/mL.

Inibição da esporulação de Penicillium sp.

Os resultados obtidos na avaliação de número de esporos mostram que os tratamentos se comportaram de forma semelhante aos resultados obtidos no crescimento micelial.

Observa-se que, os tratamentos de 1%, 0,5% e 0,25% do óleo essencial de eucalipto não apresentaram diferença significativa entre si e em relação a testemunha negativa (fungicida), apresentando eficiência no controle da produção de esporos (Tabela 2). Os tratamentos de doses inferiores à 0,25% de óleo igualaram-se estatisticamente a testemunha positiva, não apresentando dessa forma controle sobre a produção de esporos do fungo.

Tabela 2. Efeito de diferentes tratamentos sobre

Tabela 2. Efeito de diferentes tratamentos sobre o número de esporos de *Penicillium* sp. (esporos x 10⁵/mL).

Tratamentos	Produção de esporos x 10 ⁵ /mL
T1 (1%)	16,25 a
T2 (0,5%)	126,46 a
T3 (0,25%)	244,08 a
T4 (0,1%)	1159,97 b
T5 (0,05%)	1023,62 b
T6 (0,025%)	851,87 b
T7 (Fungicida)	288,48 a
T8 (BDA)	1019,5 b

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados diferiram dos obtidos no trabalho realizado por Souza et al. (2006), em que o fungicida azoxystrobin e os óleos essenciais de *E. globulus* e *Cymbopogon nardus*, não apresentaram controle sobre o crescimento micelial e a produção de esporos do fungo *Monilinia fructicola*. Entretanto, neste trabalho doses superiores a 0,25% do óleo essencial de *E. globulus* a e o azoxystrobin apresentaram controle sobre o *Penicillium* sp., tanto no crescimento micelial quanto na sua esporulação.

De acordo com Felix et al. (2007), no óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* há compostos com ação antifúngica para tratamento pós-colheita da antracnose do mamoeiro, visto que o óleo inibiu totalmente, tanto o crescimento micelial como a esporulação do patógeno nas concentrações testadas (1,25%; 2,5%; 3,75% e 5%).

Os resultados aqui apresentados demonstram que o óleo essencial de *E. globulus* apresenta ação inibitória sobre o crescimento e a esporulação do *Penicillium* sp. em citros, nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25%.

Inibição da germinação de esporos

Os tratamentos das doses de 1% e 0,5% de óleo de meio de óleo essencial apresentaram-se superiores

na inibição da germinação dos esporos, representando maior eficiência que o fungicida, o qual obteve controle estatisticamente igual à dose de 250µL (Tabela 3). Enquanto que, as doses de 100, 50 e 25µL/100mL não inibiram a germinação dos esporos de *Penicillium* sp., não diferindo da testemunha positiva (BDA).

A dose de 1000µL de óleo de eucalipto (T1) apresentou excelente resultado, de forma a controlar 100% a germinação dos esporos do fungo. Enquanto que, os tratamentos com fungicida (T7) e a dose de 250µL/100mL (T3), reduziram em aproximadamente 50% a germinação dos esporos, quando comparadas a testemunha positiva (T8). Desta forma os tratamentos T7 e T3, mostraram-se também bastantes eficientes no controle do patógeno.

Os resultados aqui apresentados são semelhantes aos obtidos por Bonaldo et al. (2007), os quais obtiveram 100% de inibição da germinação dos conídios de *Colletotrichum sublineolum* quando submetido ao tratamento com óleo essencial de eucalipto. Constatando ainda, a inibição do crescimento micelial dos fungos: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* e *Colletotrichum sublineolum*, com doses de óleo maiores que 40µL.

Tabela 3. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a germinação dos esporos de *Penicillium* sp. (%).

Tratamentos	Germinação (%)
T1 (1%)	0,0 a
T2 (0,5%)	4,4 a
T3 (0,25%)	55,2 b
T4 (0,1%)	82,8 c
T5 (0,05%)	87,2 c
T6 (0,025%)	89,2 c
T7 (Fungicida)	49,2 b
T8 (BDA)	96 c

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Como observado, o óleo essencial de plantas medicinais têm indicado potencial no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando assim a presença de compostos com características de elicitores, como descrito por Stangarlin et al. (1999).

Conclusões

O óleo essencial de *E. globulus* demonstrou atividade antifúngica sobre o patógeno *Penicillium* sp. tanto na fase vegetativa, através do controle no crescimento micelial, quanto na fase reprodutiva, na produção e germinação de esporos.

Foram constatados controle sobre o crescimento micelial e produção de esporos do fungo a dose superior a 0,25% do óleo essencial de eucalipto, igualando-se significativamente ao controle do fungicida azoxystrobin.

Com a germinação de esporos, a dose de 0,25% do óleo, controlou ao mesmo nível do fungicida, não apresentando diferença significativa. Enquanto que, as doses de 500 e 1000µL (porcentagem) do óleo, foram suficientes na inibição da germinação de esporos do patógeno.

Desta forma, pode-se concluir que, em doses

superiores a 0,25% do óleo essencial de *E. globulus*, têm-se um controle eficiente do fungo, apresentando-se, portanto, como uma forma de controle alternativo eficiente no tratamento do bolor em citros.

Agradecimentos

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Toledo.

Referências

- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.
- DE LA CRUZ, M. G. F. *O uso de óleos essenciais na terapêutica*. 2002. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/%D3leos%20essenciais%20e%20terap%EAutica.PDF>>. Acesso em: 14 abr. 2008.
- FELIX, K. C. S.; SILVA, J. C.; CARNAÚBA, J. P.; OLIVEIRA, A.; AMORIM, E. P. R. Atividade antifúngica de extratos vegetais e óleos essenciais sobre *Glomerella cingulata* em frutos de mamão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15., Maringá. 2007. *Anais...* Maringá: Gráfica e Editora Clichetec Ltda, ago. 2007. p. 119.
- FERREIRA, D. F. *Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0*. Lavras: UFLA, 1999.
- OLIVEIRA, O. R. DE; TERÃO, D.; CARVALHO, A. C. P.

P. de; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. de. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 94-100, jan./mar. 2008.

SOUZA, D. C.; SALVAIA, A.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Eficiência de fungicidas e óleos essenciais na inibição *in vitro* de *Minilinia fructicola*. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 19., 2006, São Paulo. *Anais....* São Paulo: Instituto Biológico, 2006. p. 224.

SOUZA, S. M. C. de; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Revista Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-691, maio/jun. 2004.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais: plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, ano 2, n. 11, p. 16-21, nov./dez. 1999.

VILELA, G. *Efeito do óleo essencial de Eucalyptus globulus sobre espécies produtoras de aflotoxinas*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.