

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) NO CONTROLE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Victor Tonelli Clevelares, Rebecca Gonçalves Ogioni Grip, João Pedro
Piassarolo Pontini, Dylan Rodrigues Rocha, Lilianne Gomes da Silva.

¹Instituto Federal do Espírito Santo, Rua Principal, s/nº, Distrito Rive – 29500-00 – Alegre-ES, Brasil,
vclevelares@gmail.com, rebeccaogioni@gmail.com, joaopedropontini@gmail.com,
dylan_2015@outlook.com, liliannegs@gmail.com.

Resumo

O artigo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici in vitro* e *in vivo* em mudas de tomate do tipo Santa Cruz. Foram realizadas as análises de inibição micelial, esporulação e intensidade de doença em diferentes concentrações utilizando o método de emulsão. O óleo apresentou efeito significativo no crescimento micelial, sendo estipulado o valor CL50 de 0,73 µL/mL, assim como reduziu a produção de conídios. O teste *in vivo* apresentou resultados inferiores aos obtidos anteriormente, entretanto, o tratamento utilizando 1,50 µL/mL apresentou melhores resultados. O óleo de citronela foi nocivo para as mudas de tomate na concentração de 3 µL/mL.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, *Cymbopogon winterianus*, controle.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

O cultivo de tomate pode ser profundamente afetado por diferentes tipos de patógenos, tais como bactérias, vírus, nematoides e fungos. Dentre os fungos, o *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, causador da murcha do fusarium, possui uma grande letalidade, podendo acarretar na morte de inúmeras plantas em diferentes estágios de desenvolvimento. (REIS, et al., 2004) O *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* é um fungo deuteromiceto de macroconídios halinos com 2 a 4 séptos e de paredes finas. Produzem estruturas reprodutivas denominadas clamidósporos, as quais possuem parede espessa e lisa, sendo extremamente resistentes e duradouros no solo, podendo permanecer viáveis durante longos períodos. (KUROZAWA; PAVAN, 1997)

Os tratamentos utilizados contra esse tipo de patógenos, em sua grande maioria, envolvem o uso extensivo de agentes químicos. Entretanto, o uso prolongado e indiscriminado desses produtos pode acarretar em danos ao meio ambiente. Tais perigos vêm fomentando a busca por métodos alternativos de controle de doenças fúngicas, utilizando princípios ativos sustentáveis. Dentre os métodos estudados, o uso de óleos essenciais apresentam notáveis resultados no controle de diferentes patógenos. (SALGADO et al., 2003).

Óleos essenciais são misturas hidrofóbicas de origem vegetal que possuem inúmeros compostos que podem agir de maneira direta, inibindo o crescimento e esporulação de fungos, ou indireta, induzindo a ação imune de vegetais, no controle de fungos fitopatológicos. Dentre os compostos de potencial antifúngicos, são destacados os pertencentes a classe dos fenilpropanoides, tais como: eugenol, carvacrol e citral (SOUZA et al., 2021)

Portando, objetificou-se avaliar o potencial antifungo do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Alegre (IFES). Os testes realizados foram desenhados para avaliar o efeito fungicida do óleo de citronela no crescimento micelial de *F. oxysporum*. Os testes *in vitro* definidos foram a inibição de crescimento micelial e inibição da formação de conídios, já o teste *in vivo* avaliou a severidade da doença em mudas de tomate do tipo Santa Cruz.

O teste de inibição micelial utilizou o método de emulsão. A emulsão consistiu em água, óleo essencial e Tween 80 na proporção de 1 para 5 cuja e concentração de 50 µL/mL de óleo essencial. Foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro esterilizadas em autoclave por 20 minutos em temperatura de 120 °C, juntamente com 5 Erlenmeyer de 100 mL contendo 60 mL meio de cultura Agar Batata Dextrose dissolvido em água destilada. Em câmara de fluxo laminar, utilizando micropipetas, foram adicionados 4 volumes de emulsão ao meio de cultura, atingindo as concentrações de: 0,14; 0,30 0,61; 1,21 µL por mL de meio de cultura. Foram vertidos 20 mL de meio em cada placa, sendo 3 repetições para cada concentração. Após a solidificação do meio, foi inoculado um disco fúngico de 0,5 cm de diâmetro com o auxílio de padronizador no centro de cada placa. O controle consistiu no meio de cultura sem o acréscimo de emulsão inoculado com o fungo, o controle consistiu no meio de cultura acrescido de solução a base de água e Tween 80 a 1%. Após a inoculação as placas foram imediatamente seladas com plástico filme, identificadas e incubadas em câmara BOD a temperatura de 25 °C sob fotoperíodo por 7 dias. O procedimento foi repetido para cada óleo essencial. Após o período de incubação, o diâmetro das colônias foi medido em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de paquímetro eletrônico.

A inibição da formação de conídios foi avaliada utilizando as mesmas amostras do teste anterior. Foi retirado de cada placa um disco fúngico de 10 mm de diâmetro situado a aproximadamente em 1 cm da margem da colônia. Cada disco foi inserido em tubos de ensaios contendo 2 mL de solução a base de água destilada e Tween 80 a 0,01%. Após agitação vigorosa por 10 segundos, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer ao microscópio com magnificação de 400 vezes.

O teste *in vivo* ocorreu na casa de vegetação do Ifes Campus Alegre. A variedade selecionada foi o tomate do tipo Santa Cruz. Foram utilizados sacos de polietileno de 1L preenchidos igualmente com terra vegetal industrial da marca Mogifertil. As mudas foram produzidas em sementeiras de poliestireno de 128 células. Cada célula foi preenchida de terra vegetal e semeadas com 3 sementes. Após 21 dias de semeadura, as mudas com folhas verdadeiras foram retiradas, lavadas e tiveram as raízes cortadas a cerca de 2 cm abaixo da região do coleto. Após isso, as plantas foram imediatamente mergulhadas em uma suspensão de conídios de por 15 minutos. A mudas foram transplantadas para os sacos, sendo 5 sacos para cada repetição. A testemunha consistiu em mudas mergulhadas em água destilada. A aplicação dos tratamentos ocorreu por aplicações diárias de 10 mL de emulsão a base de água destilada, óleo essencial e Tween 80 a 1% próximo ao caule das mudas durante 4 dias. As emulsões possuíam concentrações de 0,37; 0,75; 1,50; 3,0 µL/mL de cada óleo. O controle consistiu na aplicação de 10 mL de solução a base de água destilada e Tween 80 a 1%. Após 30 dias do transplante, a severidade da doença foi analisada utilizando a escala proposta por De Cal et al. (1995), atribuindo 1 às plantas saudáveis, 2 às plantas com folhas baixas amareladas, 3 às plantas com folhas baixas mortas e algumas superiores amareladas, 4 às plantas com folhas baixas mortas e superiores murchas e 5 às plantas mortas.

Após o registro do crescimento micelial, os resultados foram submetidos a análise de variância, assim como, estimado a concentração inibitória de 50% do crescimento do halo (CI50). Para diferenças que foram significativas no teste F ($p < 0,01$) foi realizado a comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), assim como para dados de concentração de conídios. Todas as análises descritas foram realizadas utilizando o software R Studio versão 3.5.2.

Resultados

O valor CI50 para este óleo foi estimado em 0,73 µL/mL, tendo o óleo efeito na inibição do crescimento do fungo em todas as concentrações. Os dados de inibição de inibição do óleo essencial de citronela estão expressos na tabela 1 e o gráfico para estimativa da CI50 do óleo está na figura 1.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

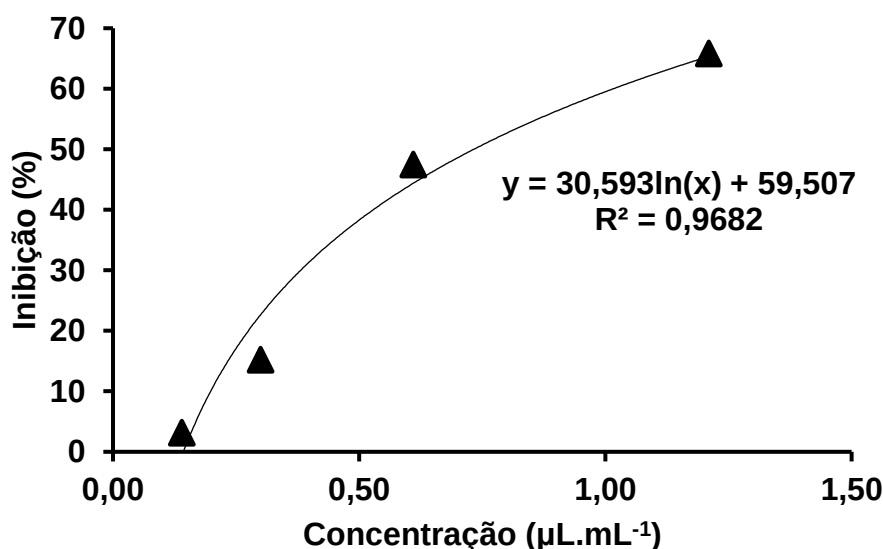
Tabela 1 - Inibição do óleo essencial de citronela no crescimento de *F. oxysporum*.

Concentração (µL/mL)	Inibição (%)
0,14 µL/mL. ^a	3 ± 2 d
0,30 µL/mL	15 ± 4 c
0,61 µL/mL	47 ± 5 b
1,21 µL/mL	66 ± 1 a
CI ₅₀	0,73 µL/mL

^a Média de inibição ± desvio padrão. Não há diferença entre as médias seguidas pela mesma letra (*p* valor > 0,05).

Fonte: o autor

Figura 1 - Estimativa da CI50 do óleo de Citronela no controle de *F. oxysporum*.



Fonte: o autor.

Após a contagem de conídios em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubaur verificou-se uma relação indiretamente proporcional entre a concentração de óleo essencial de Citronela e a concentração de conídios. Os dados de concentração de conídios de ambos dos óleos está expressa na tabela 2.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos de óleo essencial de citronela na concentração de conídios.

Tratamento (µL/mL)	Citronela
0 µL/mL	61,4 a
0,14 µL/mL	54,4 a
0,3 µL/mL	44 b
0,61 µL/mL	36,6 b
1,21 µL/mL	25,8 c

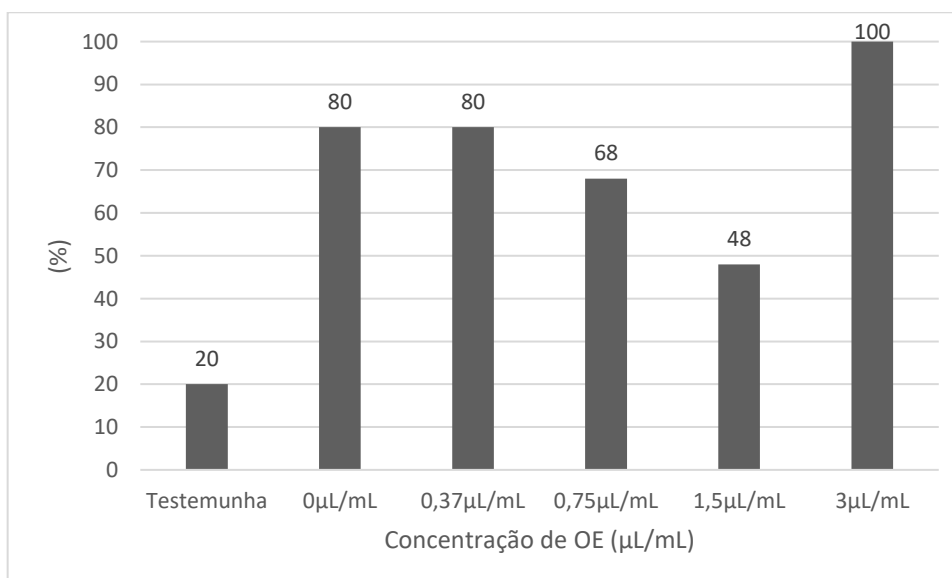
Fonte: o autor.

Para o experimento *in vivo*, após 30 dias de transplante, a análise dos dados foi transformada em valores percentuais de severidade através do índice de McKinniy, cuja equação é expressa em:

$$ID = \frac{\sum(f \cdot v)}{n \cdot x} \cdot 100$$

Em que, ID = índice de doença; f = número de plantas com determinada nota; v = nota registrada; n = número de plantas por concentração; e x = maior nota da escala. Percebeu-se que o tratamento de 3,0 µL/mL apresentou efeito fitotóxico, ocasionando na queda de folhas logo após a primeira aplicação e consecutiva morte de todas as plantas do tratamento ao final do teste. O tratamento de 1,5 µL/mL obteve o melhor resultado, possuindo severidade significativamente menor que o grupo controle. Os resultados dos índices de doença de cada tratamento estão expressos na figura 4

Figura 2 - Efeito dos diferentes tratamentos de óleo essencial de citronela no índice da doença.



Fonte: o autor

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

O óleo essencial de citronela apresentou resultados positivos em todos os testes. Em análises de caracterização, Da Silveira *et al.* (2012) identificou citronelal (41,80%) geraniol (19,63%) e α -Citronelol (10,44%) na composição do óleo. Tais compostos majoritários afetaram diferentes funções fisiológicas do fungo analisado, podendo ser resultado de oxidações ou na metabolização dos compostos em outras substâncias. Tal efeito seria decorência dos grupos alcoólicos, carbonilas e duplas ligações dos compostos do óleo essencial (SALGADO *et al.*, 2001).

O óleo ocasionou um decréscimo significativo na esporulação do fungo, juntamente com a inibição do crescimento micelial. O mesmo resultado foi encontrado no controle *in vitro* de variedades de *Fusarium solani* (CRUZ, 2015), e em *Sphaceloma ampelinum* (DE OLIVEIRA FIALHO; PAPA, 2015), demonstrando um notável potencial antifúngico do óleo de citronela em diferentes gêneros de fungos.

O controle da doença *in vivo* se mostrou inferior ao controle do fungo *in vivo*. Apesar de apresentar índice de doença significativamente menor, a concentração de 1,50 μ L/mL foi o único tratamento que obteve valor significativamente inferior ao grupo controle. O tratamento com concentração de 3,0 μ L/mL apresentou grande efeito nocivo nas mudas de tomate. A fitotoxicidade do óleo essencial de citronela também foi observada por Brum (2014) em plântulas de melancia plântulas de melancia (*C. lanatus*), feijão-carioca (*P. vulgaris*) e arroz (*O. sativa*). Essa característica pode dificultar a utilização desse método como alternativa aos tratamentos convencionais de *Fusarium oxysporum*.

Conclusão

O óleo essencial de citronela apresentou resultado significativo em todas as análises, diferenciando-se do grupo controle em ao menos uma concentração. O valor CI50 de inibição de crescimento micelial foi de 0,73 μ L/mL. O controle da doença *in vivo* obteve melhor resultado no tratamento de 1,5 μ L/mL, entretanto, a concentração de 3,00 μ L/mL apresentou efeito nocivo às mudas de tomate.

Referências

- BRUM, R. B. C. S. et al. Fitotoxicidade de óleos essenciais em plantas de melancia, feijão e arroz. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 101-109, 2014.
- CRUZ, Tatiane Paulino da et al. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* jowit (Citronela) contra *Fusarium solani*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2015.
- DE CAL, A. et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant pathology**, v. 44, n. 5, p. 909-917, 1995.
- DE OLIVEIRA FIALHO, R.; PAPA, M. F. S. Atividade antifúngica in vitro de óleos essenciais sobre *Sphaceloma ampelinum*. **Revista Cultura Agronômica**, v. 24, n. 1, p. 63-70, 2015.
- DA SILVEIRA, S. M. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro, Manual de fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas Cultivadas. **Editora agronômica Ceres Ltda**, v. 2 p 641-670, 1997.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B.; COSTA, H.; LOPES, C. A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento: boletim de pesquisa e Desenvolvimento 02**, ISSN 1677-2229, Dezembro, 2004
- SALGADO, A. et al. Constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus* e sua atividade biológica. **Poços de Caldas: SBQ**, 2001.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SALGADO, A. P. S. P. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE *Eucalyptus* SOBRE *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* E *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec., Lavras**. v.27, n.2, p.249-254, mar./abr., 2003.

SOUZA, R. V, et al. Potencial antifúngico de constituintes de óleos essenciais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e457101220537, 2021.