

Caracterização e avaliação da atividade fungicida de extrativos de madeira em fungos do gênero *Trichoderma* e *Rhizoctonia*

Characterization and evaluation of fungicide activity of wood extractives in *Trichoderma* and *Rhizoctonia*

Anderson da Silva Rabello¹; Letícia Miranda²; Marlon Correa Pereira²; Vânia Maria Moreira Valente¹; Cassiano Rodrigues de Oliveira^{1*}

1 Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba. Rodovia MG-230, Km 7, Cx. Postal 22, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil. 2 Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba. Rodovia MG-230, Km 7, Cx. Postal 22, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: cassiano.oliveira@ufv.br

Resumo Novas fontes de substrato de orquídeas são necessárias em substituição ao xaxim. Madeiras de *Eucalyptus* e de *Pinus* têm sido consideradas alternativas atrativas. Entretanto, extrativos da madeira dessas plantas, responsáveis principalmente pela coloração, cheiro, gosto e defesa do vegetal, podem inibir o desenvolvimento de fungos simbiotes das orquídeas. Este trabalho apresenta a caracterização química e a atividade biológica dos extrativos dessas plantas contra isolados fúngicos de *Trichoderma* sp. e de *Rhizoctonia*, importantes simbiotes das orquídeas. Os compostos mais representativos foram ácidos linoleico e oleico, nos extrativos de *Pinus*, e β -sitosterol em *Eucalyptus*. Os extrativos não apresentaram atividade biológica frente aos organismos testados, e conclui-se que as madeiras de *Pinus* e *Eucalyptus* apresentam potencial aplicação como substratos para o cultivo de orquídeas.

Palavras-chave: substrato, extrativos, madeira, associação mutualística.

Abstract New sources of substrate to orchids are required in order to substitute the traditional xaxim substrate. For this purpose, wood from *Eucalyptus*

and *Pinus* become attractive. However, the extractives from those wood plants, responsible for smell, taste, color and defense, can inhibit the development of orchid symbiont fungi. This work reports the chemical characterization of extractives of these plants and their biological activity against *Trichoderma* sp. and a *Rhizoctonia* isolates, important orchid symbionts. The main chemical compounds were linoleic and oleic acids, found in *Pinus*, and β -sitosterol in *Eucalyptus*. The extractives displayed no biological activity against the tested organisms, and one can conclude that *Pinus* and *Eucalyptus* wood present good potential as orchid substrates.

Keywords: substrate, extractives, wood, mutualistic association.

Introdução

O xaxim foi o principal substrato utilizado para o cultivo de plantas ornamentais por muito tempo. Ele é oriundo de uma pteridófito (*Dicksonia sellowiana*), a qual é serrada em pequenos fragmentos e usada como vaso. Porém, devido à extração de-

senfreada das espécies desse grupo, ela está ameaçada de extinção e sua extração está proibida em todo território brasileiro (Lourenzi e Souza 2001; MMA 2014).

Novas fontes de substrato têm sido estudadas na literatura, tais como, cascas das madeiras de *Eucalyptus* e de *Pinus*, para substituir o xaxim (Demattê e Demattê 1996; Araujo *et al.* 2007; Sorace *et al.* 2009; Guimarães *et al.* 2013). Entretanto, essas espécies de madeira têm em sua composição, compostos solúveis em solventes orgânicos, denominados extrativos. Esses extrativos possuem, em sua composição, vários grupos orgânicos como: esteroides, ácidos graxos, álcoois, entre outros (Philipp 1988). Algumas classes de compostos presentes nos extrativos podem inibir o crescimento microbiano.

Em algumas espécies de plantas, a associação microbiana é de extrema importância para germinação ou nutrição da planta. Os fungos micorrízicos associam-se às orquídeas, sendo indispensável na germinação das sementes e desenvolvimento do embrião (Dearnaley *et al.* 2012). Desta forma, estes fungos e outros endofíticos colonizam as raízes das orquídeas adultas, sendo potenciais promovedores do crescimento das mudas ao favorecer a absorção de nutrientes e solubilizar aqueles nutrientes insolúveis no substrato, além de produzir hormônios de crescimento vegetal (Bayman e Otero 2006). Entretanto, compostos químicos encontrados nos extrativos das cascas de *Eucalyptus* e *Pinus* podem inibir os fungos endofíticos de raízes das mudas de orquídea (Demattê e Demattê 1996).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo extrair e caracterizar os extrativos da madeira de *Eucalyptus* e *Pinus*, assim como avaliar o efeito dos extrativos sobre o crescimento de isolados dos fungos endofíticos dos gêneros *Trichoderma* e *Rhizoctonia*, de orquídeas.

Material e Métodos

Preparo e extração das amostras de madeira

As amostras de cada gênero de madeira (*Eucalyptus* e *Pinus*) foram previamente descascadas, moídas e peneiradas, separadamente. Prepararam-se cartuchos de extração de papel de filtro, contendo 10g de madeira moída por cartucho, em triplicata. Os cartuchos de papel foram hermeticamente fechados e introduzidos em aparelho tipo Soxhlet para a extração

por solvente, em refluxo, por 4 horas. Os solventes de extração foram acetona e uma mistura de etanol:tolueno (1:2). Os solventes foram removidos em evaporador rotatório e o extrato foi acondicionado sob refrigeração. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e a água foi destilada.

Derivatização

A derivatização foi realizada conforme metodologia adaptada (Jham *et al.* 1982; Liu 1994; Ichihara e Fukubayashi 2010) em que 50mg do extrato de cada madeira foram solubilizados em 2mL de n-hexano e 0,2 mL de solução metanólica 2 molL⁻¹ de KOH. A mistura foi agitada em aparelho tipo Vortex durante 10 minutos e, logo em seguida, foram adicionados 2mL de solução saturada de NaCl, até a separação da fase orgânica. A amostra derivatizada foi acondicionada para posterior análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM)

Análise por espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Todas as amostras dos extrativos foram submetidas à análise por espectroscopia no infravermelho (IV-TF) em espectrômetro Jasco 4100 na região de 4000 a 500 cm⁻¹ com acessório de reflectância total atenuada (ATR), resolução de 4 cm⁻¹ e 256 varreduras.

Os extratos, após a derivatização, foram analisados através de injeção em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), de marca Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus com coluna RTX5 com 30 metros de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura. A temperatura inicial da coluna foi de 150°C por 2 minutos. Em seguida as taxas de aquecimentos foram de: 5°C min⁻¹ até 230°C por 7 minutos; 4°C min⁻¹ até 260°C mantida por 30 minutos; e 5°C min⁻¹ até 280°C permanecendo por 10 minutos. O volume de amostra injetada foi de 1 µL com Split 20. Outras condições da corrida foram: fluxo de gás hélio de 1 mL min⁻¹; temperaturas do injetor e do detector de 230°C e 260°C, respectivamente; com m/z 45 até 600 e controle de fluxo da coluna com velocidade linear 1mL min⁻¹.

Ensaio Biológico

Os extrativos foram submetidos a ensaios

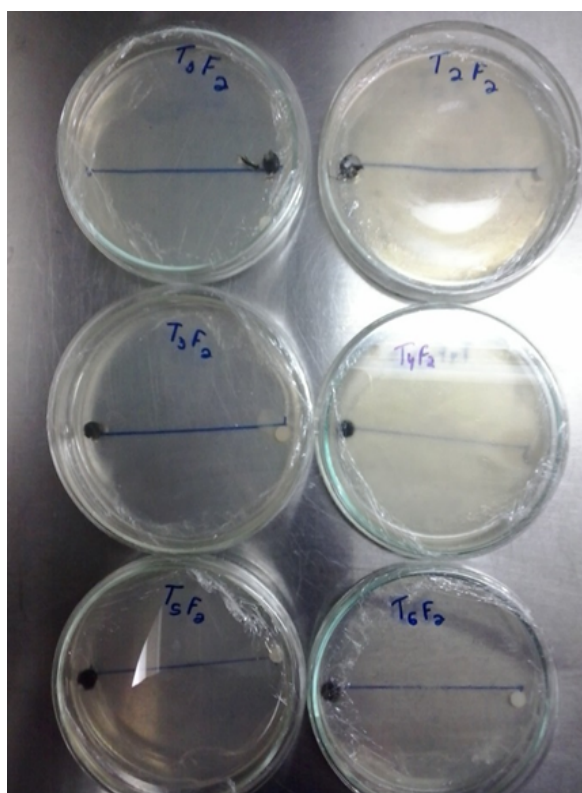


Figura 1 Esquema de inoculação dos fungos e extrativos em placas de Petri.

biológicos com dois isolados de fungos: um do gênero *Trichoderma* sp. e outro do grupo *Rhizoctonia*. Os testes de atividade fungicida foram realizados em placas de Petri com meio Batata Dextrose Agar (HIMEDIA). Foram introduzidos pequenos discos de filtros de papel, devidamente esterilizados, com uma distância de 8 cm da inoculação do fungo, com o propósito de, posteriormente, medir o halo de inibição (Figura 1). 100mg dos extrativos foram solubilizados em 10mL de acetona e 30 μ L da solução foram introduzidos nos discos. O teste foi dividido conforme a Tabela 1, onde todas as placas continham os fungos e somente o solvente e os extrativos variavam. Os fungos foram mantidos em estufa incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) a 25°C, na ausência de luz, com acompanhamento diário, durante 3 semanas.

Resultados e Discussão

Caracterização Química

Os teores médios de extrativos em acetona para as amostras de folhosas e coníferas são mostrados na Tabela 2. A variação nos teores de extrativos

se deve a diferentes fatores genotípicos ou fenotípicos, com efeitos variados na distribuição de classes orgânicas e concentração de compostos na sua composição final. Neste trabalho, não foi possível avaliar a correlação entre teores e os fatores supracitados devido à falta de identificação da procedência das amostras de madeira.

O espectro IV-TF dos extrativos de *Eucalyptus* (Figura 2) revelou uma banda de absorção larga em 3330 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de ligação O-H e outra banda de absorção em 2916 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de ligação C-H, indicando a presença de material de natureza alifática com grupos álcool. O espectro mostra também uma banda de absorção em 1714 cm^{-1} correspondente ao estiramento de ligação C=O. Essas absorções sugerem a presença de álcoois e ácidos graxos.

A análise dos extrativos de *Pinus* (Figura 3) revelou também bandas de absorção em 3432 cm^{-1} , indicando a presença de ligação O-H associada e em 2928 e 2861 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação C-H, porém, com maior intensidade, se comparado ao espectro da madeira de *Eucalyptus*, mostrando a predominância de natureza apolar nos componentes representativos. A banda em 1226 cm^{-1} indica o estiramento de ligação C-O de ésteres e a banda em 1714 cm^{-1} , o estiramento de ligação C=O.

Com esses resultados, tornou-se evidente certa similaridade de grupos funcionais entre as madeiras, indicando composição química comum, porém

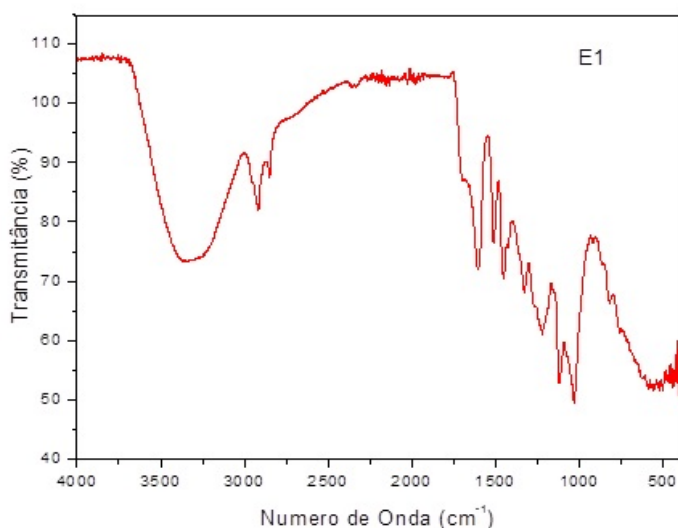


Figura 2 Espectro no Infravermelho da amostra de madeira de *Eucalyptus*.

com variações entre compostos representativos e respectivos teores.

Observou-se nos cromatogramas que os extrativos de ambas as madeiras possuem uma ampla variedade de compostos, sendo em maior número nos extratos do solvente etanol:tolueno. Além disso, são observadas variações na composição dos extratos analisados, quando há mudança de solvente, reafirmando a necessidade da aplicação de mais de um tipo de solvente extrator para uma identificação completa dos compostos contidos nos extrativos.

Os ácidos linoléico e oléico (picos 25 e 26 respectivamente, Figura 4) são os compostos mais abundantes nos extrativos da madeira de *Pinus*, enquanto para *Eucalyptus*, o composto majoritário é o β -Sitosterol (pico 30, Figura 4). Os ácidos graxos são muito comuns em óleos vegetais e o β -Sitosterol é um composto muito parecido com o colesterol, presente em muitos vegetais.

Ensaio Biológico

As placas preparadas para o teste de inibição foram observadas diariamente, ao longo de 3 semanas. Durante este período, evidenciou-se que os fungos são resistentes aos compostos orgânicos contidos nos extrativos, uma vez que seu crescimento foi homogêneo e sem formação de halo de inibição. Este resultado está de acordo com o trabalho de Guimarães *et al.* (2013) que observaram que colonização das raízes da orquídea *Cyrtopodium glutiniferum* por fungos micorrízicos era maior quando as mudas eram cultivadas em casca de *Pinus* e *Eucalyptus*, sugerindo que os compostos presentes na madeira não apresentariam

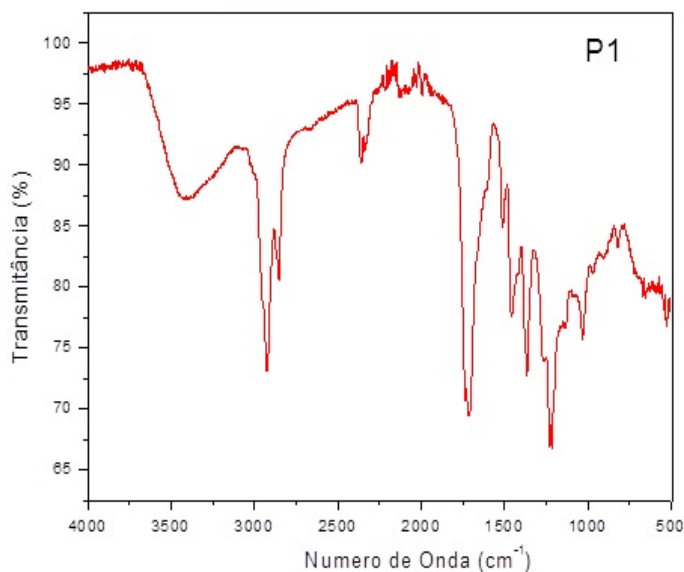


Figura 3 Espectro no Infravermelho da amostra de madeira de *Pinus*.

ação inibitória sobre o crescimento dos fungos simbiontes das orquídeas, dentre eles as *Rhizoctonias*.

Os extrativos vegetais apresentam atividades antibacteriana e antifúngica variadas. Välimaa *et al.* (2007) estudaram a atividade de 30 μ L de extratos provenientes das cascas e dos nós de 30 espécies de coníferas e folhosas com concentração de 10 mg/mL. Os pesquisadores observaram que os percentuais de inibição variaram de 0 (zero) a 85%, com diâmetros da zona de inibição variando de 0 (zero) a 15 unidades de medida.

Extratos de madeira de *Pinus* apresentam efeitos inibitórios a fungos, como *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium brevicompactum*, *Poria placenta*,

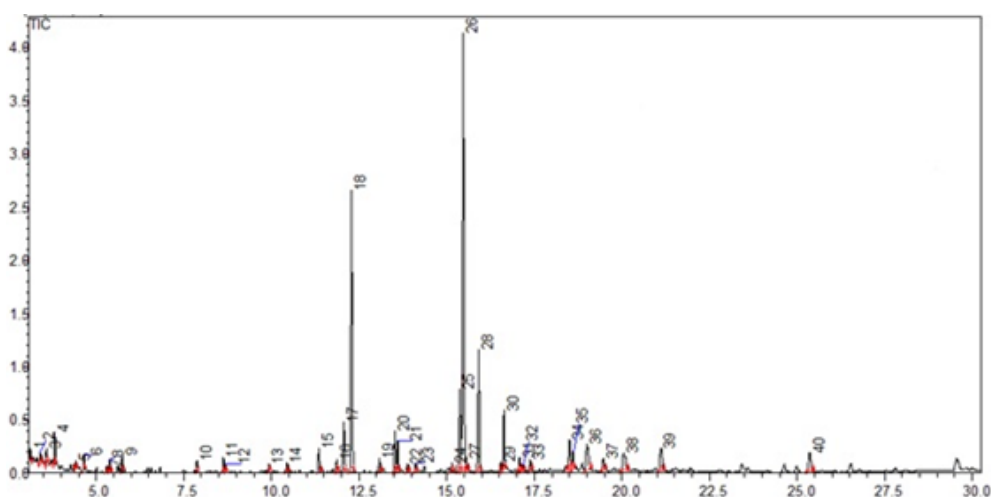


Figura 4 Cromatograma dos extrativos da madeira de *Pinus* em etanol:tolueno.

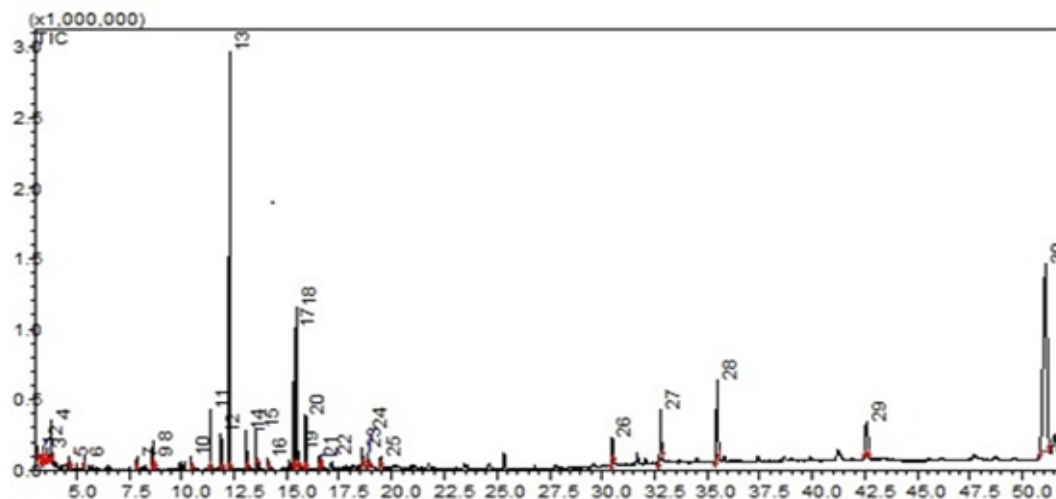


Figura 5 Cromatograma dos extrativos da madeira de *Eucalyptus* em etanol:tolueno.

Saccharomyces cerevisiae e *Trametes versicolor*, assim como várias bactérias (Lee et al. 2005; Lindberg et al. 2004; Välimaa et al. 2007; Wijayanto et al. 2015). Os autores sugerem que esse efeito pode ser explicado pela presença de derivados de pinosylvin.

Outros compostos, como cedrol e ácido linoleico, exibem certa toxicidade para um grupo das *Rhizoctonia*, a *Rhizoctonia solani* (Bajpai et al. 2004; Walters et al. 2004; Cheng et al. 2011). Para o gênero *Trichoderma*, relata-se que troponóides, tais como thujaplicina, presente em *Calocedrus macrolepis*, apresentam inibição de crescimento (Yen et al. 2008).

Os mecanismos causadores de bioatividade em fungos podem ser de atividade de metais e radicais livres, interações diretas com enzimas, rompimento da integridade da membrana e perturbações na

homeostase iônica (Valette et al. 2017).

O presente trabalho demonstra que os extrativos isolados de espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* tem toxicidade com ação biológica seletiva, pois seus respectivos compostos majoritários não apresentam níveis detectáveis de inibição biológica, na concentração avaliada, para os isolados de *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia* estudados. Dessa forma, a utilização de madeira de *Eucalyptus* e *Pinus* como substrato para cultivo de mudas de orquídeas pode ser adotada como alternativa para substituição do xaxim.

Conclusão

Os fungos estudados nesse trabalho, diferente-

Tabela 1 Esquema dos testes biológicos com os fungos: *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia*.

Placas	Extrato em Acetona		Extrato em Etanol:Tolueno	
	Pinus	Eucalipto	Pinus	Eucalipto
1*				
2**				
3	X			
4			X	
5		X		
6				X

(*) Teste de referência sem acetona.

(**) Teste de referência com acetona.

Tabela 2 Teores dos extrativos em Acetona e Etanol:Tolueno

Extrativos	% em Acetona	% em Etanol:Tolueno
Folhosas	1,96	2,14
Coníferas	1,77	1,46

mente de algumas bactérias e outras espécies de fungos, apresentaram resistência aos extrativos de madeira de *Eucalyptus* e *Pinus*. Dessa forma, a utilização de madeira de *Eucalyptus* e *Pinus* é uma alternativa viável para o cultivo de mudas de orquídeas inoculadas com simbiontes fúngicos, uma vez que os extrativos lignocelulósicos não apresentaram efeitos sobre os representantes de fungos endofíticos de orquídeas testados.

Referências

- Araujo AG, Pasqual M, Dutra LF, Carvalho JG, Soares GA (2007) Substratos alternativos ao xaxim e adubação de plantas de orquídea na fase de aclimação. **Ciência Rural**, 37: 569-571.
- Bajpai V, Shin SY, Kim MJ, Kim HR, Kang SC (2004) Anti-fungal activity of bioconverted oil extract of linoleic acid and fractionated dilutions against phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*. **Agricultural Chemistry & Biotechnology**, 47:199-204.
- Bayman PJ, Otero T (2006) Microbial endophytes of orchid roots. In: Schulz B, Boyle C, Sieber T (Eds). **Microbial root endophytes**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cheng S-S, Lin C-Y, Gu H-J, Chang S-T (2011) Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, 31: 204-217
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA (2012) Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B (Ed). **The Mycota IX: Fungal associations**, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg, 207-230.
- Demattê JBI; Demattê, MESP (1996) Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 31:803-813.
- Guimarães FAR, Pereira MC, Felício CS, Torres DP, Oliveira SF, Veloso TGR, Kasuya MCM (2013) Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasílica**, 27:590-596.
- Ichihara K, Fukubayashi Y (2010) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, 51:635-640.
- Jham GN, Telles FFF, Campos LG (1982) Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 59:132-133.
- Lee SK, Lee HJ, Min HY, Park EJ, Lee KM, Ahn YH, Cho YJ, Pyee JH (2005) Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of Pine. **Fitoterapia**, 76:258–260.
- Lindberg LE, Willför SM, Holmbom BR (2004) Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31:137–147.
- Liu K-S (1994) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 71:1179-1187.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M. 2001. **Plantas ornamentais do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção**. Portaria MMA N° 443, de 17 de dezembro de 2014.
- Philipp P, d'Almeida MLO (1988). **Celulose e papel - Volume 1. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. São Paulo, Brasil: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo, 492pp.
- Sorace M, Faria RT, Fonseca ICB, Yamamoto LY, Sorace MAF (2009) Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia* X *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, 30: 771-778.
- Valette N, Perrot T, Sormani R, Gelhaye E, Morel-Rouhier M (2017) Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews** (In press) 1-11.
- Välímäa A L, Honkalampi-Hämäläinen U, Pietari-

nen S, Willför S, Holmbom B, von Wright A. (2007) Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, 115: 235–243.

Walters D, Raynor L, Mitchell A, Walker R, Walker K (2004) Antifungal activities of four fatty acids against Plant Pathogenic fungi. **Mycopathologia**, 157: 87–90.

Wijayanto A, Dumarçay S, Gérardin-Charbonnier C, Sari RK, Syafii W, Gérardin P (2015) Phenolic and lipophilic extractives in *Pinus merkusii* Jungh. et de Vries knots and stemwood. **Industrial Crops and Products**, 69: 466-471.

Yen T-B, Chang H-T, Hsieh C-C, Chang S-T (2008). Anti- fungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. **Bioresources Technology**, 99: 4871-4877.