

**ANÁLISE DO EFEITO DE EXTRATOS NATURAIS NA INIBIÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO DO FUNGO SIMBIONTE *LEUCOAGARICUS*
GONGYLOPHORUS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL NA UTILIZAÇÃO
COMO FORMICIDA COM BASE ECOLÓGICA**

Ariane A. Tesser¹
Thatiany Silva²
Jaison A. Soares³
Yana Kutcher⁴
Talize Foppa⁵
Leyza P. de Oliveira⁶

Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP)
Curso de Farmácia
Caçador, SC

Recebido em: 15 abr. 2014
Aprovado em: 30 abr. 2014

INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde humana e o meio ambiente, está fazendo com que empresas e a própria agricultura busquem alternativas para inibir o uso de defensivos agrícolas sintéticos, e os substituam por ferramentas com controle biológico, incentivando sistemas sustentáveis. Empresas necessitam adequar-se para que possam receber o “selo verde” fornecido pelo FSC (*Forest Stewardship Council*), um conselho que oferece um sistema de acreditação de manejo sustentável (LOPES, 2008).

Dentre as pragas de maior impacto, as que vêm causando sérios danos à agricultura não só no Brasil como no mundo são as formigas, estas apresentam preferência por certas espécies de plantas, que está relacionada com a exigência nutricional do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* o qual é cultivado pela formiga para obtenção de alimento (Borba et al.2006). O uso de plantas tóxicas sobre o fungo que vive em simbiose com formigas cortadeiras tem sido proposto como um método alternativo de controle. (RIBEIRO et al., 1998).

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia da UNIARP.

² Acadêmica do Curso de Farmácia da UNIARP.

³ Biólogo, pela Universidade do Contestado- UnC.

⁴ Acadêmica do Curso de Agronomia da UNIARP.

⁵ Mestre em Farmácia. Coordenadora do Curso de Farmácia da UNIARP.

⁶ Engenheira Agrônoma, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina e Docente da UNIARP.

O objetivo do presente trabalho foi analisar e selecionar óleos promissores para o desenvolvimento e elaboração de produtos com efeito no combate e controle de formigas cortadeiras, testando óleos em diferentes concentrações frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

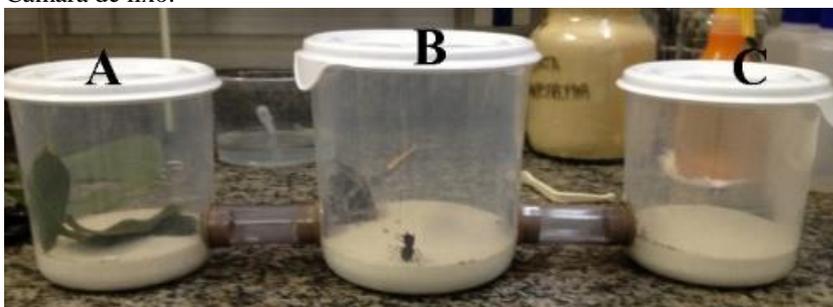
MATERIAIS E MÉTODOS

A manutenção das colônias, isolamento e os ensaios com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* foi realizado no laboratório de microbiologia da Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP, localizada em Caçador – SC.

Em outubro de 2012, na cidade de Pedreira, estado de São Paulo, foi realizado a coleta de 313 formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa* conhecidas como saúvas, para iniciar as colônias de laboratório.

As colônias foram construídas em três ambientes interligados com canos de silicone, sendo uma câmara para o jardim do fungo, uma de lixo e outra para o fornecimento de alimento, com a intenção de simular o seu habitat natural, conforme Figura 1.

Figura 1: Colônias artificiais mantidas em laboratório. A) Câmara de alimentação; B) Câmara do fungo; C) Câmara de lixo.



Fonte: Laboratório de Entomologia da ISCA Tecnologias Ltda, Ijuí, RS.

As colônias foram mantidas em laboratório longe da luz, com temperatura e umidade relativa controlada ($25 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa acima de 70%). A cada dois dias foram oferecidas folhas jovens de eucalipto, roseira e amoras pretas sem espinhos, lavadas em água corrente e secas com papel toalha. O gesso da colônia central era umidificado com água destilada.

ISOLAMENTO

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* coletado das colônias artificiais foi isolado em meio de cultura Pagnocca B (SILVA-PINHATI et al., 2005). O repique do fungo foi realizado a partir de colônias com trinta dias de crescimento em BOD 27°C \pm 2°C.

ÓLEOS ESSÊNCIAS

Foram utilizados óleos essenciais de sete plantas (Tabela 1) para os testes de efeitos fungistáticos e fungicidas.

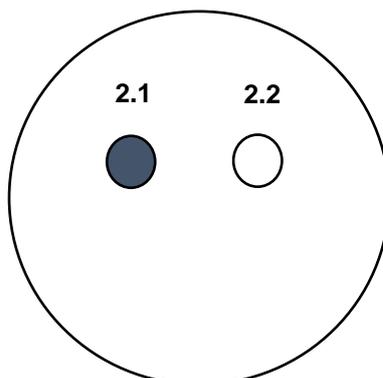
Tabela 1: Espécies vegetais utilizadas para obtenção da inibição do crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Família	Espécie
<i>Pedaliácea</i>	Gn1
<i>Cariofilácea</i>	Cv2
<i>Lamiaceae</i>	Hp3
<i>Lamiaceae</i>	Th4
<i>Lauráceas</i>	Cn5
<i>Lamiaceae</i>	Am6
<i>Rosaceae</i>	Wt7

TESTE FUNGISTÁTICO

Em um extremo da placa de Petri contendo meio de cultura Pagnocca B (SILVA-PINHATI et al., 2005) foi acrescentado a 7mm da borda, com o auxílio de um vazador um disco contendo cultura de *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 2.1) retirado da borda de uma colônia com trinta dias de crescimento. Com um vazador de mesmo diâmetro foi aberto no meio de cultura um poço que recebeu 50 μ l de óleo essencial das plantas testadas (Figura 2.2) e testado quanto a sua viabilidade por um período de sete dias.

Figura 2: 2.1) Disco de 7mm da borda da colônia de *Leucoagaricus gongylophorus*. 2.2) Poço contendo óleo essencial.



O poço da testemunha permaneceu vazio. As culturas foram incubadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, em BOD, durante 21 dias. Foram realizadas cinco repetições de cada tratamento. Após esse período, mediu-se a distância de crescimento do fungo na posição frontal em relação ao poço. Foi determinada a distância percorrida pelo fungo em direção à borda do poço, e expresso os valores em porcentagem de inibição, comparando-as com a testemunha.

EFEITO FUNGICIDA

Em tubos de ensaios de 15,0 x 2,0 cm foi acrescentado 9ml de meio de cultura Pagnocca B (SILVA-PINHATI et al., 2005) adicionados 0,01mL, 0,1mL e 0,5mL em uma proporção de 0,1%, 1% e 5% respectivamente para cada tratamento (GALLO, M.B.C, 2004), homogeneizados com os óleos essenciais das plantas mencionadas na Tabela 1. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicatas.

Os tubos contendo meio de cultura, após autoclavação e acréscimo do óleo agitado por 1 minuto em vortéx, foram mantidos a temperatura ambiente por uma semana para observação de possível contaminação. O inóculo foi preparado em um elermeyer contendo água peptonada a 0,1%, fungo simbiote isolado e esferas de cristal e agitado vigorosamente até obter uma suspensão micelial homogênea.

DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA

Retirado uma alíquota de 5,0 mL de inóculo para determinar a massa seca com o objetivo de conhecer a concentração do fungo na solução. A alíquota foi transferida para um vidro de relógio e levada à uma estufa de esterilização na temperatura de 70°C por 24 horas até a massa tornar-se constante. A massa de 4-6mg/mL foi utilizada para os ensaios (GALLO, M.B.C, 2004).

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO *LEUCOAGARICUS*

GONGYLOPHORUS

Após trinta dias de incubação, a leitura dos resultados basearam-se na quantidade e

densidade do micélio, conforme padrão estabelecido (GALLO, M.B.C, 2004) abaixo:

0 = ausência de crescimento	3+= crescimento equivalente a 60 % do controle
1+= crescimento equivalente a 20 % do controle ou inferior	4+= crescimento equivalente a 80 % do controle
2+= crescimento equivalente a 40 % do controle	5+= crescimento idêntico ao do controle = 100 %

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A inibição do crescimento fúngico (efeito fungistático) pode ser observado na Tabela 2.

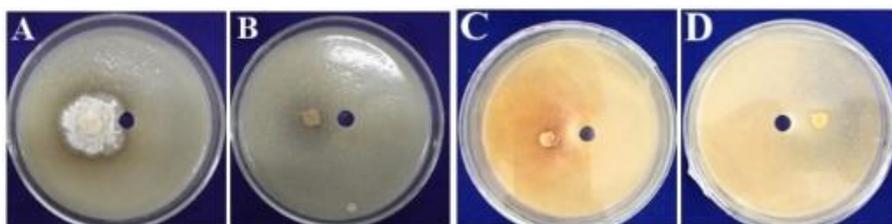
Tabela 2 – Efeito fungistático produzido pelos óleos essenciais sobre o crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*⁽¹⁾.

	Am6	Cn5	Gn1	Cv2	Hp3	Th4	Wt7
% de inibição	86	85	37	100	91	100	100

Obs: ¹ Resultados apresentados com média de cinco repetições.

Os óleos *Lamiaceae* (Th4), *Cariofilácea* (Cv2), *Rosaceae* (Wt7) inibiram 100% do crescimento fúngico como observado na Figura 3. Nestes também observou-se que ocorreu diminuição do crescimento do micélio sobre o disco, o que sugere efeito da volatilização destes óleos.

Figura 3- Inibição de 100% do desenvolvimento fúngico do *Leucoagaricus gongylophorus* provocado pelos óleos essenciais. A) Testemunha, B) *Rosaceae* (Wt7); C) *Cariofilácea* (Cv2) e D) *Lamiaceae* (Th4).

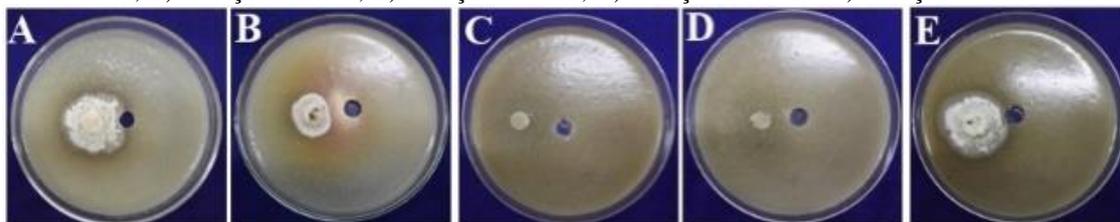


Fonte: Ariane Angela Tesser (2014).

Os óleos *Lamiaceae* (Hp3), *Lamiaceae* (Am6) e *Laurácea* (Cn5), provocaram inibição do crescimento fúngico entre 86% a 91% na concentração de 0,5%, porém foi observado que o óleo *Pedaliáceas* (Gn1) apresentou inibição abaixo de 37% conforme Figura 4. Os óleos *Laurácea* (Cn5), *Lamiaceae* (Am6) e *Lamiaceae* (Hp3) apresentaram 85% a 91% de inibição

do desenvolvimento fúngico, observou-se também, que o óleo *Pedaliácea*(Gn1), na mesma concentração (0,5%) apresentou inibição de 37%.

Figura 4: Inibição provocada pelos óleos essenciais frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. A) Testemunha; B) Inibição de 85%; C) Inibição de 86%; D) Inibição de 91% e E) Inibição de 37%.



Fonte: Ariane Angela Tesser (2014).

O efeito dos óleos essenciais capaz de causar a morte dos fungos (efeito fungicida) pode ser observado na Tabela 3.

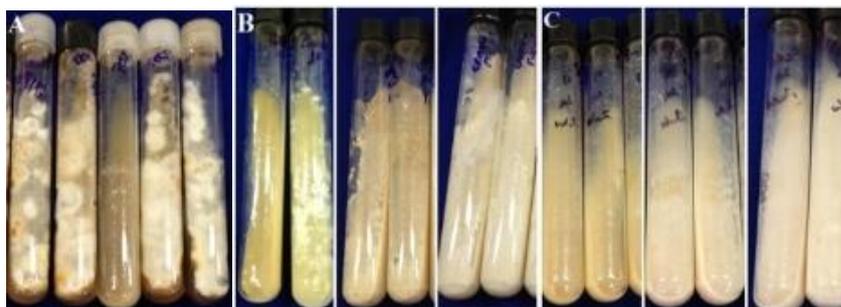
Tabela 3: Atividade de inibição dos óleos essenciais em relação ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus* ⁽¹⁾.

Substância	Inibição do Crescimento (0,1%)	Inibição do Crescimento (1%)	Inibição do Crescimento (5%)
Gn1	0	0	0
Cv2	80	100	100
Hp3	60	80	100
Th4	20	100	100
Cn5	80	80	80
Am6	80	100	100
Wt7	100	100	100

Obs: ⁽¹⁾ Resultados apresentados com média de cinco repetições.

Foram testados os óleos essenciais de *Pedaliácea* (Gn1), *Cariofilácea* (Cv2), *Lamiaceae* (Hp3 e Th4), *Laurácea* (Cn5), *Rosaceae* (Wt7), e observou uma variação da inibição de 0% a 100% em relação ao crescimento fúngico no meio contendo as diferentes concentrações de óleo. O óleo essencial que apresentou 100% de inibição em todas as concentrações testadas foi o *Rosaceae* (Wt7), conforme Figura 5. Na faixa de inibição de 80% a 100% encontram-se os óleos essenciais *Lamiaceae* (Am6) e *Cariofilácea* (Cv2), com inibição de 100% nas duas concentrações mais altas e o óleo essencial *Laurácea* (Cn5), com 80% de inibição nas três concentrações.

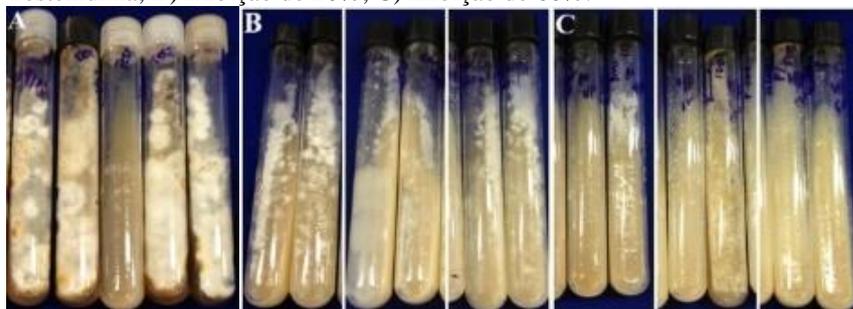
Figura 5: Inibição de 80% a 100% provocado pelos óleos essenciais nas concentrações de 0,1%, 1% e 5%. A) Testemunha; B) Inibição de 80%; C) Inibição de 100%.



Fonte: Ariane Angela Tesser

O óleo essencial *Lamiaceae* (Hp3), na concentração de 0,1% provocou inibição do crescimento fúngico de 60%, sendo que, na concentração de 1% a inibição provocada foi de 80%, e com 5% provocou a inibição de 100% do crescimento fúngico. Observa-se um comportamento semelhante do óleo *Lamiaceae* (Th4), que nas concentrações mais altas (1% e 5%) testadas provocou inibição de 100% do crescimento fúngico, embora na concentração mais baixa (0,1%) o valor encontrado foi de 20%, isso pode ser observado na Figura 6, onde o resultado para as concentrações mais altas é superior a 80% e para dosagem baixa inferior a 60%.

Figura 6: Inibição de 20% a 60% provocado pelos óleos essenciais nas concentrações de 0,1%, 1% e 5%. A) Testemunha; B) Inibição de 20%; C) Inibição de 60%.



Fonte: Ariane Angela Tesser (2014).

O óleo essencial *Pedaliácea* (Gn1) incorporado ao meio de cultura, não provocou inibição do crescimento fúngico em trinta dias de observação, nas concentrações testadas de 0,1%, 1% e 5%. Entretanto, Morini 1995, concluiu a eficácia no desenvolvimento da atividade inibitória sobre o crescimento do fungo, em uma concentração de 140g de sementes de *Pedaliácea* (Gn1) em uma mistura homogênea em meio de cultura.

Segundo Peres e Dorval 2006, em pesquisas com farinhas a base de folhas (15%) e sementes (30%) de *Pedaliácea* (Gn1), apresentaram efeitos promissores em relação ao desenvolvimento do fungo, porém em um período de noventa dias para os primeiros resultados. Segundo, conhecimento popular, folhas de *Pedaliácea* (Gn1) é tradicionalmente

usada em jardins como formicida natural no combate e controle de formigas, sendo a espécie mais antiga já estudada.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o efeito fungistático e fungicida dos óleos essenciais *Lamiaceae* (Th4), *Lamiaceae* (Am6), *Cariofilácea* (Cv2) e *Rosaceae* (Wt7) apresentaram bons resultados na inibição do desenvolvimento fúngico e recomenda-se como primeira escolha para fase de testes *in vivo*. Os óleos essenciais *Laurácea* (Cn5) e *Lamiaceae* (Hp3) provocaram inibição inferior ou igual a 80% frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, recomendados como segunda escolha para testes *in vivo*, enquanto o óleo essencial *Pedaliácea* (Gn1) podem ser realizados mais estudos em relação a concentração utilizada com o objetivo de aumentar a sua eficácia.

Palavras-chaves: Formigas cortadeiras, Pagnocca, *Leucoagaricus gongylophorus* e formicida natural.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à empresa ISCA Tecnologias Ltda, pela produção dos formigueiros, apoio no fornecimento de óleos essenciais e informações técnicas, a UNIARP por viabilizar os trabalhos de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- SOUZA, Marcelo Dias; PERES, Otávio Filho; DORVAL, Alberto. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). **Revistas Unicentro**. Guarapuava, 2011.
- GALLO, Margareth Borges Coutinho. Busca de produtos naturais bioativos em plantas das famílias Myrtaceae (*Siphoneugenadensiflora* Berg) e Verbenaceae (*Vitexpolygama* Cham.). São Carlos, 2004.
- OLIVEIRA, Maria de Fátima Souza dos Santos. Controle de formigas cortadeiras (*Hymenoptera: formicidae*) com produtos naturais. Rio Claro, 2006.
- PELCZAR, Michael Joseph. Jr; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, v.2. 1996.
- PINHATI, Ana Silva; BACCI, Maurício Jr.; SIQUEIRA, Célia; SILVA, Aline; PAGNOCCA,

Fernando; BUENO, Odair; HEBLING, Maria. **Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungus of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. Rio Claro, 2005.

PERES, Otávio Filho; DORVAL, Alberto.; BERTI, Filho. **Entomofauna Associada à Teca, Tectonagrandis L.f. no Estado de Mato Grosso**. Piracicaba: IPEF, 2006.

RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; BACCI Jr., M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of Sesame Leaf Extracts Against the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, 1998.

LOPES Guilherme de Andrade. Política de uso de agroquímicos adotada pelo FSC. Curitiba, 2008.