

AValiação do potencial antifúngico de óleo essencial de tomilho e orégano e carvacrol sobre *Asperisporium caricae*

Rafael Augusto Tassan Siqueira¹, Luiza Carvalheira Moreira², Walter Cesar Celeri Bigui³, Lais Oliveira Rodrigues⁴, Willian Bucker Moraes⁴, Adilson Vidal Costa¹, Moises Zucoloto⁴

¹Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas/ Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, rafael_tassann@live.com, avcosta@hotmail.com.

²Universidade Federal de Viçosa/ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Av. PH Rolfs, S/N, Campus Universitário – 36570-090 – Viçosa – MG, Brasil, luiza.carvalheira@yahoo.com.br.

³Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas/ Departamento de Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória – ES, Brasil, walter.bigui@edu.ufes.br

⁴Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto universitário, S/N, 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, laisorodrigues@hotmail.com, willian.fito@gmail.com, moises.zucoloto@ufes.br.

Resumo

O cultivo de mamão (*Carica papaya L.*) é de grande importância para o Brasil, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador global do fruto. No entanto, a doença pinta-preta, causada por *Asperisporium caricae*, compromete a qualidade e comercialização dos frutos, exigindo controle efetivo. Os óleos essenciais (OEs) são considerados uma forma alternativa de controle, devido às propriedades biológicas que apresentam. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de OEs de orégano (OEO), tomilho (OET) e carvacrol (CAR) na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*. Foram realizados testes *in vitro* com diferentes concentrações desses compostos. O OEO e o CAR inibiram 100% da germinação dos esporos, enquanto o OET teve uma inibição inferior de 81,14%. CAR e OEO apresentaram os menores valores de concentração para inibir a germinação do patógeno em 50% e 100% (DE₅₀ e DE₁₀₀), destacando-se como alternativas promissoras aos fungicidas químicos. Esses resultados indicam que o CAR, componente majoritário dos OEs testados, pode ser uma solução eficaz para o manejo da pinta-preta, oferecendo uma alternativa natural ao controle da doença.

Palavras-chave: Controles alternativos. Fungicidas. Produtos naturais. Pinta-preta.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra – Química.

Introdução

O cultivo do mamão (*Carica papaya L.*) é uma cultura de grande relevância para o Brasil, que se destaca como o segundo maior produtor mundial e o maior exportador do fruto. Esse elevado nível de produção é favorecido pelas condições tropicais do Brasil, que são ideais para o cultivo do mamoeiro (EMBRAPA, 2018). Entretanto, a ocorrência de doenças como a pinta-preta (*Asperisporium caricae*) representa um desafio para os produtores, devido à desvalorização e inviabilidade de comercialização e exportação dos frutos afetados. Os sintomas dessa doença incluem lesões escuras circulares, que aparecem nas folhas e frutos, prejudicando sua comercialização (Amorim *et al.*, 2016; Santos Filho *et al.*, 2007).

O controle de *A. caricae* envolve a aplicação de agroquímicos no início dos sintomas da doença. No Brasil, os produtos comerciais para o controle da doença, são pertencentes a diferentes grupos químicos, como isoftalonitrila, estrobilurina, triazol, benzimidazol, alquilenobis (ditiocarbamato), imidazol e compostos inorgânicos (AGROFIT, 2019).

Devido ao uso de fungicidas químicos de forma irracional, os patógenos tendem em desenvolver resistência aos fungicidas, se tornando necessário explorar novas estratégias e produtos para o controle de doenças. Produtos naturais, como óleos essenciais (OEs) e extratos vegetais, apresentam potencial como alternativas viáveis, sendo relatado por vários autores (Goggi *et al.*, 2008; Hillen *et al.*,

2012; Kotan *et al.*, 2013; La torre *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017; Tomazoni *et al.*, 2017).

A partir de plantas como orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) é possível extração e obtenção de OEs, que possuem atividades antibacterianas e antifúngicas comprovadas (Jaafari *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2007). A atividade biológica de cada óleo essencial (OE) pode ser atribuída aos seus componentes químicos majoritários. O carvacrol (CAR) é o componente majoritário nos óleos de orégano (OEO) e tomilho (OET), representando 67,67% e 23,93% da composição, respectivamente (Gonçalves, 2018). Mediante ao exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade dos OEO, OET e CAR, composto majoritário em cada óleo, em inibir a germinação de esporos de *A. caricae*.

Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas e Florestais e no Laboratório de Análises Vegetais, ambos localizados na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em Alegre/ES. Os esporos de *A. caricae* foram coletados de folhas de mamoeiros naturalmente infectados e não tratados com agroquímicos, provenientes da área experimental da UFES, e utilizados para preparar uma suspensão com concentração de $2,0 \times 10^5$ esporos/mL, calibrada com um hemacitômetro. Os OET, OEO e CAR foram obtidos comercialmente para avaliar seu efeito na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*, seguindo a metodologia proposta por Cruz (2017).

A avaliação *in vitro* dos esporos germinados foi realizada em duas etapas: na concentração mínima do fungicida comercial Tecto®, recomendado para o controle da pinta-preta (1000 µg/mL) e nas concentrações necessárias para determinar a atividade antifúngica máxima dos compostos (0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg mL⁻¹).

Na primeira etapa foram preparadas soluções estoque dos OEs e CAR a 2000 µg/mL⁻¹, contendo 10% de DMSO e 8% de Tween 80®. Em seguida, placas de petri contendo 8 mL do meio ágar-água foram preparadas, e discos de 6 mm de diâmetro contendo o meio de cultura + OEs foram transferidos para estas placas, nas quais foram depositados ainda 20 µL da suspensão de esporos. As placas foram vedadas e levadas à câmara de demanda química de oxigênio (DBO) a 25 °C, por um período de 12 h. Após 24 h de incubação, contagem de esporos germinados através da retirada dos discos de ágar-água + OEs depositadas em lâminas para microscópio e o cálculo da porcentagem de inibição de germinação (PIG) (Edgington; Khew; Barron, 1971).

Na segunda etapa da análise, os OEs que inibiram a germinação em mais de 95% a 1000 µg/mL foram avaliados em concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Utilizou-se a metodologia descrita anteriormente, e, com base nos valores de PIG obtidos, foram ajustadas equações para os tratamentos, permitindo o cálculo das concentrações inibitórias de 50% (DE₅₀) e 100% (DE₁₀₀) da germinação dos esporos de *A. caricae* (Rodrigues, 2019).

O fungicida comercial Tecto® foi utilizado como controle positivo em ambos testes. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial, com cinco repetições. Os valores de PIG foram analisados por análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R core team, 2018).

Resultados

O teste preliminar dos OEs na concentração de 1000 µg/mL mostrou que o fungicida comercial Tecto®, o OEO e CAR foram capazes de inibir 100% da germinação dos esporos do fungo (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de inibição da germinação (PIG) de *A. caricae* de OET, OEO, CAR e Tecto® na concentração de 1000 µg mL⁻¹.

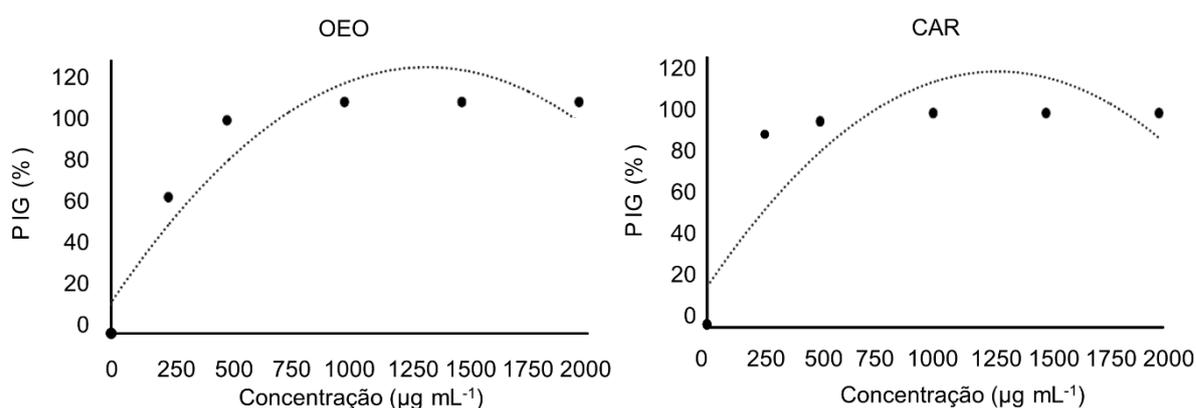
Tratamentos	PIG (%)
Tomilho	81,14 b
Orégano	100 a
Carvacrol	100 a
Tecto®	100 a

*As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p > 0.5$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No segundo teste, foram avaliadas as concentrações de 0; 250; 500; 1000; 1500 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de apenas OEO e CAR, uma vez que OET proporcionou menor atividade inibitória, comparado aos demais tratamentos, e por isso não foi avaliado nesta etapa. Com isso, foi possível perceber que o incremento da concentração de OEO e CAR foi determinante para causar aumento na inibição a germinação dos esporos do patógeno, demonstrando uma relação de proporcionalidade entre concentração e PIG (Figura 1).

Figura 1 – Efeito *in vitro* de OEO e CAR na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*, nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação do efeito dessas mesmas concentrações de OEO e CAR possibilitou estimar as concentrações necessárias para inibir 50% (DE_{50}) e 100% (DE_{100}) da germinação dos esporos de *A. caricae*, com base nas equações ajustadas.

Tabela 2 – Concentração Inibitória de 50% (DE_{50}) e 100% (DE_{100}) para a germinação de esporos de *A. caricae* em meio ágar-água, contendo OEO e CAR nas concentrações de 250; 500; 1000; 1500; e 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamentos	Equação	R^2	DE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DE_{100} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
OE Orégano	$Y = -1E-04x^2 + 0,1463x + 15,6679$	0,88	257,29	789,41
Carvacrol	$Y = -1E-04x^2 + 0,1383x + 28,3272$	0,68	166,76	690,74

Fonte: Elaborado pelo autor

Discussão

No teste inicial, o OET demonstrou uma porcentagem de inibição de 81,14%, resultando em uma diferença estatística em relação ao controle positivo. Por outro lado, tanto o OEO quanto o CAR mostraram resultados estatisticamente semelhantes ao fungicida comercial, inibindo o desenvolvimento do fungo em 100%. Ambos OET e OEO possuem o carvacrol como constituinte majoritário. Portanto, a menor ação inibitória denunciada por OET, no presente trabalho, pode ser atribuída à menor concentração deste componente majoritário em sua composição. De acordo com a literatura, o OET possui 23,93% de carvacrol em sua composição, enquanto o OEO apresenta 67,67% (Silva *et al.*, 2010; Sivropoulou *et al.*, 1996).

Já existem estudos descritos na literatura que corroboram os resultados encontrados no presente trabalho. Gonçalves (2018) demonstrou que o OEO e CAR inibiram 100% do crescimento micelial de *F. oxysporum*, nas concentrações de 400 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Viana (2013) também avaliou a atividade de OEO na germinação do mesmo patógeno e observou uma inibição de 67% na maior

concentração testada (1024 µg/mL). Essa variação na eficácia pode ser atribuída à composição do óleo essencial testado, que pode variar conforme a origem da planta da qual fora extraído. Com isso, a atividade inibitória da germinação dos óleos essenciais pode estar estritamente relacionada à porcentagem do seu respectivo constituinte majoritário (Silva *et al.*, 2010; Sivropoulou *et al.*, 1996).

No segundo teste, o CAR e o OEO apresentaram baixas concentrações para DE₁₀₀, com 690,74 µg/mL e 789,41 µg/mL, respectivamente. Esses tratamentos também demonstraram baixos valores de DE₅₀ (CAR: 166,76 µg/mL; OEO: 257,29 µg/mL), evidenciando sua eficácia fungicida de ambos compostos, especialmente de CAR. Na literatura, CAR já demonstrou eficácia no controle de diferentes patógenos. Gonçalves *et al.* (2015) realizaram estudos *in vitro* a fim de avaliar o potencial fungicida de CAR contra a germinação de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Os autores observaram que o carvacrol demonstrou eficácia no controle dos fungos, inibindo completamente seu crescimento micelial na concentração de 225 µg/mL. Neri *et al.* (2009) também relataram atividade inibitória eficaz no crescimento micelial de *Neofabraea alba* utilizando carvacrol

Desse modo, a ação inibitória de CAR frente a germinação dos esporos dos diferentes patógenos supracitados pode estar relacionada com o acúmulo de radicais superóxido que causam danos aos sistemas membrana e induzem a morte celular de fungos (Peccini, 2024).

Conclusão

Apesar da complexidade de cultivar fungos biotróficos axenicamente ser um fator limitante para estudos com *A. caricae*, o presente trabalho apresenta uma alternativa à utilização de agroquímicos convencionais, propondo a utilização promissora de produtos de origem natural, como OEO e CAR, para o controle da pinta-preta do mamoeiro, a fim de desenvolver novas formas sustentáveis que causem menor impacto ambiental e à saúde humana.

Referências

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de pragas**, Brasília, DF, 2024. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 25 ago. 2024.
- AMORIM, L. *et al.* Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 5° ed. [s.l.] **Agronômica Ceres**, 2016.
- CRUZ, T. P. **Atividade de novas moléculas de triazóis sobre *Hemileia vastatrix***. 2017. 81 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2017.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mamão**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>. Acesso em: 24 ago. 2024.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- GONÇALVES, A. H. *et al.* Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 17, n. 4, p. 1007-1015, 2015.
- GONÇALVES, D. C. **Efeito do tratamento de sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol na incidência da murcha de *Fusarium* em mudas**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.
- JAAFARI, A. *et al.* Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of *Moroccan thyme*. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

NERI, F. *et al.* Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 51, n. 3, p. 425-430, 2009.

PECCINI, L. R. *et al.* *In vitro* control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 by the innovative formulation consisting of a thymol-based emulsion, and evaluation of its effects on the vigor of tomato seeds. **Sci. Hortic.**, v. 336, p. 1-12, 2024.

PINTO, E. *et al.* *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Ind. Crops Prod.**, v. 26, n. 2, p.135-141, 2007.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <https://www.Rproject.org/>. Acesso em: 22 ago. 2024.

RODRIGUES, L. O. **Defensivos alternativos para controle da antracnose e pinta-preta em mamão**. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

SANTOS FILHO, H. P. *et al.* Monitoramento e controle da pinta preta do mamoeiro. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Comunicado Técnico (INFOTECAE)**, 2007.

SANTOS, T. L. dos *et al.* Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Cienc. Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

SILVA, J. P. L. *et al.* Óleo essencial de orégano: Interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc e Tecnol. de Aliment.**, v. 30, n. 1, 2010.

SIVROPOULOU, A. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

VIANA, W. P. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium***. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).