

## AVALIAÇÃO FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO E EUGENOL NO MANEJO DA PINTA-PRETA DO MAMOEIRO

Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla<sup>1</sup>, Rafael Augusto Tassan Siqueira<sup>1</sup>, Mariana Belizario Oliveira<sup>2</sup>, Lais Oliveira Rodrigues<sup>3</sup>, Willian Bucker Moraes<sup>3</sup>, Adilson Vidal Costa<sup>1</sup>, Moises Zucoloto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, poligazolla@hotmail.com, rafael\_tassann@live.com, avcosta@hotmail.com.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas/ Departamento Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória-ES, Brasil. belizmary@hotmail.com.

<sup>3</sup>Universidade 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

A pinta-preta (*Asperisporium caricae*) é uma doença que afeta a cultura do mamoeiro, causando lesões escuras nas folhas e nos frutos. Embora a doença se limite à parte externa do fruto, ela reduz o valor comercial do mamão. Para o controle de doenças fúngicas a utilização de produtos naturais tem se mostrado eficaz. Portanto, objetivou-se avaliar a eficiência do óleo essencial (OE) de cravo e do seu componente majoritário, eugenol, na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). No teste preliminar, o OE de cravo e o eugenol apresentaram atividade inibitória superior a 99%, o que motivou a avaliação nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para determinar as concentrações inibitórias de 50% (DE<sub>50</sub>) e 100% (DE<sub>100</sub>) da germinação dos esporos de *A. caricae*. Os valores de DE<sub>50</sub> e DE<sub>100</sub> do OE de cravo foram de 292,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 839,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para o eugenol, DE<sub>50</sub> foi de 279,59  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e DE<sub>100</sub> foi de 823,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos indicaram a eficiência do OE de cravo e do eugenol na redução da germinação de esporos do fungo *A. caricae*.

**Palavras-chave:** Mamão. *Asperisporium caricae*. Produtos naturais. 4-alil-2-metoxifenol.

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

### Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya L.*) pertence à família Caricaceae, que possui seis gêneros e um total de 35 espécies. O mamão é uma fruta valiosa por sua riqueza em antioxidantes, vitaminas, minerais e fibras, que contribuem para uma dieta equilibrada e saudável (Evans *et al.*, 2012). O cultivo desta cultura é tipicamente realizado em áreas tropicais, favorecendo o destaque do Brasil como um dos principais produtores mundiais do fruto. Segundo dados do IBGE, em 2022, o Brasil produziu 1.107.761 toneladas de mamão, posicionando-se como o segundo maior produtor mundial do fruto. Dentro do país, os estados que mais se destacam na produção de mamão são Espírito Santo, Bahia e Ceará, com produções de 426.616, 316.163 e 114.299 toneladas em 2022, respectivamente (IBGE, 2022).

A cultura do mamoeiro enfrenta problemas com doenças de caráter fúngico em todas as regiões onde é cultivada. Estima-se que os problemas fitossanitários sejam responsáveis por 25% a 40% dos danos pós-colheita na cultura do mamão, resultando em perdas de até US\$ 28 milhões para os principais países exportadores. Uma das principais doenças fúngicas que afetam essa cultura no período pós-colheita é a pinta-preta, causada pelo agente etiológico *Asperisporium caricae* (CROPLIFE, 2024). Classificada como uma das doenças mais comuns na cultura do mamoeiro, a pinta-preta se manifesta através de lesões escuras, de 1 a 6 mm, que aparecem na superfície dos frutos e na face abaxial (inferior) das folhas. Nos frutos, embora as lesões sejam superficiais, elas prejudicam sua qualidade comercial e facilitam a invasão por patógenos que causam podridões durante a pós-colheita (Medina *et al.*, 2003; Rezende *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008).

Devido ao uso excessivo de químicos, os patógenos frequentemente desenvolvem resistência a esses produtos, tornando crucial a pesquisa de métodos alternativos de controle de doenças para reduzir danos e perdas (Moraes *et al.*, 2008). Produtos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais, são considerados alternativas promissoras, sendo reportados por diversos autores como uma abordagem eficaz (Hillen *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2017; Tomazoni *et al.*, 2017).

Plantas como o cravo (*Syzygium aromaticum*), podem produzir metabólitos secundários denominados óleos essenciais, que possuem atividades antifúngicas já comprovadas (Jaafari *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2007). As atividades biológicas de cada OE são atribuídas aos componentes químicos em sua composição, como o componente majoritário eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol) representando 88.58% da composição (Chaieb *et al.*, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o OE de cravo, e do componente majoritário, eugenol, quanto à capacidade de inibir a germinação de esporos de *A. caricae*.

## Metodologia

Para realização dos ensaios fungicidas, os esporos de *A. caricae* foram obtidos a partir de folhas de mamoeiros naturalmente infectadas pelo fungo e que não haviam sido previamente expostas a agroquímicos. Os esporos extraídos foram utilizados para preparar uma suspensão de esporos na concentração de  $2,0 \times 10^5$  esporos/mL, calibrada com o auxílio de um hemacitômetro (câmara de Neubauer). O óleo essencial (OE) de cravo (*Syzygium aromaticum*) e o eugenol foram obtidos comercialmente. A avaliação do efeito do OE de cravo e do eugenol na inibição da germinação dos esporos de *A. caricae* foi realizada em duas etapas, seguindo a metodologia proposta por Cruz (2017).

Inicialmente, foram preparadas 7 mL de soluções estoque do OE de cravo e do eugenol a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , contendo 10% de DMSO e 8% de Tween 80®, que ao serem incorporadas ao meio de cultura proporcionam a concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (concentração mínima do fungicida comercial Tecto®, recomendado para o controle da pinta-preta). Placas de Petri (60 x 15 mm) foram preparadas com 8 mL de meio de cultura ágar-água. Outras placas (90 x 15 mm) foram preparadas contendo 20 mL meio de cultura ágar-água + OE de cravo e eugenol a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após a solidificação dos meios, foram retirados três discos de 6 mm de diâmetro, com o auxílio de um furador, nas placas que continham ágar-água + OE de cravo e eugenol, e transferidos para as placas que continham o meio ágar-água. Após a transferência dos discos, foram depositados 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de  $2 \times 10^5$  esporos/mL de *A. caricae*, com o auxílio de uma micropipeta (20  $\mu\text{L}$  - 100  $\mu\text{L}$ ), na superfície de cada disco. As placas foram vedadas com Parafilm® e levadas para a câmara tipo BOD, a 25°C, por um fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas de incubação, a contagem dos esporos germinados foi realizada.

Na contagem da germinação dos esporos realizou-se a retirada dos discos de ágar-água + OE e eugenol da superfície das placas, e depositaram-se os mesmos em lâminas para microscópio. Logo após, procedeu-se a aplicação de uma gota de lactofenol, para paralisar a germinação dos esporos, e realização da contagem. Nas lâminas contendo o disco + lactofenol foram contados o número de esporos germinados (esporos que apresentassem tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao comprimento do esporo). A porcentagem de inibição dos esporos germinados a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  do OEs de cravo e eugenol e foi determinada com base na fórmula adaptada de porcentagem de inibição da germinação/esporulação (PIG) (Edgington *et al.*, 1971)

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (OE de cravo e eugenol, testemunha positiva (Tecto®) e testemunha negativa (meio de cultura ágar-água), com cinco repetições e três discos por repetição. Os valores obtidos de PIG foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R core team, 2018).

Após a realização da avaliação do OE de cravo e do eugenol a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , procedeu-se a avaliação em concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a fim de determinar a atividade antifúngica máxima desses compostos quanto à germinação de esporos de *A. caricae*. O procedimento experimental foi análogo ao supracitado e com os valores obtidos de PIG, foi realizado o cálculo dos valores de concentrações inibitórias para inibir 50% (DE<sub>50</sub>) e 100% (DE<sub>100</sub>) da germinação de esporos de *A. caricae*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico R (R core team, 2018).

## Resultados

De acordo com o teste inicial na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o fungicida comercial Tecto® e o eugenol foram estatisticamente semelhantes, sendo capazes de inibir 100% da germinação dos esporos do fungo. Além disso, o OE de cravo proporcionou 99,73% de inibição da germinação de esporos, sendo considerado estatisticamente igual ao componente majoritário eugenol (Tabela 1).

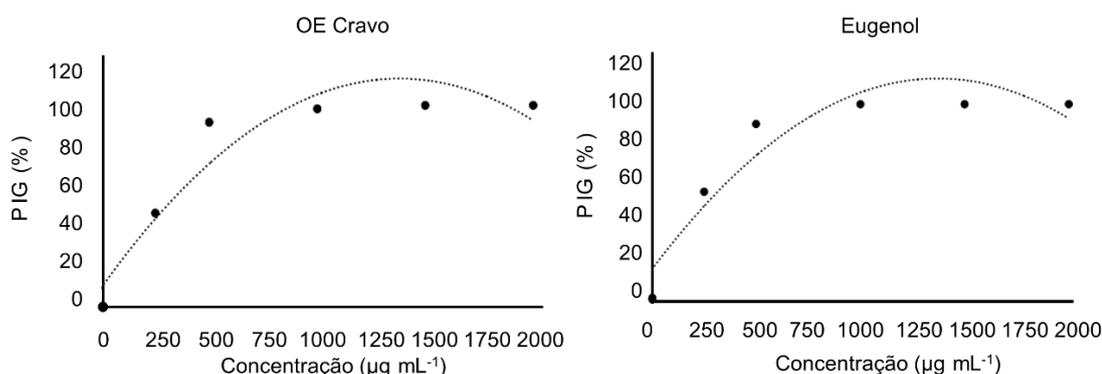
Tabela 1 – Porcentagem de inibição da germinação de esporos (PIG) de *Asperisporium caricae* por OE de cravo e eugenol na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de meio de cultura ágar-água.

Tratamentos	PIG (%)
Testemunha	0 b
OE de cravo	99,73 a
Eugenol	100 a
Tecto®	100 a

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de ScottKnott a 5% de probabilidade ( $p>0,5$ ).  
Fonte: Os autores.

Ao avaliar o efeito nas concentrações 0; 250; 500; 1000; 1500 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do OE de cravo e do componente majoritário eugenol, foi observado que ambos apresentaram diferenças quanto à inibição da germinação de esporos (Figura 1). O aumento da concentração foi determinante para ocasionar a ação inibitória do OE e seu componente majoritário.

Figura 1 - Efeito *in vitro* do OE de cravo e eugenol na inibição da germinação de esporos de *Asperisporium caricae* nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Fonte: Os autores.

Após a avaliação do efeito das diferentes concentrações do OE cravo e do componente majoritário eugenol estimou-se as concentrações inibitórias de 50% (DE<sub>50</sub>) e 100% (DE<sub>100</sub>) da germinação dos esporos de *A. caricae* conforme equações ajustadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória de 50% (DE<sub>50</sub>) e 100% (DE<sub>100</sub>) da germinação de esporos de *A. caricae* em meio ágar-água, contendo OE de cravo e eugenol nas concentrações 250; 500; 1000; 1500; 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tratamentos	Equação	DE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	DE <sub>100</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
OE de Cravo	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1481x + 10,9302$ $R^2 = 0,91$	292,74	839,16
Eugenol	$y = -1\text{E-}04x^2 + 0,1471x + 12,7811$ $R^2 = 0,91$	279,59	823,34

Fonte: Os autores.

## Discussão

No teste inicial com concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , tanto o OE de cravo quanto o componente majoritário mostraram resultados estatisticamente semelhantes ao fungicida comercial Tecto®, inibindo o desenvolvimento do fungo em 100%. Logo após a avaliação nas diferentes concentrações de 0; 250; 500; 1000; 1500; 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estimou-se as concentrações inibitórias de 50% (DE<sub>50</sub>) e 100% (DE<sub>100</sub>) da germinação dos esporos de *A. Caricae*. Para inibir 50% da germinação dos esporos de *A. Caricae* foi necessária a concentração de OE de cravo igual a  $292,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto o eugenol inibe em 50% a germinação de esporos na concentração de  $279,59 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ambos testes realizados evidenciam o potencial fungicida dos compostos testados contra a germinação de *A. Caricae*.

O desempenho eficaz do eugenol obtido sobre o crescimento micelial do fungo avaliado estão de acordo com os resultados obtidos por Costa *et al.* (2011), que avaliaram ação do óleo essencial de cravo sobre as hifas de fungos. Na análise microscópica dos micélios de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* sob ação do óleo, os autores constataram desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas, indicando degeneração celular, eventos esses que contribuíram para o controle de 100% do crescimento micelial desses fungos. Combrinck *et al.* (2011) também avaliaram (*in vitro*) o OE de cravo no controle de *Lasodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*; *Alternaria citrii*; *Penicillium digitatum*; *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*. Para todos os fitopatógenos avaliados, os valores de DE<sub>100</sub> do OE de cravo foram superiores aos DE<sub>100</sub> obtidos para *A. Caricae* no presente trabalho. Os resultados também mostraram que a concentração necessária para inibir em 100% de *L. theobromae*, *C. gloeosporioides*; *A. Alternata* e *B. cinerea*, utilizando o componente majoritário eugenol, foi superior àquela encontrada para inibição de 100% da germinação de esporos de *A. Caricae* no presente trabalho. Logo, é possível constatar maior sensibilidade de *A. caricae* aos OE de cravo e ao eugenol, quando comparados aos fitopatógenos avaliados por Combrinck *et al.* (2011).

Por fim, vale ressaltar que a complexidade de cultivar fungos biotróficos axenicamente é um fator limitante para estudos com *A. caricae*, avaliando óleos essenciais ou outros compostos, sendo necessária a realização de estudos complementares para avaliar o mecanismo de ação destes compostos sob *A. Caricae* (Garcia *et al.*, 2007; Vivas, 2014).

## Conclusão

O mamoeiro possui grande relevância socioeconômica, no entanto, a expansão desta cultura acarretou em novos desafios fitossanitários, com destaque para a pinta-preta (*A. caricae*) que prejudica significativamente a qualidade do fruto. O controle químico tem sido uma estratégia amplamente utilizada para o manejo, embora a resistência do fungo aos fungicidas comerciais devido ao uso indiscriminado de agroquímicos e o impacto ambiental sejam preocupações importantes.

Nesse contexto, novas alternativas à utilização de agroquímicos convencionais que propõem o uso de produtos de origem vegetal para o controle de doença vem sendo amplamente estudada. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do OE de cravo e do componente majoritário eugenol de inibirem a germinação de esporos de *A. caricae*, o que acarreta em um resultado promissor considerando o potencial fungicida. Todavia, estudos complementares *in vivo* e em diferentes concentrações devem ser realizados, a fim de possibilitar o desenvolvimento de novos agroquímicos alternativos para controle da doença.

## Referências

CHAIEB, K. *et al.* The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

COMBRINCK, S. *et al.* *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Ind. Crops Prod.**, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2011.

COSTA, A. R. T. *et al.* Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*(L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

CROPLIFE LATIN AMERICA. **A Antracnose, uma doença limitante para a produção de mamão.** Disponível em: <https://www.croplifela.org/pt/pragas/lista-dopragas/antracnose>. Acesso: 26 ago. 2024.

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.

EDINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

EVANS, E. A.; BALLEEN, F. H. **An overview of global papaya production, trade, and consumption.** Gainesville: University of Florida, 2012.

GARCIA, O. *et al.* Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycol. Res.**, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mamao/br>. Acesso em: 26 set. 2024.

JAAFARI, A. *et al.* Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

MEDINA, J. C. *et al.* **Pawpaw: post-harvest operation.** Organisation: Instituto Tecnológico de Veracruz (ITV), p. 70, 2003.

MORAES, W. S. *et al.* Quimioterapia de banana 'Prata anã' no controle de podridões pós-colheita. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 1, p. 79-84, 2008.

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 (2018). R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.

REZENDE, J. A. M. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p.435-444, 2005.

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

SILVA, M. B. *et al.* Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Sci. Hortic.**, v. 223, p. 72-77, 2017.

VIVAS, J. M. S. **Identificação e caracterização de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*.** 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2014.

## Agradecimentos

Os autores do presente trabalho 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) por todo apoio.