

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* DO MARACUJÁ

A.R. Figueiredo¹, L.R. Silva², T.R. Braga³, S.A. Batista⁴, M.M.T. Oliveira⁵, L.A.S. Morais⁶

1-Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia – CEP: 23897-000 – Seropédica – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 2748-6040 – e-mail: (ana.agroambiente@gmail.com)

2- Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia – CEP: 23897-000 – Seropédica – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 2748-6040 – e-mail: (rodriguesleirson365@gmail.com)

3 - Escola de Educação Profissional Edson Queiroz, CEP: 62850-000 - Cascavel - CE - Brasil, Telefone: (85) 3334-2535 - e-mail: (thayane38@hotmail.com).

4 - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, CEP: 60356-000 - Fortaleza - CE - Brasil, Telefone: (85) 3366-9752 - e-mail: (sangelabatista2003@gmail.com).

5 - Universidade Ben-Gurion do Negev, Instituto Associado Francês de Agricultura e Biotecnologia de Terras Secas - CEP: 84990-000 - Neguev - Israel, Telefone: (972) 8656-3463 – e-mail: (milena.tomaz@hotmail.com).

6 - Embrapa Agrobiologia, CEP: 23891-000 - Seropédica - RJ - Brasil, Telefone: (21) 34411500 - e-mail: (lilia.salgado.pesquisadora@gmail.com).

RESUMO – O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (cravo-botão) e *Origanum vulgare* (orégano) contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Inicialmente, foi realizado um ‘screening’ utilizando o método de difusão em ágar, onde discos de papel foram tratados com os óleos essenciais a serem testados na concentração de 320 µL/ mL. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de cada óleo essencial contra o agente etiológico. Os óleos essenciais de cravo-botão e de orégano apresentaram atividade antimicrobiana contra o fungo fitopatogênico. Os halos de inibição exibidos foram de 8,1 e 5,2 mm respectivamente. De acordo com os valores de MIC e CFM encontrados, o óleo essencial de cravo-botão apresentou uma ação inibitória mais eficaz contra *C. gloeosporioides*. Conclui-se que os óleos essenciais foram eficazes para o controle de *C. gloeosporioides in vitro*.

ABSTRACT – The present study evaluated the antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllus* (clove bud) and *Origanum vulgare* (oregano) against the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Initially a ‘screening’ was performed using the agar diffusion method, where paper discs were treated with the essential oils to be tested at a concentration of 320 µL/ mL. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (CFM) of each essential oil were determined against the etiological agent. The essential oils of clove bud and oregano showed antimicrobial activity against the phytopathogenic fungus. The inhibition halos shown were 8.1 and 5.2 mm respectively. According to the MIC and CFM values found, clove bud essential oil showed a more effective inhibitory action against *C. gloeosporioides*. It is concluded that essential oils were effective for the control of *C. gloeosporioides in vitro*.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



PALAVRAS-CHAVE: *Eugenia caryophyllus*; fitopatígeno; *Origanum vulgare*; *Passiflora*; voláteis.

KEYWORDS: *Eugenia caryophyllus*; Phytopathogen; *Origanum vulgare*; *Passiflora*; volatile.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujá vem ocupando um lugar de destaque na fruticultura tropical, um segmento que se expandiu como um todo nos últimos 30 anos. Representa uma boa opção entre as frutas por oferecer o mais rápido retorno econômico, bem como a oportunidade de uma receita distribuída pela maior parte do ano. A maioria das outras frutas leva alguns anos para entrar em produção, o que é incompatível com a necessidade imediata de renda dos produtores, descapitalizados com os prejuízos resultantes de outras atividades agrícolas (Meletti et al., 2010).

Contudo, a partir da intensificação dos cultivos, há um favorecimento ao surgimento de doenças em plantas. Frequentemente, os pomares são acometidos por fitopatógenos, o que muitas vezes torna o produto de baixa qualidade. De acordo com Russomano e Kruppa (2010) a manifestação de problemas fitossanitários podem ocasionar perdas na produção agrícola ou alterar compostos químicos da planta. Dentre as várias doenças identificadas na pós-colheita do maracujá-amarelo, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* cuja forma perfeita é o teleomorfo *Glomerella cingulata* é considerada a mais importante, ocorrendo, principalmente, em frutos desenvolvidos e sob condições de alta umidade relativa do ar e temperaturas elevadas (26°C a 28°C), acarretando uma redução no período de tempo de conservação da fruta. Além dos frutos, outras partes aéreas da planta podem ser afetadas pela ação parasitária do fitopatógeno, tais como as folhas, botões florais, gavinhas e ramos (Kimati et al., 2005).

No manejo de fitopatologias a campo, convencionalmente faz-se uso de pesticidas, no entanto, seus impactos negativos podem ocorrer tanto diretamente na saúde dos agricultores, como por contaminação de alimentos e do meio ambiente como um todo, bem como o surgimento espécies resistentes. Deste modo, há um grande desafio no controle de doenças em pós-colheita de forma sustentável, sem danos aos ecossistemas, principalmente quando se pensa em manejo de fitopatógenos em pomares de agricultura orgânica, onde não pode conter resíduos de pesticidas. Recentemente, a RDC N° 235/ 2018 tornou obrigatória a partir de 1° de janeiro de 2018 a análise de resíduos de agrotóxicos, em que seja solicitado, por meio de petição específica, para os fitoterápicos registrados, laudo de controle de qualidade que deve ser apresentada em todas as petições de registro e pós-registro, para plantas medicinais cultivadas ou coletadas no Brasil que não comprovarem o sistema orgânico.

Desde os primórdios da antiguidade, produtos naturais têm sido uma fonte rica para a descoberta de compostos bioativos a serem utilizados no desenvolvimento de medicamentos e fitoterápicos. Eles incluem drogas e outros, como corantes, matérias-primas para indústrias químicas e uma variedade de substâncias usadas para dar sabor aos alimentos. Nos últimos anos, porém, tornou-se cada vez mais evidente que muitos produtos naturais têm funções ecológicas significativas, como proteção contra ataques microbiano ou por inseto. (Hopkins e Hüner, 2008). A ciência contemporânea confirmou para o tratamento de diversas patologias a eficácia de terapias menos agressivas ao homem, de menor custo e que preservam o meio ambiente (Šantić et al., 2017). Portanto, os bio-inseticidas “Pesticidas verdes” foram publicados como uma alternativa aos inseticidas sintéticos nos setores agrícola e de saúde pública (Mossa, 2016). Assim, compostos derivados de plantas com atividade antimicrobiana são cada vez mais explorados para uso na preservação e melhoria da qualidade dos alimentos (Ejike et al., 2013). Entre os produtos naturais, os óleos essenciais se destacam. São produtos originados por meio do metabolismo secundário de plantas, possuem atividade antifúngica com grande potencial de uso no controle de fitopatógenos (Gahukar 2018).

Diante essas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* (cravo-botão) e *Origanum vulgare* (orégano), na inibição do fungo *C. gloeosporioides*, visando um promissor uso como agente fitodefensivo agrícola no controle da doença, em substituição aos fungicidas convencionais, mais nocivos ao homem e ao meio ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



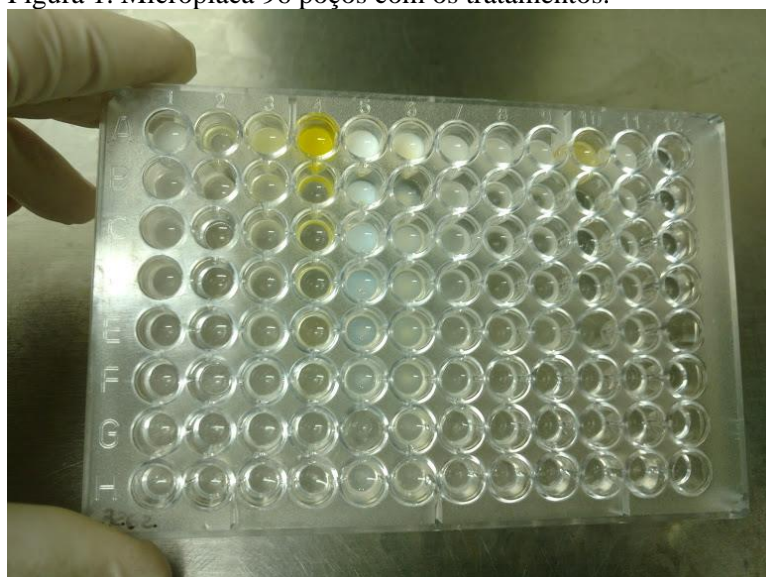
www.officeeventos.com.br

O fungo *C. gloeosporioides* foi isolado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) pelo método direto (Alfenas e Mafia, 2007; Romeiro, 2001), a partir de frutos sintomáticos coletados em novembro de 2018 no município de Paty do Alferes, Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro e recuperado em meio de cultura BDA (Chaves et al., 1973). Para os testes de atividade antimicrobiana, a suspensão fúngica teve sua densidade celular ajustada em solução salina estéril a 0,85% a fim de obter turbidez comparável à da solução padrão McFarland 0.5, a qual é equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹ (Jehl et al., 2016). Os óleos essenciais foram obtidos no comércio (marca Ferquima) e seus constituintes químicos majoritários, de acordo com o Laudo Técnico disponibilizado pelo fabricante, para o cravo-botão são o eugenol, beta-cariofileno e acetato eugenila, para o orégano, são o carvacrol, gama-terpineno, linalol, timol e para-cimeno.

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar por disco (CSLI, 2012). A suspensão fúngica foi inoculada com o auxílio de uma alça de Drigalski, por toda a superfície do meio de cultura BDA. Após, foram transferidos cinco (5) discos de papel filtro, dispostos de forma equidistantes em cada placa de Petri inoculada. Foi dispensado em cada disco de papel filtro 10 µL de cada tratamento (óleos diluídos a 320 µL/ mL em DMSO 10 % Tween 20 a 0,8%) e os controles, o fungicida tiofanato metílico 1.000 ppm e como controle negativo, o solvente DMSO 10% e Tween 20 a 0,8%. As placas foram acondicionadas em câmara incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 27° C por 24 h. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos, incluindo diâmetro do disco. Estes ensaios foram realizados em triplicado. A verificação da presença ou não de halo de inibição foi realizada aferindo-se os halos presentes por meio de um paquímetro digital.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC), foi usada a técnica da microdiluição em caldo, na qual foram utilizadas microplacas com 96 poços de fundo redondo, em triplicata, seguindo com modificações os protocolos do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012). Em cada poço da placa foram depositados 100 µL meio de cultura caldo batata-dextrose contendo 10% da suspensão fúngica e 100 µL das diluições seriadas de óleos essenciais de cada tratamento (160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1, 25 µL /mL). O controle de crescimento foi com DMSO (10%). As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a uma temperatura de 27° C a 24 horas. A MIC foi verificada mediante teste visual, estabelecida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o desenvolvimento do microrganismo, comparado ao controle (Cavalcanti et al., 2011).

Figura 1. Microplaca 96 poços com os tratamentos.



A CFM foi determinada a partir de cada inóculo do teste anterior que não apresentou crescimento em 96 horas após a incubação e os controles positivos. Dos poços que não mostraram crescimento foram retiradas três alíquotas e repicadas em BDA, mantidas a 27° C por 72 horas em câmara incubadora BOD a 28°C e após, as leituras foram efetuadas, sendo considerada a CFM, a menor concentração do óleo essencial que não apresentou crescimento visível no subcultivo (Pereira et al., 2011; Espinel-Ingroff et al., 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos bioensaios de difusão em ágar, o fungo *C. gloeosporioides* apresentou-se sensível aos óleos essenciais utilizados no presente estudo, com formação de halos de inibição ao redor dos discos de papel-filtro onde foram dispensadas as emulsões com óleos essenciais de cravo-botão e orégano. Na tabela 1, é possível observar que os dois óleos essenciais avaliados, apresentaram atividade antimicrobiana para *C. gloeosporioides*, contudo inibiram o fungo com diferenças na sensibilidade. No tratamento com o óleo essencial de cravo-botão, o halo de inibição para *C. gloeosporioides* ficou em 9,7 mm, já no tratamento com orégano, o halo exibido foi menor, o fungo testado foi menos sensível ao óleo essencial com 5,2 mm de halo. De acordo com os resultados dos testes MIC obtidos no presente estudo, os óleos essenciais de cravo-botão e orégano tiveram a MIC de 5 e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente. Houve diferenças no efeito inibitório, sendo o *C. gloeosporioides* mais sensível ao cravo-botão. A partir dos subcultivos, foi possível determinar a CFM para os óleos essenciais de cravo-botão e orégano com os valores de 20 e 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente. Nessas diluições não houve crescimento de *C. gloeosporioides*, indicando efeito fungicida dos óleos essenciais.

Tabela 1. Óleos essenciais de cravo-botão e orégano com seus principais componentes e sua ação antimicrobiana contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

Óleos essenciais	Principais componentes	DIH* (mm)	MIC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CFM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
Cravo-botão (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	Eugenol= 86% β -cariofileno= 10% Acetato Eugenila= 1% Carvacrol = 72% γ -terpineno= 4,5%	9,7	5	20
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Linalol= 4% Timol= 2% Para-cimeno= 4%	5,5	10	80

*Diâmetro do halo de inibição.

A literatura aponta que a atividade dos óleos essenciais é geralmente associada a compostos como eugenol, alicina, timol e carvacrol, linalol, que, devido às suas características hidrofóbicas, agem quebrando a parede celular microbiana, resultando na perda de sua funcionalidade (Hirasa e Takemasa, 1998; Reis et al. 2020). Os compostos carvacrol e timol são bastante citados em outros autores como responsáveis por efeitos antimicrobianos. Schorr (2018) expõe que o composto eugenol e timol também se destacaram no controle da mancha foliar em maçã, causada por *Colletotrichum fructicola* e ainda, foram testados como fungicidas para *Fusarium verticillioides* e *Rhizopus stolonifer*. Castro et al. (2017) também destacam o composto isolado eugenol como efetivo no controle ao fungo *A. alternata*. No presente estudo, não foi possível afirmar qual composto seria o responsável pelo efeito antimicrobiano ou ainda, quais compostos ou efeitos sinérgicos estariam influenciando na sua ação bioativa. Os resultados obtidos, são bastante promissores e incentivam outros estudos na área.

4. CONCLUSÃO

O uso de óleos essenciais de cravo-botão e orégano no controle de *C. gloeosporioides in vitro* mostrou resultados satisfatórios. O óleo essencial de cravo-botão apresentou resultados mais eficazes no controle de *C. gloeosporioides* com valores de MIC em 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e a CFM de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e UFRRJ pelo apoio e suporte financeiro na execução deste trabalho.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A. C. & Mafia, R. G. (2007). *Métodos em fitopatologia* (1. ed.). Viçosa: UFV.
- Altiere, M. A. (1999). *Agroecologia: Bases científicas para uma agricultura sustentável*. Porto Alegre: EMATER/RS.
- Brasil, Ministério da Saúde/ Agência de Vigilância Sanitária/ Diretoria Colegiada. (2018). *Dispõe sobre alterações e inclusões de controle de qualidade no registro e pós-registro de medicamentos dinamizados, fitoterápicos, específicos e produtos biológicos* (Resolução - RDC Nº 235, de junho de 2018). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Castro, J. C., Endo, E. H., Souza, M. R., Zanqueta, E. B., Polonio, J. C., Pamphile, J. A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D., Filho, B. A. A. (2017). Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). *Industrial Crops and Products*, 97, 101-109.
- Cavalcanti, Y. W., Almeida, L. F. D. & Padilha, W. W. N. (2011). Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. *Revista Odontológica do Brasil Central*, 20(52).
- Chaves, G. M.; Carvalho, M. G.; Cruz Filho, J.; Romeiro, R.S. (1973). *Roteiro de aulas práticas de fitopatologia*. Viçosa: UFV.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. (2012). (9. ed.). Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Ejike, C. E., Gong, M. & Udenigwe, C. C. (2013). Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food Research International*, 52(1), 167-177.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G. & Walsh, T. J. (2002). Testing conditions for determination of, minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3204-3208.
- Gahukar RT. Management of pests and diseases of important tropical/subtropical medicinal and aromatic plants: A review. (2018). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 1–18.
- Hirasa, K. & Takemasa, M. (1998). *Spice science and technology*. New York: CRC Press.
- Hopkins, W. G. & Hüner, N. P. A. (2008). *Introduction to plant physiology*. (4. ed.). Hoboken.
- Jehl, F., Bonnet, R., Bru, J., Caron, F., Cattoen, C. & Cattoir, V. (2016). *Comite de L'antibiogramme de la societe franc, aise de microbiologie*. Recommandations, 1, 117.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia Agrônômica*. (2005). (volume 2, 4. ed.). São Paulo.
- Meletti, L. M. M.; Oliveira, J. C.; Ruggiero, C. (2010). *Maracujá*. (Série Frutas Nativas, 6). Jaboticabal: FUNEP
- Mossa, A. T. H. (2016). Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9, 354-378.
- Pereira, F. O., Wanderley, P. A., Viana, F. A. C., Lima, R. B., Sousa, F. B. & Lima, E. O. (2011). Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 233-242.
- Reis, J. B., de Figueiredo, L. A., Castorani, G. M. & Veiga, S. M. O. M. (2020). Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. *Brazilian journal of health review*, 3(1), 342-363.
- Romeiro, R. S. (2001). *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV.
- Russomano, O. M. R. & Kruppa, P. C. Doenças fúngicas das plantas medicinais, aromáticas e condimentares – parte aérea. (2010). *Biológico*, 72(1), 31-37.
- Šantić, Ž., Pravdić, N., Bevanda, M., & Galić, K. (2017). The historical use of medicinal plants in traditional and medicine. *Psychiatria Danubina*, 29, 787–792.
- Schorr, R. R. (2018). *Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.