

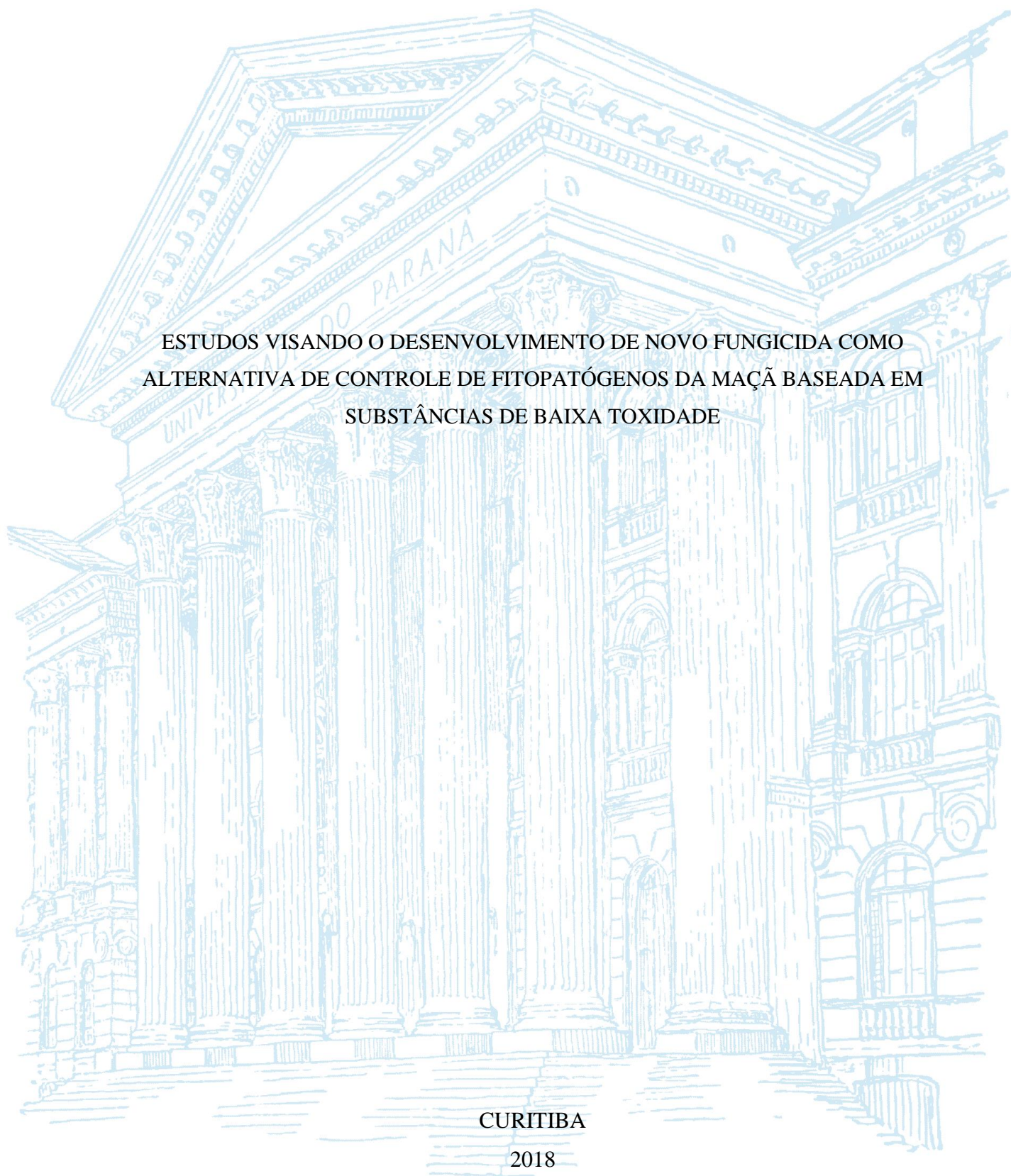
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENAN REISDÖRFER SCHORR

ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ BASEADA EM
SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE

CURITIBA

2018



RENAN REISDÖRFER SCHORR

ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ BASEADA EM
SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA ORGÂNICA, NO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA, SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO DE ASSIS MARQUES
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. LOUISE LARISSA MAY DE MIO

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S374e

Schorr, Renan Reisdörfer

Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade / Renan Reisdörfer Schorr. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Francisco de Assis Marques.Louise Larissa May de Mio

1. Fungicidas. 2. Ésteres. 3. Compostos fenólicos. 4. Colletotrichum. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Título.

CDD: 632.952

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA
COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ
BASEADA EM SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE**

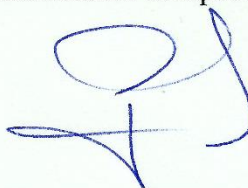
por

RENAN REISDÖRFER SCHORR

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:



Orientador:

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Júnior
Departamento Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR

Curitiba. 28 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho a minha mulher,
Ana Paula Konkol, pelo companheirismo,
dedicação, carinho, apoio e compreensão por
todos esses longos períodos de ausência. Aos
meus pais, Renê e Claudia Reisdörfer Schorr,
que nunca mediram esforços em apoiar-me em
todas as minhas escolhas e sempre estiveram
ao meu lado em todos esses anos. E a minha
irmã, Mariele Reisdörfer Schorr, pela nossa
amizade de sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, por dedicar seu tempo, para me orientar e dividir sua rica experiência, conhecimentos e ensinamentos.

A minha co-orientadora, Prof^a Dra. Louise Larissa May de Mio, pelo tempo dedicado à minha orientação, pelos valiosíssimos conselhos e a enorme contribuição para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Beatriz Helena Lameiro De Noronha Sales Maia, pelas contribuições na banca de qualificação e pelo aceite em participar da banca de avaliação dessa dissertação.

Ao prof^o Dr. Palimecio Gimenes Guerrero Junior, pelo aceite em participar da banca de avaliação dessa dissertação.

Ao Prof^o Bráz Heleno de Oliveira, pelas valiosas contribuições com a avaliação deste trabalho na banca de qualificação.

À Prof^a Maria Élide Alves Stefanello, pela correção do relatório anual e contribuições a este trabalho.

A todos os professores do departamento de química por todo conhecimento transmitido.

À UFPR, em especial, ao departamento de Química e de Fitotecnia e Fitossanitarismo pela estrutura e equipamentos, sem eles este trabalho não seria possível.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pelas leituras das placas de microdiluição.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia Química e Síntese de produtos naturais (LECOSIN), do Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças (LEMID) e do departamento de química, por toda a ajuda, amizade, conselhos e momentos de descontração.

A todos os funcionários da UFPR pelo profissionalismo e dedicação que muito contribuiu para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Tornamos nosso mundo significativo
pela coragem de nossas perguntas e pela
profundidade de nossas respostas.

(Carl Sagan)

RESUMO

A produtividade da cultura da macieira é afetada pela ocorrência de problemas fitossanitários, como as doenças. Uma das doenças mais severas que ocorrem em macieiras é chamada de Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), causadas por fungos do gênero *Colletotrichum spp.* Esta doença é de grande relevância para o Brasil, pois infecta a cultivar Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no país. Após a ocorrência da MFG, torna-se indispensável o uso de controle químico para o seu manejo, que é baseado principalmente em fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos. No entanto, o uso destes fungicidas, vêm se mostrando ineficaz, por não ser capaz de reduzir a população dos fitopatógenos em anos de maior pressão de inóculo. Por outro lado, deve-se considerar que os ditiocarbamatos são considerados extremamente tóxicos. Desta maneira, esta pesquisa avaliou a atividade biológica de substâncias presentes em óleos essenciais, bem como de alguns derivados, frente a fungos do gênero *Colletotrichum spp.*, buscando alternativas para o controle da MFG. Os compostos naturais utilizados para esta pesquisa foram, eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol. A partir destes compostos preparou-se uma série de 12 ésteres (acetatos, butiratos e benzoatos), para serem testados contra os fitopatógenos da maçã *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum nymphaeae*. Os compostos fenólicos, presentes em óleos essenciais, foram submetidos à esterificação, utilizando anidridos como agentes acilantes e piridina como solvente. Os produtos foram caracterizados por CG-EM, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os ensaios biológicos realizados, para avaliar a atividade dos compostos frente aos fitopatógenos foram, teste do crescimento micelial, concentração inibitória mínima (CIM) e teste *ex vivo* de inibição dos sintomas de MFG por contato. Os compostos mais ativos na fase de crescimento micelial e da CIM dos fitopatógenos foram, timol, carvacrol e butirato de timoíla, inibindo totalmente o crescimento micel k c n " p c " e q p e g p l v et apresentando CIM " f 3 4' B " 2 2 " 1" No teste *ex vivo*, obtiveram destaque, os compostos eugenol, timol, acetato de timoíla, acetato de carvacrila e butirato de carvacrila no controle da MFG causada por *Colletotrichum fructicola*. Os compostos eugenol, acetato de eugenila, butirato de timoíla, acetato de carvacrila e butirato de carvacrila, destacaram-se no controle da MFG causada por *Colletotrichum nymphaeae*.

Palavras-chave: Ésteres de eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol. Mancha Foliar de *Glomerella*. Ensaios biológicos. *Colletotrichum fructicola*. *Colletotrichum nymphaeae*.

ABSTRACT

The productivity of the apple tree crop is affected by the occurrence of phytosanitary problems, such as diseases. One of the most severe diseases that occur in apple trees is called *Glomerella* Leaf Spot (GLS), caused by fungi of the genus *Colletotrichum* spp. This disease is of great relevance for Brazil, as it infects the cultivar Gala and its clones, cultivars of greater comprehensiveness in the country. After the occurrence of GLS, it becomes indispensable the use of chemical control for its management, which is based mainly on fungicides of the dithiocarbamate group. However, the use of these fungicides has proved to be ineffective because it is not able to reduce the population of phytopathogens in years of higher inoculum pressure. On the other hand, dithiocarbamates should be considered as extremely toxic. In this way, this research evaluated the biological activity of substances present in essential oils, as well as of some derivatives, against fungi of the genus *Colletotrichum* spp., searching for alternatives for the control of GLS. The natural compounds used for this research were, eugenol, isoeugenol, thymol and carvacrol. From these compounds a series of 12 esters (acetates, butyrates and benzoates) were prepared for testing against the phytopathogens of the apple *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum nymphaeae*. Phenolic compounds, present in essential oils, were subjected to esterification, using anhydrides as acylating agents and pyridine as solvent. The products were characterized by GC-MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. The biological assays performed to evaluate the activity of the compounds against phytopathogens were: mycelial growth test, minimum inhibitory concentration (MIC) and *ex vivo* test of inhibition of GLS symptoms by contact. The most active compounds in the mycelial growth phase and MIC of the phytopathogens were thymol, carvacrol and thymol butyrate, totally inhibiting $125\text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ mycelial growth and presenting $100\text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ MIC. In the *ex vivo* test, the eugenol, thymol, thymol acetate, carvacrol acetate and carvacrol butyrate compounds were evaluated in the control of GLS caused by *Colletotrichum fructicola*. The compounds eugenol, eugenol acetate, thymol butyrate, carvacrol acetate and carvacrol butyrate were the most important in the control of GLS caused by *Colletotrichum nymphaeae*.

Key words: Esters of eugenol, isoeugenol, thymol and carvacrol. *Glomerella* Leaf Spot. Biological assays. *Colletotrichum fructicola*. *Colletotrichum nymphaeae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos e do grupo dos benzimidazois, usados no controle químico da MFG.....	17
Figura 2. a) Sintoma inicial de mancha foliar de <i>Glomerella</i> (MFG), b) lesão necrótica de cor o c t t q o " p q " e g p v t q " f c " o c p e j c " de senescência precoce e d) h q n j c sintomas nos frutos;.....	19
Figura 3. Estrutura do Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol.	22
Figura 4. Compostos majoritários de óleos essenciais com de destacada ação contra alguns fitopatógenos.	23
Figura 5. Ésteres derivados de timol e carvacrol, a) acetato, b) propionato, c) isobutirato, d) 3-metilbutanoato, e) (<i>E</i>)-but-2-enoato, f) benzoato e g) 2-fenilacetato de timoila ou carvacrila.	24
Figura 6. Compostos de estrutura análoga ao do carvacrol.	25
Figura 7. Esquema de montagem da placa de microdiluição.	42
Figura 8. Etapas da montagem do experimento <i>ex vivo</i> , a) tratamento das folhas, b) acomodação em caixa plástica gerbox, c) montagem da câmara úmida, d) inoculação das folhas e e) inóculo depositado sobre as folhas.	43
Figura 9. Severidade dos sintomas apresentados pela MFG, em que, a) necrose total, b) pontuações necróticas, c) e d) clorose.	44
Figura 10. Estruturas químicas dos a) compostos fenólicos selecionados para teste. b) Propostas de modificações estruturais nas substâncias fenólicas.	45
Figura 11. Derivados acetilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	46
Figura 12. Proposta de mecanismo de acetilação das substâncias fenólicas, utilizado timol como referência.	46
Figura 13. Cromatograma do produto da reação de formação de 3a e fragmentos de massas do produto majoritário.	47
Figura 14. a) Proposta de fragmentação via rearranjo com eliminação de ceteno. b) subsequente perda de radical metila.....	48
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H (200MHz, CDCl ₃), correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 6,7 e 7,3 ppm e estrutura numerada.	48
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 20 e 28 ppm.....	49
Figura 17. Derivados butirados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	50

Figura 18. Cromatograma do produto da reação de formação de 3b e fragmentos de massas do produto majoritário da reação de formação de 3b	51
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto 3b e estrutura numerada.	52
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para a) 3a , b) 3b , com estrutura química numerada.	53
Figura 21. Derivados benzoilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	53
Figura 22. Cromatograma do produto da reação de formação de 3c e fragmentos de massas do produto.....	54
Figura 23. Proposta de fragmentação para composto 3c	55
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto 3c , com expansão da região entre 6,8 e 8,4 ppm.....	55
Figura 25. Espectros de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o a) composto 3^a com expansão da região entre 20 e 28 ppm e b) composto 3c	56
Figura 26. Fragmentação de massas para (a) acetato de timoíla e (b) acetato de carvacríla.	57
Figura 27. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para 3a	58
Figura 28. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para 4a	59
Figura 29. Expansão do mapa de correlação de RMN HMBC (CDCl_3) para a) 3a e b) 4a	60
Figura 30. Placa de Microdiluição no sétimo dia de teste frente a <i>C. nymphaeae</i> , em que, a) acetato de carvacríla (4a) em gradiente de concentração, b) controle positivo, c) controle negativo.	65
Figura 31. Teste em placa de Microdiluição, com acetato de eugenila (1a) frente a <i>C. nymphaeae</i> , em que, gradiente de concentração no, a ₁) dia 1, a ₂) dia 7, controle positivo no, b ₁) dia 1, b ₂) dia 7 e c) controle negativo dia 7.	66
Figura 32. Fitotoxidez causada por eugenol em, a) replicata 1 no dia 3, b) replicata 2 no dia 3, c) replicata 1 no dia 14, d) replicata 2 no dia 14, inoculadas com <i>C. fructicola</i>	72
Figura 33. Estruturas químicas e suas respectivas numerações.....	87
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1a , com expansão da região entre 5,0 e 7,5.....	88
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1b , com expansão da região entre 5,0 e 7,5.....	89
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1c , com expansão da região entre 5,0 e 8,5.....	89

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2a , com expansão da região entre 5,5 e 7,5.....	90
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2b , com expansão da região entre 5,5 e 7,5.....	90
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2c , com expansão da região entre 6,0 e 8,5.....	91
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 6,5 e 7,5.....	92
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3b , com expansão da região entre 6,7 e 7,4.....	92
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3c , com expansão da região entre 6,5 e 8,5.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas apresentadas por alguns compostos frente a <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Tabela 2. Resumo dos efeitos de carvacrol e <i>p</i> -cimeno nos diferentes parâmetros estudados em <i>Bacillus cereus</i>	27
Tabela 3. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para 3a	58
Tabela 4. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para 4a	59
Tabela 5. Correlações a longa distância ¹ H- ¹³ C para 3a e 4a	60
Tabela 6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>C. nymphaeae</i> e <i>C. fructicola</i> nas diferentes concentrações de derivados de óleos essenciais.	61
Tabela 7. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de carvacrila (4a) frente ao fungo <i>C. nymphaeae</i>	64
Tabela 8. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de eugenila (1a) frente ao fungo <i>C. nymphaeae</i>	65
Tabela 9. CIM obtido para os tratamentos frente a <i>C. nymphaeae</i> e <i>C. fructicola</i>	66
Tabela 10. Valores de CIM encontrados por Abbaszadeh et al. contra vários fungos.	67
Tabela 11. Valores de CIM encontradas por Abbaszadeh et al. contra vários fungos.	68
Tabela 12. Valores de log P e pKa dos compostos, 1 à 4c	70
Tabela 13. Melhores resultado encontrados para a fase de crescimento micelial e da CIM para <i>C. fructicola</i> e <i>C. nymphaeae</i>	71
Tabela 14. Resultados do teste <i>ex vivo</i> em folhas de macieira inoculadas com <i>C. fructicola</i>	72
Tabela 15. Resultados teste <i>ex vivo</i> em folhas de macieira inoculadas com <i>C. nymphaeae</i>	73
Tabela 16. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com <i>C. fructicola</i>	74
Tabela 17. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com <i>C. nymphaeae</i>	74
Tabela 18. Compostos com melhores resultados para cada um dos testes biológicos.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MFG	- Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> ;
CIM	- Concentração Inibitória Mínima;
FAO	- Food and Agriculture Organization of the United Nations;
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;
AGROFIT	- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário;
IC	- Índice de controle;
ATP	- Trifosfato de adenosina;
FDA	- Food and Drug Administration;
ZI	- Zona de Inibição;
CLSM	- Confocal Laser Scanning Microscopy (Microscopia Confocal de Varredura à Laser);
CF-SE	- Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Éster succinimidílico de carboxifluoresceína);
DNA	- Ácido desoxirribonucleico;
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura;
LECOSIN	- Laboratório de Ecologia Química e Sínteses de Produtos Naturais;
LEMID	- Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças;
DQUI	- Departamento de Química;
GC-MS	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas;
CCD	- Cromatografia em camada delgada;
BDA	- batata dextrose-ágar;
DMSO	-Dimetilsulfóxido;
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards;
BD	- Batata-dextrose;
DO	- Densidade ótica;
RMN	- Ressonância magnética nuclear;
m/z	- relação massa/carga;
u.m.a.	- unidade de massa atômica;
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Correlation;
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation;
NCBI	- National Center for Biotechnology Information.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Mancha Foliar de <i>Glomerella</i>	18
1.1.1 Controle dos fitopatógenos associados à MFG	19
1.1.2 Modo de Ação dos ditiocarbamatos	20
1.2 Óleos essenciais.....	21
1.2.1 Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol	21
1.2.2 Mecanismos de ação de timol, carvacrol e eugenol	26
1.2.2.1 Atividade antibacteriana.....	26
1.2.2.2 Atividade antifúngica	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos específicos.....	31
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 Modificações estruturais.....	33
3.1.1 Procedimento Geral para a preparação de derivados acetilados.....	33
3.1.2 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Timol e Carvacrol.	35
3.1.3 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Eugenol e Isoeugenol.....	36
3.1.4 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres benzílicos dos compostos fenólicos.	38
3.2 Testes biológicos	40
3.2.1 Teste de inibição do crescimento micelial.....	40
3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)	41
3.2.3 Teste <i>ex vivo</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Acetatos derivados das substâncias fenólicas.....	45
4.2 Butiratos derivados das substâncias fenólicas.....	50
4.3 Benzoatos derivados das substâncias fenólicas.....	53

4.4	Diferenças espectrais entre os derivados acilados de timol e carvacrol	57
4.5	Teste do crescimento micelial	60
4.6	Concentração inibitória mínima	63
4.7	Teste <i>ex vivo</i>	71
5.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO 1	87
	ANEXO 2	88

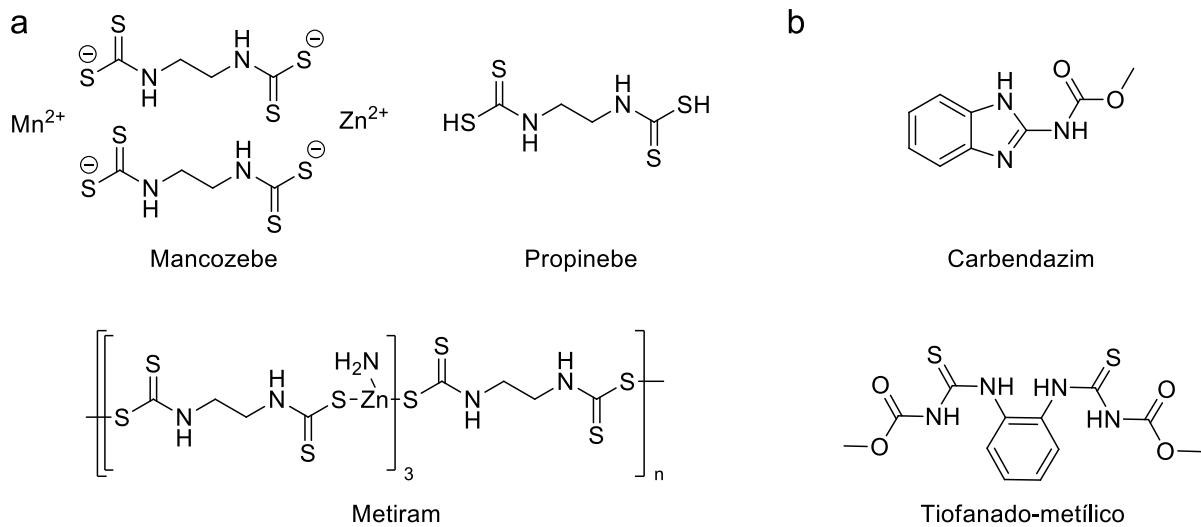
1. INTRODUÇÃO

A maçã é uma fruta de clima temperado, cultivada na Europa e Ásia desde a antiguidade. Sua variabilidade genética, permitiu a macieira, adaptar-se a diferentes ambientes. Atualmente encontra-se distribuída por quase todas as regiões do mundo, sendo consumidas das mais diversas formas (JANICK et al., 1996). Sua produção mundial alcançou o valor de 89.329.179 toneladas em 2016, sendo que a China, maior produtora da fruta, produziu 44.447.793 toneladas no ano de 2016 (FAO, 2018). O Brasil teve seus primeiros pomares comerciais na década de 70 (PETRI et al., 2011), em que, apresentou área colhida de 5.123 ha e produção de 34.192 toneladas no ano de 1975 (FAO, 2018). Atualmente o cultivo de maçãs estende-se por uma área de 33.244 ha com produção de 1.254.614 toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017), situando-se entre os maiores produtores da fruta no mundo (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2013).

A produtividade da cultura da macieira é afetada pela ocorrência de problemas fitossanitários, como por exemplo as doenças. Uma das doenças mais severas que ocorrem em macieiras é chamada de Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), ou popularmente conhecida como Mancha da Gala. O primeiro agente causal identificado para a doença foi *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002), atualmente os fungos do gênero *Colletotrichum spp.* estão relacionados com a doença (KATSURAYAMA; BONETI e BECKER, 2000). Essa doença é de importância significativa no mundo, responsável por perdas de produtividade na China (Liu et al., 2016) e apresenta grande relevância para o Brasil, pois infecta a cultivar Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no país (KATSURAYAMA; BONETI; BECKER, 2000; PETRI et al., 2011).

Após a ocorrência da MFG, torna-se indispensável o uso de controle químico para o seu manejo (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). No Ministério da Agricultura estão registrados para o controle da MFG em macieiras, 36 produtos comerciais, apresentando ingredientes ativos de diferentes grupos químicos, sendo os mais comuns, do grupo dos ditiocarbamatos, como mancozebe, propinebe e metiram, grupo dos benzimidazois, como carbendazim e tiofanato-metilico (Figura 1) e compostos inorgânicos, como óxido cuproso (MAPA, AGROFIT, 2018).

Figura 1. Fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos e do grupo dos benzimidazois, usados no controle químico da MFG.



Apesar da eficiência dos fungicidas para controle de doenças de macieiras (FISCHER et al., 2012; KOWATA et al., 2010), seus usos contínuos podem selecionar fungos patogênicos resistentes, um dos principais problemas do controle químico, não apenas de doenças de plantas, mas também, na área da saúde pública (GHINI e KIMATI, 2002). Outra problemática está no fato de que a maioria dos fungicidas atualmente disponíveis no mercado, promovem risco eminente de exposição direta a humanos quando usados de maneira incorreta, além das restrições quanto ao uso de muitos destes produtos, devido a sua carcinogenicidade, teratogenicidade, toxicidade residual alta e aguda, longos períodos necessários para degradação, poluição ambiental, seus efeitos nos alimentos e outro efeitos colaterais em humanos (TRIPATHI e DUBEY, 2004).

Algumas pesquisas realizadas, constataram a existência de patógenos da macieira, resistentes aos principais princípios ativos utilizados para controle de doenças na cultura da macieira. Moreira et al., (2016), constataram que, dentre 39 isolados de *Colletotrichum* spp. expostos a diferentes concentrações *in vitro* dos fungicidas mancozebe e tiofanato-metilico (Figura 1), 21,4% dos isolados apresentaram-se resistentes ou altamente resistentes e 35,7% dos isolados foram moderadamente resistentes para mancozebe, tratando-se de tiofanato-metilico, 73,6% apresentaram-se resistentes ou altamente resistentes. Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores (CHUNG et al., 2006; HAMADA, KATSURAYAMA e DANTAS, 2009; SUVARNA et al., 2009; TAM et al., 2008).

Portanto, é imprescindível desenvolver outras formas de controlar esses fungos, substituindo os fungicidas atualmente em uso, os quais causam tantos prejuízos para a saúde

humana e para o meio ambiente e para os quais os fungos já estão desenvolvendo resistência. Desta forma vislumbra-se poder possibilitar à sociedade alimentos mais seguros e uma relação mais equilibrada das metodologias de controle de pragas em geral com o meio ambiente.

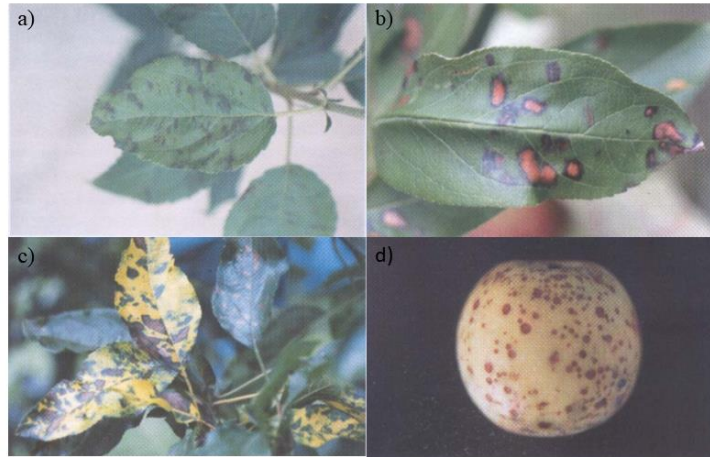
Na literatura mundial, há muitos trabalhos, indicando que o controle biológico de organismos fitopatogênicos (FERRAZ et al., 2016; GAVA et al., 2018; GIORGIO et al., 2015; ORO et al., 2018) são alternativas promissoras, que visam principalmente a substituição ou redução do uso de pesticidas mais tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente. O controle biológico é proposto também para o controle dos fungos do gênero *Colletotrichum* spp., agentes causais de inúmeras doenças em plantas, além da cultura da macieira (PESCE et al., 2018; VILAPLANA et al., 2018; LIMA et al., 2014; TIAN et al., 2018).

Na mesma linha, emerge a utilização de óleos essenciais e seus componentes majoritários, na substituição de pesticidas mais tóxicos. Muitas destas substâncias têm eficácia comprovada na conservação de alimentos, evitando a proliferação de organismos causadores de prejuízos à qualidade e segurança alimentar (ABBASZADEH et al., 2014; HINTZ et al., 2015; NOSTRO et al., 2012). Ao mesmo tempo, inúmeros trabalhos mostram a sua eficácia no controle de organismos fitopatogênicos, podendo ser considerados como alternativas promissoras para o controle de doenças de plantas (ALZATE et al., 2009; CASTRO et al., 2017; TSAO e ZHOU, 2000; XIE et al., 2017).

1.1 Mancha Foliar de *Glomerella*

A principal doença de verão da macieira é a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) (Figura 2), pois infecta a Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no Brasil (KATSURAYAMA, BONETI e BECKER, 2000). Causada por espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, o principal dano provocado por esta doença é a desfolha precoce, que pode chegar a 75% em condições favoráveis à proliferação da doença (KATSURAYAMA e BONETI, 2009). Em macieiras, a queda prematura de folhas prejudica o acúmulo de reservas, impedindo uma boa diferenciação de gemas floríferas, o que acarreta em baixa produção e má qualidade de frutos na safra seguinte (KRETZCHMAR, MARODIN e DUARTE, 2005). Adicionalmente, o controle da MFG aumenta em 10% o custo de produção, em decorrência do valor associado ao controle químico, baseado principalmente em fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (Figura 1)(KATSURAYAMA e BONETI, 2012). No entanto, em anos com maior pressão de inóculo a aplicação de fungicidas não é capaz de reduzir sua população (HAMADA, 2013).

Figura 2. a) Sintoma inicial de mancha foliar de *Glomerella* (MFG), b) lesão necrótica de cor marrom no centro



Fonte: Katsurayama, Boneti e Becker, 2000;

A severidade de MFG nas plantas aumenta nos meses de janeiro e fevereiro, quando a temperatura ambiente ultrapassa os 20°C e o período de molhamento foliar é de 10 horas, sendo que os sintomas da doença podem ser observados 45 horas após a inoculação (HAMADA, 2005). No Paraná, a MFG atinge elevados níveis de severidade devido ao clima extremamente favorável, o que deixa os pomares em condição de alta pressão de inóculo (KOWATA et al., 2010).

1.1.1 Controle dos fitopatógenos associados à MFG

O controle da MFG tem sido efetuado com a aplicação, principalmente, de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe) (Figura 1), que apresentam alto índice de controle (IC) no início do ciclo vegetativo da macieira (IC > 80%) e mediano (IC > 70%) no final, quando a pressão do inóculo aumenta (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Os fungicidas que possuem como princípio ativo, moléculas da classe dos ditiocarbamatos, podem ser classificados como fungicidas protetores. Este tipo de fungicida complementa as defesas da planta, formando uma barreira química superficial para prevenir ou proteger contra infecções. Devido as suas próprias características e modos de ação, este tipo de fungicida deve ser aplicado antes da tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro (NARAYANASAMY, 2006).

O controle baseado na aplicação de fungicidas protetores resulta em elevado número de pulverizações, que pode chegar a 15 por safra no estado de Santa Catarina (KATSURAYAMA

e BONETI, 2012). Entretanto, as normas de Produção Integrada de Maçã no Brasil (IN SDC Nº 01 de 14/09/2006) limitam o uso de fungicidas por safra, muitas vezes inviabilizando esse sistema de controle. Outro problema é o período que antecede a colheita por ser o mais crítico em relação ao ataque da doença. Pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Outro cenário preocupante foi encontrado em investigação sobre a sobrevivência do complexo *Colletotrichum* em maçã nas condições dos pomares comerciais brasileiros, realizada por Hamada e May de Mio (2017), que, investigaram a sobrevivência de *Colletotrichum* spp. em órgãos dormentes, folhas caídas e amostras de solo, em pomares comerciais de macieiras pulverizados com fungicidas durante inverno, no estado do Paraná. Neste estudo, todos os isolados (16) de galhos dormentes e folhas caídas, foram identificadas como espécies do complexo *C. acutatum*. Cinco (5) isolados de gemas dormentes foram identificados como do complexo de espécies *C. gloeosporioides* e três (3) como do complexo de espécies de *C. acutatum*. Os dados mostram que, *Colletotrichum* spp. são capazes de sobreviver durante o inverno em folhas caídas, gemas e galhos dormentes e que pulverizações realizadas com caldas a base de sais e óxidos de cobre, durante o estágio de dormência, não são capazes de eliminar completamente o inoculo.

Outro fator importante a ser considerado é a toxicidade dos ditiocarbamatos, que afetam o sistema nervoso periférico levando a degenerações como às observadas no mal de Parkinson (FRISONI e DI MONDA, 1989), além de poderem causar infertilidade (COOPER et al., 1999; CECCONI et al., 2007) e câncer (HOUETO et al., 1995).

1.1.2 Modo de Ação dos ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos, assim como, os fungicidas protetores da primeira geração (calda bordalesa, fungicidas a base de mercúrio, enxofre elementar, dicarboxamidas, ftalamidas), são conhecidos por serem inibidores multisítios, os quais interferem em processos metabólicos centrais do fungo alvo. De fato, a maioria deste fungicidas são capazes de afetar a produção de energia ou ATP, também por inibição da respiração ou por desacoplamento da fosforilação oxidativa. Fungicidas baseados em metais, tal como cobre e mercúrio, inibem uma grande variedade de enzimas envolvidas em várias rotas metabólicas. Similarmente o complexo ditiocarbamatos, inativa enzimas causando a morte celular (NARAYANASAMY, 2006).

1.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais de diferentes plantas têm mostrado atividade frente a vários microrganismos patogênicos, agentes que causam inúmeros prejuízos tanto à saúde humana e animal quanto danos econômicos (BHARDWAJ et al., 2010; CASTRO et al., 2017; MICHIELS et al., 2007; DE MORAIS et al., 2014; STARLIPER et al., 2015). Desta maneira o uso de óleos essenciais e ou de produtos naturais, podem se tornar uma alternativa para auxiliar ou até mesmo substituir os agrotóxicos sintéticos mais tóxicos.

Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades anticépticas, bactericidas, fungicidas, medicinais e por suas fragrâncias. São usados em embalagens, na preservação de alimentos, como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

Na natureza, óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção da planta contra bactérias, vírus, fungos, insetos e contra herbívoros. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004). A composição e a quantidade de óleo essencial de uma certa espécie de planta em particular, pode diferir entre estações de colheita e posição geográfica (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004).

Óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, por exemplo, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Essa mistura natural complexa pode conter, normalmente, entre 20 e 60 componentes em diferentes concentrações. Alguns são caracterizados por possuírem dois ou três componentes majoritários em altas concentrações (20 a 70%). As propriedades biológicas dos óleos essenciais podem ser determinadas pelos componentes majoritários bem como podem ser resultado de qualquer combinação mais complexa entre seus componentes (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004).

1.2.1 Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol

Eugenol e isoeugenol (Figura 3) são encontrados frequentemente como componentes majoritários dos óleos essenciais das espécies *Eugenia caryophyllata*, *Cimnopogon deial*, *Syzygium aromaticum* (cravo da índia), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) (AMIRI et al., 2008; COMBRINCK et al., 2011; XIE et al., 2017). São classificados como arilpropanoides (BAKKALI et al., 2008). O eugenol pode ser usado em aplicações tópicas para aliviar a dor e

promover a cicatrização e também é usado na medicina, e nas indústrias de fragrâncias e flavorizantes. Eugenol, também é conhecido por sua atividade antimicrobica, contra patógenos de plantas e animais (CHAIEB et al., 2007). O óleo de cravo da Índia foi listado como um r t q f w v q " õ i g t c n o g pöv"gr"genqcp"uck if ´gpt ec kf cq "Enologia, kscq c p c " E usado inclusive como aditivo alimentar contra deterioração causada por fungos e bactérias (KILDEAA, ALLANB e KEARNEY, 2004).

Timol e Carvacrol pertencem a classe dos monoterpenos, geralmente encontrados em plantas aromáticas, são compostos majoritários dos óleos essenciais das espécies, *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (tomilho), *Origanium vulgare* (*orégano*), *Origanum compactum*, entre outras (BAKKALI et al., 2008; FORNARI et al., 2012; TRIPATHI e DUBEY, 2004). Apresentam ampla atividade biológica, sendo conhecidos como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; TRIPATHI e DUBEY, 2004). Tanto timol, carvacrol e o já citado eugenol, quanto outros componentes que ocorrem em óleos essenciais (carvona, cinamaldeído, citral, *p*-cimeno, limoneno e mentol) foram registrados pela Comissão Europeia para uso como tempero em alimentos devido à falta de risco para a saúde do consumidor. A agência americana FDA também classifica estas substâncias como "seguras"(MARCHESE et al., 2016). A gama de atividades biológicas exibidas por timol e carvacrol, tornaram-nos amplamente estudados (SVIRCEV et al., 2007; ALZATE et al., 2009), como também, a relação entre suas estruturas e as atividades biológicas apresentadas, bem como, o modo de ação que apresentam sobre microrganismos (ULTEE et al., 2002; LAMBERT et al., 2001; VELDHUIZEN et al. 2006).

Figura 3. Estrutura do Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol.

Com a proposta de encontrar alternativas aos fungicidas sintéticos, para controle de 5 fitopatógenos, Combrinck et al. (2011), avaliaram a atividade antifúngica de 18 óleos essenciais, *in vitro*, frente a *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria citrii*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, isolados de mangas, abacates, citros, uvas e pera de cactos, respectivamente. Dentre os óleos essenciais testados, 3 deles,

