



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Potencial do Carvacrol no controle de *Alternaria brassicicola*

André Nunes de Oliveira

**Recife
2024**

ANDRÉ NUNES DE OLIVEIRA

POTENCIAL CARVACROL NO CONTROLE DE *Alternaria brassicicola*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientador: Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva

RECIFE-PE
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

048p

Oliveira , André Nunes de

Potencial do carvacrol no controle de *Alternaria brassicicola* / André Nunes de Oliveira . - 2024.
54 f. : il.

Orientador: Delson .

Coorientador: Marcia Vanusa da .

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2024.

1. Terpenos . 2. Mancha de alternaria . 3. Controle alternativo . 4. Brássicas . I. , Delson, orient. II. , Marcia Vanusa da, coorient. III. Título

CDD

POTENCIAL CARVACROL NO CONTROLE DE *Alternaria brassicicola*

ANDRÉ NUNES DE OLIVEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em: 25/07/2014

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Profa. Dra Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**RECIFE – PE
2024**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Domingas e Francisco, que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda força, amparo, cuidado e livramentos e por permitir a conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Aos meus pais, Maria Domingas e Francisco, por todo apoio, amor, incentivo, confiança.

A minha irmã, Gabriela, pelo amor, apoio e incentivo.

Ao meu orientador Professor Dr. Delson Laranjeira, pela orientação e ensinamentos.

A Dra. Iwanne Lima Coelho, por todo auxílio, orientações, suporte e ensinamentos durante o processo de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes, pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Aos Professores do PPGF, em especial a Dra. Rosana Blawid, Dr Marcos Câmara, Dr Ailton Reis e Dra Lilian Guimarães por todos seus ensinamentos e suporte.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e à Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pelos apoios institucionais e estruturais.

As minhas estimadas alunas de Supervisão Científica Lavinia Gabriely e Giovana Gabrielli, pelo apoio durante a realização das atividades práticas.

À toda a equipe do Laboratório Fungos de Solo – LAFSOL/UFRPE em especial a Sérgio, Lavinia, Giovana e Nágila pelos bons momentos vividos

A Iwanne, por ter sido uma grande amiga, que esteve sempre ao meu lado, me ouvindo, aconselhando não apenas em momentos, mas momentos de desafios e conquistas.

Aos meus amigos, Dayla Geovanna, Ana Grabriele, Ingrid Duarte, Elder Felipe, Sérgio Ramos, Neri Antonio, pelo companheirismo e auxílio em muitos momentos, mas principalmente pelas risadas que compartilhamos.

Aos meus vizinhos Rachel e Sóstenes por toda amizade e amparo durante todo o mestrado.

A todos os meus amigos e familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	-
GENERAL ABSTRACT	-
CAPÍTULO I	-
Introdução Geral	-
Cultivo de hortaliças	2
Família Brassicaceae	2
Mancha de alternaria	3
Controle químico	5
Óleos essenciais	8
Carvacrol	7
Referências Bibliográficas	10
CAPÍTULO II	14
Potencial do carvacrol no controle in vitro de <i>Alternaria brassicicola</i> e análise da fitotoxicidade em sementes de brássicas.....	15
Resumo	15
Introdução	16
Material e métodos	18
Resultados	21
Discussão	23
Conclusões.....	25
Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO III	44
Conclusões gerais.....	45

RESUMO GERAL

A Brassicaceae agrupa diversas espécies de importância econômica. No Brasil, variedades como repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-manteiga, (*B. oleracea* var. *acephala*) e rúcula (*Eruca sativa*) são amplamente consumidas pelo valor nutricional. A mancha de alternaria é uma das principais doenças incidente nessas culturas, provocando danos significativos na produção, inviabilizando a comercialização dessas hortaliças. Muitos terpenos, incluído o carvacrol, têm sido estudados no controle de fitopatógenos. Assim, o Objetivo foi avaliar o potencial de inibição do carvacrol frente a *Alternaria brassicicola* e verificar o sua fitotoxicidade em sementes de brássicas. A patogenicidade de quatro isolados (CFS131, CFS132, CFS135 e CFS143) de *A. brassicicola* foi confirmada em plantas de couve-manteiga, repolho e rúcula. A concentração mínima inibitória (CMI) do carvacrol, em relação a *A. brassicicola*, foi determinada pelo método de microdiluição em placas de poliestireno, com 96 poços. O potencial de inibição do crescimento micelial (PIC %) do carvacrol sobre *A. brassicicola* foi determinado pelo método de difusão em meio de cultura e sobreposição do disco micelial, utilizando diferente concentrações, e a partir dos resultados obtidos foi determinada a CE₅₀. A fitotoxicidade foi realizada em sementes de couve-manteiga, repolho e rúcula, avaliando-se diferentes concentrações de carvacrol. O efeito fungicida dos ativos clorotalonil, difenoconazol e flutriafol foi determinado sobre *A. brassicicola* na dose recomendada, duas vezes a dose recomendada e metade da dose recomenda, em relação a cada fungicida. A CMI variou entre os isolados, sendo 300 ppm para CFS131 e CFS132, 400 ppm para o isolado CFS135 e 500 ppm para CFS143. O PIC % evidenciou que a partir de 250 ppm houve 100 % de inibição dos isolados CFS131 e CFS135 e com 150 ppm o CFS132 e CFS143 foram completamente inibidos. A CE₅₀ dos isolado foi de 59,66; 91,63; 94,67 e 88,62 ppm para os isolados CFS132, CFS135, CFS131 e CFS143 respectivamente. Os químicos apresentaram efeito fungicida em todas as doses, inibindo 100 % dos quatro isolados. As sementes de couve foram tolerantes ao carvacrol, germinando 92 a 99 % em 25 a 250 ppm, reduzindo para 75 % quando exposta a 300 ppm. Em rúcula e repolho a germinação foi acima de 90 % em 25 a 100 ppm. A partir de 150 ppm, houve uma redução na germinação, sendo 50 e 75 % para repolho e rúcula, respectivamente. Em 250 e 300 ppm obteve-se 5 e 0 % de germinação para repolho, 7 e 2 % para rúcula. Os resultados apresentados nos permitem inferir que o carvacrol apresenta alto potencial para controle *in vitro* de *A. brassicicola*. Estudos adicionais devem ser conduzidos acerca potencial de controle da molécula *in vivo*.

Palavras chaves: Terpenos, Mancha de alternaria, Controle Alternativo, Brássicas.

GENERAL ABSTRACT

The Brassicaceae family includes various species of economic importance. In Brazil, varieties such as cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), collard greens (*B. oleracea* var. *acephala*), and arugula (*Eruca sativa*) are widely consumed due to their nutritional value. *Alternaria* leaf spot is one of the main diseases affecting these crops, causing significant damage to production and hindering the commercialization of these vegetables. Many terpenes, including carvacrol, have been studied for controlling plant pathogens. Thus, the objective was to evaluate the inhibitory potential of carvacrol against *Alternaria brassicicola* and assess its phytotoxicity on brassica seeds. The pathogenicity of four isolates (CFS131, CFS132, CFS135, and CFS143) of *A. brassicicola* was confirmed on collard greens, cabbage, and arugula plants. The minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol against *A. brassicicola* was determined using the microdilution method in 96-well polystyrene plates. The percentage inhibition of mycelial growth (PIC%) of carvacrol on *A. brassicicola* was determined using the culture medium diffusion method and mycelial disc overlay with varying concentrations, and from the obtained results, the EC50 was determined. Phytotoxicity was assessed on collard greens, cabbage, and arugula seeds at different concentrations of carvacrol. The fungicidal effects of the active ingredients chlorothalonil, difenoconazole, and flutriafol were determined against *A. brassicicola* at the recommended dose, twice the recommended dose, and half the recommended dose for each fungicide. MIC values varied among isolates, being 300 ppm for CFS131 and CFS132, 400 ppm for CFS135, and 500 ppm for CFS143. The PIC% indicated that at 250 ppm, there was 100% inhibition of isolates CFS131 and CFS135, and at 150 ppm, isolates CFS132 and CFS143 were completely inhibited. The EC50 values for the isolates were 59.66, 91.63, 94.67, and 88.62 ppm for CFS132, CFS135, CFS131, and CFS143, respectively. The chemicals exhibited fungicidal effects at all doses, inhibiting 100% of the four isolates. Collard seeds were tolerant to carvacrol, germinating 92 to 99% at 25 to 250 ppm, decreasing to 75% at 300 ppm. In arugula and cabbage, germination was above 90% at 25 to 100 ppm. At 150 ppm, germination decreased to 50% and 75% for cabbage and arugula, respectively. At 250 and 300 ppm, germination rates were 5% and 0% for cabbage and 7% and 2% for arugula. The results suggest that carvacrol has high potential for *in vitro* control of *A. brassicicola*. Further studies should be conducted to evaluate the potential of this molecule for *in vivo* control.

Keywords: Terpenes, *Alternaria* leaf spot, Alternative control, Brassicas

CAPÍTULO I



Introdução geral

Introdução geral

Cultivo de hortaliças

Olericultura é uma palavra que possuem origem do latim *olus*, *oleris* que significa hortaliça e *collere* que se trata de cultivar. As olerícolas ou hortaliças como são popularmente conhecidas, compõe um grande grupo de plantas cultivadas, abrigando uma importante diversidade de plantas (*Lactuca sativa* L., *Brassica oleracea* L. e *Eruca sativa* L.), tuberosas (*Solanum tuberosum* L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *Daucus carota* L. e *Raphanus sativus* L.) e alguns frutos (*Solanum lycopersicum* L., *Cucumis sativus* L., *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus* Thumb. Mansf. e *Cucurbita pepo* L.). O cultivo dessas hortaliças, geralmente, apresenta um curto ciclo de vida, com poucos ou mínimos tratos culturais intensivos quando comparadas com milho e soja. O consumo dessas hortaliças pode ser de forma natural ou processada (Haber; Marinho; Clemente, 2012; Melo; Araujo, 2016).

O mercado de olericultura no Brasil é evidenciado por seu alto desempenho atrelado a procura pelos consumidores. As hortaliças são plantas alimentícias de grande importância, apresentam características nutricionais e medicinais além de serem fontes naturais de vitaminas, sais minerais e fibras e produzem altas concentrações de fitoquímicos benéficos, como açúcares, proteínas e antioxidantes. Podem possuir substâncias funcionais que podem atuar na prevenção de doenças como hipertensão, diabetes, arteriosclerose e câncer. Além disso, por serem alimentos de baixo teor calórico, auxiliam na prevenção e controle da obesidade (Chang; Yang; Riskowski, 2013; Melo; Araujo, 2016; Mapa, 2010).

Após os anos 2000 a produção mundial das hortaliças vem crescendo e ganhando espaço no mercado, onde produtos como batata, tomate, melão, cebola, melancia, alho dentre outras olerícolas, vêm aumentando sua área plantada e sua produtividade no contexto global (De Camargo Filho; De Camargo, 2017). Segundo dados do IBGE (2017), no Brasil existem cerca de 814.10 unidades produtoras de hortaliças, que são responsáveis por um valor estimado de mais de R\$ 37 milhões de reais nos últimos anos. Na região Nordeste brasileira estão 293.782 dessas unidades produtoras, responsáveis por uma produção que rendeu mais de R\$ 4 milhões. Vale ressaltar que a olericultura pode ser considerada uma atividade econômica de alto risco devido aos problemas fitossanitários e sua sensibilidade às condições climáticas adversas (De Melo, Vilela, 2007).

Família Brassicaceae

Dentro da ordem Brassicales a maior família é a Brassicaceae, ela representa um grupo monofilético possuindo cerca de 4.000 espécies de mais de 400 gêneros, com diversas espécies

economicamente importantes empregadas na alimentação, condimentos ou ornamentais (Avato; Argentieri, 2015). No Brasil, existem diversas variedades dessa família, dentre elas as de maior importância alimentícia: couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-manteiga, (*B. oleracea* var. *acephala*) brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e rúcula (*Eruca sativa*) sendo as mais consumidas devida ao seu alto valor nutricional (Melo *et al.*, 2017). No que diz respeito a ornamentação espécies, de diversos gêneros como *Iberis*, *Lobularia*, *Cheiranthus*, *Erysimum* e *Hesperis* são usadas como plantas ornamentais (Raza *et al.*, 2020).

Além das características alimentícias e ornamentais, diversas espécies de brássicas possuem um potencial medicinal, devidos os seus altos constituintes fotoquímicos, além de serem alimentos ricos em vitamina C (Chauhan; Tiwari; Singh, 2016). Cerca de 25% das espécies pertencentes a essa família podem atuar como hiperacumuladores de metais pesados em solos poluídos e algumas espécies podem hiperacumular cádmio, zinco e níquel (Devi *et al.*, 2017; Raza *et al.*, 2020).

Diversos fatores podem influenciar a qualidade e o rendimento da produção de brássicas, incluindo aspectos sazonais, variações climáticas, deficiência nutricional, monocultura, uso excessivo de agroquímicos, escassez de água, as pragas e principalmente doenças de origem biótica, como as causadas por fungos, oomicetos, protozoários, bactérias, vírus e nematoides (Driscoll, 2020; Oliveira, 2019).

As principais doenças de etiologia bacteriana na cultura das brássicas são a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e podridão mole causada por espécies de *Pectobacterium*, podendo causar grandes perdas no campo e no período de armazenamento, alterando assim a produtividade e de qualidade do produto. Em geral, essas podridões são mais severas em condições climáticas de altas temperatura e umidade. Nesse contexto, doenças fúngicas mais importantes é a mancha de alternaria causada por espécies do gênero *Alternaria*. Em alguns casos essa doença pode levar uma perda de mais de 70% da produção (Amorim *et al.*, 2016; Dharmendra *et al.*, 2014;).

Mancha de Alternaria

O gênero *Alternaria* pode incluir diversas espécies de fungos que podem colonizar os tecidos das plantas de forma saprófita e patogênica, estando amplamente distribuído na natureza, podendo provocar podridão em frutas e vegetais tanto no campo como na pós-colheita, acarretando consideráveis perdas na produção (Ostry, 2008). Dentre as espécies mais

comuns estão *A. alternata* (Fr.) Keissl. 1912, *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire 1933, *A. arborescens* E.G. Simmons 1999, *A. radicina* Meier, Drechsler & E.D. Eddy 1922, *A. brassicae* (Berk.) Sacc. 1880, *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire 1947 e *A. infectoria* E.G. Simmons 1986. Estas são colonizadoras de cereais, tomates, maçãs, uvas, oleaginosas, sementes de girassol, laranjas, limões, melões, pepinos, couves-flores, pimentas e tangerinas, além de diversas outras brássicas (Amorim *et al.*, 2016; Lee; Patriarca; Magan, 2015).

A mancha de alternaria é uma doença que se desenvolve bem em temperaturas entre 20°C e 24°C e umidade relativa do ar entre 70% e 90%. A germinação dos conídios e penetração do tubo germinativo nos tecidos do hospedeiro é possível com um mínimo de orvalho. Todas as partes da planta hospedeira podem ser infectadas e manifestar sintomas como pequenas necroses marrom escuras em cotilédones e hipocótilos e tombamento das plântulas. Em plantas adultas, são observadas nas folhas manchas arredondadas ou irregulares, de cor marrom a cinza ou marrom escura com dimensões variando de 1 mm a 20 mm, circundadas por halo amarelado. Folhas severamente afetadas murcham e secam. Nas nervuras, caules e ramos, as lesões são depressivas, oblongas ou lineares, podendo ser puntiformes, irregulares, depressivas, necróticas, pardas ou negras (Amorim *et al.*, 2016).

Espécies de *Alternaria* podem produzir diversos metabólitos secundários, dentre eles mais de 70 toxinas, que desempenham mecanismos essenciais para patogenicidade dos fungos e podendo ser prejudiciais a saúde humana e de animais. Vale ressaltar que esses compostos estão em diferentes grupos químicos como esteróides, terpenóides, piranonas, quininas, fenólicos, amida, ciclopeptídeos, etc (Contam, 2011; Lou *et al.*, 2013). As principais toxinas produzidas pela *Alternaria* pertencem aos grupos químicos dibenzo- α -pironas, que incluem o alternariol (AOH) e o éter monometílico do alternariol (AME), e os tetrapeptídeos cíclicos representados pela tentoxina (TEN). Essas micotoxinas são comumente produzidos por diferentes cepas de *Alternaria* em diferentes substratos (tomate, trigo, mirtilos, nozes, etc.) e tais compostos podem ser uma risco para a saúde humana e animal devido à toxicidade conhecida e sua presença frequente como contaminantes naturais nos alimentos (Pose *et al.*, 2010).

Morfologicamente os fungos pertencentes ao gênero *Alternaria* possuem colônias geralmente cinza, esverdeadas, marrom, marrom-escuras. O micélio é superficial, com hifas incolores, em tons de oliva escuro ou marrons. Os conídios são solitários ou em cadeias, secos, ovóides, obovóides, cilíndricos, estreitamente elipsoides ou obclavados, podendo ser bicudos ou não bicudos, pálidos ou oliváceos médios ou castanhos, lisos ou verrucosos, com transversos

e com ou sem septos oblíquos ou longitudinais. Os septos podem ser espessos, escuros e rígidos e uma estrutura interna semelhante a uma célula pode ser formada (Lawrence; Rotondo; Gannibal, 2016).

Para a identificação de espécies de *Alternaria* são usados mais de dez lóculos gênicos, dentre eles se tem o DNA ribossômico nuclear (LSU, SSU), as regiões intermediárias como o ITS, além genes que são codificadores de proteínas, como Alt-a1 (alternaria major allergen gene), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), RPB2 (RNA polimerase II), EndoPGe (Endo-poligalacturonase) e OPA10-2 (Anonymous Noncoding Region), são alguns dos genes mais utilizados na filogenia para classificação de espécies de *Alternaria* (LI *et al.*, 2023). A taxonomia do gênero *Alternaria* passou por diferentes revisões, e a classificação atual é baseada em abordagens morfológicas e moleculares, dividindo o gênero em 27 seções (Lawrence; Rotondo; Gannibal, 2016).

Existem diversas praticas que podem ser empregadas no manejo de doenças, visando a redução de sua severidade. A prática mais eficaz para controlar a mancha de alternária em brássicas seria o desenvolvimento variedades resistentes. No entanto, ainda não há registros de brássicas que apresentem resistência a esse patógeno. Dessa forma os produtores optam pelo uso de fungicidas para o manejo dessa doença (Bashir *et al.* 2018; Subhani *et al.* 2018). Vale ressaltar que a combinação do controle químico (fungicidas) combinados com o controle cultural (espaçamento adequado) pode ser uma alternativa no manejo da mancha de alternária. Esses métodos podem implicar na redução nos danos causados por tal doença nas variedades de brássicas (Tonin *et al.*, 2023)

Controle químico

O controle químico baseia-se na utilização de moléculas orgânicas ou inorgânicas, obtidas de forma natural ou sintética, para proteção de plantas contra patógenos sendo um dos principais métodos utilizados pois pode garantir uma alta produtividade e melhor qualidade visadas da agricultura moderna. Os principais fungicidas utilizados atualmente pertencem aos grupos químicos dos QoI (Inibidores de quinona externa), DMI (Inibidores da desmetilação de esteróis), MBC (Metil benzimidazol carbamato), SDHI (Inibidores da enzima succinato desidrogenase), ditiocarbomatos e produtos inorgânicos (Amorim; Rezende; Bergamani, 2018).

O uso desordenado de produtos químicos pode ocasionar danos tanto ao meio ambiente quanto na saúde humana resultante da exposição a esses produtos de forma direta ou indiretamente. Os registros indicam que o Brasil é um dos países com o maior consumo de

agrotóxicos ocupando a sexta posição no ranking mundial (Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014). Existem diversas formas onde os seres humanos podem ser contaminados por esses produtos sendo os mais comuns a exposição e absorção pela pele, inalação ou por ingestão de alimentos contaminados (Santana; Moura; Nogueira, 2013), sendo a contaminação decorrente do uso de produtos químicos que foram utilizados no campo. Ademais, os alimentos expostos a agrotóxicos podem resultar na alteração da composição nutricional (Ciscato; Gebara, 2017; Jardim *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2012). Vale ressaltar que essa exposição pode acarretar intoxicações agudas, ou em alguns casos pode ocasionar câncer (Segatto *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016).

O uso intensivo de agroquímicos no controle de doenças em culturas de importância econômica tem provocado diversos problemas ambientais, tais como: contaminação da água, alimentos, solo, intoxicação dos homens e animais (Bettiol; Morandi, 2009). Visto que o Brasil é um dos países que mais faz uso de fungicidas, nos últimos anos diversas pesquisas vem surgindo em busca de um controle alternativo visando a redução do uso de produtos químicos, como o uso de leveduras (Heling *et al.*, 2017) e fungos filamentosos com potencial biocontrolador (Blanco; Mendonça; Graichen, 2022), além de óleos essenciais (Da Rocha *et al.*, 2020) e extratos vegetais (Venturoso *et al.*, 2020).

Óleos Essenciais

O termo Óleo essencial (OEs) é definido como um óleo aromático altamente concentrado de origem vegetal que é extraído por destilação a vapor, hidrodifusão ou destilação seca (Manion; Widder, 2017). Dentro desses OEs existe variação na sua composição ocorrendo até entre a mesma espécie botânica, influenciado por várias características, como sazonalidade, método de extração e conservação desses óleos (Yuan *et al.*, 2016). Os óleos essenciais estão presentes em diferentes partes das plantas aromáticas, como nas flores (rosa, laranja, lavanda, botões florais no caso do cravo), folhas (hortelã, eucalipto, louro, tomilho, sálvia), rizomas (gengibre), raízes (vetiver), sementes (coentro e carvi), frutas (anis, erva-doce e epicarpos cítricos) e madeira e casca (em madeira de sândalo, canela e jacarandá) (Hanif *et al.*, 2019).

Diversas famílias botânicas possuem gêneros são que amplamente utilizados na produção de mais 3.000 óleos essenciais, e apenas aproximadamente 300 são considerados de importância comercial. Várias plantas pertencentes as famílias da Rutaceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Poaceae, Apiaceae, Alliaceae e Asteraceae são conhecidas por produzirem óleos essenciais em escala comercial, podendo ser empregados nas mais diversas áreas como

farmacêutica, cosmética, agronômica, limpeza, aromaterapia e em o setores alimentícios (Bakkali et al., 2008; Jugreet, Suroowan; Rengasamy; Mahomoodally, 2020; Raut; Karuppayil, 2014).

Os OEs possuem diversas aplicações como função ecológica, repelindo predadores, atraindo insetos polinizadores, etc. Além disso, os óleos essenciais também possuem atividades inseticidas e antimicrobiana (Hanif *et al.*, 2019). Na literatura é relatada a eficiência de diversos óleos no controle de fungos fitopatogênicos, como óleo de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) no controle de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. 1909 em cachos de videira (Peixinho *et al.*, 2020), óleos de orégano (*Origanum vulgare* L.) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) os quais apresentam potencial de controle para *Botrytis cinerea* Pers. 1797 importante patógeno de pós-colheita na cultura do morango (Drawanz *et al.*, 2020).

Óleos essenciais como cataia (*Drimys brasiliensis* Miers.), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) se mostram eficientes no controle *in vitro* de *Alternaria* spp. Os óleos de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e hortelã (*Mentha arvensis* L.) são eficientes *in vitro* e ainda, foram capazes de reduzir a severidade da doença causada por *A. alternata* f. sp. *citri* em frutos de tangerina (Júnior *et al.*, 2021; Porcino *et al.*, 2023).

A composição química desses óleos possui uma infinidade de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta lipofílicos de baixo peso molecular estruturalmente relacionados, fenil propanóides, terpenóides e constituintes fenólicos. Além de, hidrocarbonetos e aldeídos, cetonas, ésteres, óxidos e álcoois também participam ativamente da produção de OEs em diferentes plantas aromáticas (Baldim *et al.*, 2019). O maior grupo de substâncias presentes nos óleos essenciais corresponde aos terpenos e seus derivados oxigenados (Tohidi *et al.*, 2019).

Os terpenos são formados por combinações de moléculas de isopreno classificadas de acordo com a quantidade de unidades que formam a molécula, e podem ser classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, tetraterpenos e politerpenos. Em óleos essenciais os monoterpenos são encontrados de forma predominante quando comparados com outras moléculas (Sharma; Thulasingham; Nagarajan, 2017). Os terpenóides são uma variação dos monoterpenos resultante de modificações enzimáticas, no qual a formação de uma hidroxila, sendo ela umas das responsáveis pela ação antimicrobiana. As variações estruturais dos terpenóides e a posição do grupo hidroxila podem influenciar a eficácia do composto contra microrganismos. Alguns exemplos incluem carvacrol, timol, mentol, α -terpineol e geraniol (Gyawali; Ibrahim, 2014; Da Silva *et al.*, 2021)

Carvacrol

Carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol ou 5-isopropil-2-metilfenol, pela International Union of Pure and Applied Chemistry-IUPA, é um fenol monoterpênico biossintetizado a partir de γ -terpineno (Kintzios, 2002). É uma molécula encontrada em muitas plantas medicinais e aromáticas da família Lamiaceae, incluindo orégano e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), podendo estar presente em até 80 % e 45 % da composição dos óleos essenciais dessas plantas, respectivamente (Marchese *et al.*, 2018; Dash *et al.*, 2021; Zinno *et al.*, 2023,). Possui propriedades lipofílicas e densidade de 0,976 g/ml à temperatura ambiente (25 °C), é insolúvel em água, mas solúvel em etanol, acetona e éter dietílico (Yadav; Kamble, 2009).

Na área da saúde, medicamentos e/ou óleos essenciais que possuem o carvacrol em sua composição têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional (Edris, 2007), devido as suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória (Gunes-Bayir *et al.*, 2022). O carvacrol isolado ou combinado com clindamicina ou penicilina pode ser usado como um produto natural seguro e eficaz para a saúde no tratamento doenças, como a faringite estreptocócica causada por *Streptococcus pyogenes* (Wijesundara *et al.*, 2021). Pesquisas recentes, sobre o efeito da aplicação dessa molécula em fármacos, relatam o carvacrol como um possível candidato no tratamento e prevenção de diversas doenças humanas crônicas. No entanto, estudos adicionais e direcionados são necessários para validar o potencial efeito terapêutico do carvacrol em nível molecular, e ainda verificar os efeitos a longo prazo na saúde humana (Ali *et al.*, 2024).

Na indústria alimentícia, o carvacrol foi aprovado pela Food Drug Administration-FDA para uso em alimentos e classificado pelo Conselho Europeu como um agente aromatizante químico de Categoria B (European Union, 2008; FDA, 2021). Podendo ser adicionado a alimentos em baixas concentrações, como 2 ppm em bebidas, 5 ppm em biscoitos e 25 ppm em doces, o que resulta na disponibilidade de aditivos alimentares a base dessa molécula no mercado (De Vincenzi *et al.*, 2004). Contudo, para adição do carvacrol na composição dos alimentos processados é necessário um parecer da European Food Safety Authority (EFSA), que realiza uma avaliação de risco baseado na dose a ser implementada. Esta avaliação abrange testes, nas áreas de genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade crônica e subcrônica, toxicocinética e toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (Aguilar *et al.*, 2012).

Na agricultura, o carvacrol se mostra como uma forte promissora no controle de doenças, sendo relatado sua aplicação em testes para controle de diversos fungos fitopatogênicos (Saghrouchni *et al.*, 2021). A aplicação de óleos essenciais, nos quais o carvacrol é o componente principal, também demonstrou ser eficaz na redução da severidade

de doenças foliares em condições de campo, mancha bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) no tomate (Giovanale *et al.*, 2017) e mancha de alternaria em causada por *A. alternata* em frutos de goji. Ademais, a relatos da eficiência do carvacrol na redução de perdas na pós-colheita e no armazenamento de alimentos, a partir da utilização de embalagens bioativas com a presença de partículas encapsuladas de carvacrol, aumentando assim a vida útil de muitos alimentos *in natura* (Shemesh *et al.*, 2016).

A busca por métodos alternativos de controle de fitopatogenos vem aumentando nas últimas décadas, visando a diminuição do uso de produtos químicos e resíduos desses defensivos em alimentos, além de uma medida de baixo impacto ao meio ambiente e sem oferecer riscos a saúde humana. Os óleos essenciais têm ganhado espaço nesse mercado por serem de origem natural e não representar riscos em sua maioria. Sua eficiência esta ligada diretamente aos seus componentes químicos, sendo fontes promissoras no controle de fitopatógenos. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do carvacrol no controle *in vitro* de *Alternaria brassicicola*, além de verificar fitotoxicidade do carvacrol na germinação de sementes de brássicas.

Referências bibliográficas

- AGUILAR, F. *et al.* Guidance for submission for food additive evaluations. **EFSA Journal**, v.10, n.7, p.2760, 2012.
- ALI, T. *et al.* Recent Advances in the Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Carvacrol. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.34, p.35–47, 2024.
- AMORIM, L. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. Ed. 5, ed, São Paulo, Agronômica Ceres, 2016. 810p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMANI FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo, Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. 573p.
- AVATO, P.; ARGENTIERI, M. P. Brassicaceae: A rich source of health improving phytochemicals. **Phytochemistry reviews**, v. 14, n. 6, p. 1019-1033, 2015.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALDIM, I. *et al.* *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73-81, 2019.
- BASHIR, M. R. *et al.* Antifungal exploitation of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* causing Fusarium wilt of chilli pepper in Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 6797-6801, 2018.3
- BETTIOL, W. M. A. B. *et al.* **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BLANCO, N. H. M. DE MENDONÇA, C. G. GRAICHEN, F. A. S. Eficiência e formas de aplicação de *Trichoderma harzianum* no controle biológico da podridão de esclerócio em pimentão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 17, n. 2, p. 1-7, 2022.
- CHANG, A. C; YANG, T. Y; RISKOWSKI, G. L. Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24 hour light/dark cycle for spinach grown in different conditions. **Food Chemistry**, v.138, n.1, p.382-388, 2013
- CHAUHAN, E. S.; TIWARI, A.; SINGH, A. Phytochemical screening of red cabbage (*Brassica oleracea*) powder and juice-A comparative study. **Journal of medicinal plants studies**, v. 4, n. 5, p. 196-199, 2016.
- CISCATO, C. H. P. GEBARA, A. B. Avaliação de resíduos de pesticidas na dieta brasileira, período de 2001 a 2010. **Hig. Alimentar**, p. 110-14, 2017.
- CONTAM (EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. **EFSA journal**, v. 9, n. 10, p. 2407, 2011.
- DA ROCHA, C. H. *et al.* Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2020.
- DA SILVA, B. D. *et al.* Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, v. 176, 2021.
- DASH, K. T. *et al.*, Chemical Composition of Carvacrol-rich Leaf Essential Oil of *Thymus vulgaris* from India: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Potential. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v.24, n.5, p.1134–1145, 2021.

- DE CAMARGO FILHO, W. P.; DE CAMARGO, F. P. Evolução da Produção e da Comercialização das Principais Hortaliças no Mundo e no Brasil, 1970 a 2015. **Informações Econômicas**, v. 47, n. 3, 2017.
- DE MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. **Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças**. 2007.
- DE VINCENZI, M. *et al.* Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**. v.75, p.801–804, 2004
- DEVI, M. *et al.* Biological properties of soil and nutrient uptake in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis* L.) as influenced by integrated nutrient management. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 3, p. 325-328, 2017.
- DHARMENDRA, K. *et al.* *Alternaria* blight of oilseed Brassicas: A comprehensive review. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, n.30, p.2816-2829, 2014
- DRAWANZ, B. B. *et al.* Óleos essenciais e hidrolatos de orégano e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morangos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 4, p. 341-345, 2020.
- DRISCOLL, A. O. **Diseases of vegetable brassicas**. Kenilworth: AHDB Horticulture, 2020. Disponível em: <https://horticulture.ahdb.org.uk/knowledge-library/brassica-diseases-guide>. Acesso: 10/04/2023
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.
- EUROPEAN UNION, R. (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91. **Official Journal of the European Union**, v. 354, p. 34-50, 2008.
- FDA. Electronic code of federal Regulations, Title 21 food and drugs, chapter I, subchapter B Part 172 food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Subpart F – Flavoring agents and related substances, 172.515), 2021.
- GIOVANALE, G. *et al.* Possibilities of copper reduction in control of tomato bacterial disease. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. S27, 2017.
- GUNES-BAYIR, A. *et al.*, Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Carvacrol on *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine (MNNG) Induced Gastric Carcinogenesis in Wistar Rats. **Nutrients**. v.14, n.14, 2022.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HABER, L. L.; MARINHO, A. G.; CLEMENTE, F. M. V. T. **Descrição das hortaliças**. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; HABER, L. L. **Horta em Pequenos Espaços**. 1.ed. Brasília: Distrito Federal, 2012, p. 31-40.
- HANIF, M. A. *et al.* **Essential oils**. In: MALIK, S. **Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production**, p. 3-17, 2019.
- HELING, A. L. *et al.* Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 49-51, 2017.
- IBGE, 2017. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017/resultados-definitivos#horticultura>. Acesso: 08/04/2024.
- JARDIM, A. N. O. *et al.* Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC–μECD, GC–FPD and LC–MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v. 164, p. 195-204, 2014.

- JUGREET, B. S. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v.101, p.89-105, 2020
- JÚNIOR, A. L. G. *et al.* Óleo essencial das folhas de cataia, *Drimys brasiliensis*, sobre o crescimento micelial de *Alternaria porri*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 16, n. 3, p. 245-252, 2021.
- KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Oregano: the genera Origanum and Lippia**. Ed. 1, CRC press, 2002.
- LAWRENCE, D. P. ROTONDO, F. GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. **Mycological progress**, v. 15, p. 1-22, 2016.
- LEE, H. B. PATRIARCA, A.; MAGAN, N. E. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 371, 2015.
- LI, J. F. *et al.* *Alternaria*: Update on species limits, evolution, multi-locus phylogeny, and classification. **Studies in Fungi**, v. 8, n. 1, p. 1-61, 2023.
- LIMA, G. P. P. *et al.* Organic and conventional fertilisation procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 5, n. 3, p. 188-193, 2012.
- LOU, J. *et al.* Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5891-5935, 2013.
- MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 9, p.153-162, 2017.
- MAPA. 2010. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Brasília: Mapa/ACS, 92 p.
- MARCHESE, A. *et al.* The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. **Biofouling**, v. 34, n. 6, p. 630-656, 2018.
- MELO, P. C. T.; ARAÚJO, T. H. **Olericultura: planejamento da produção, do plantio à comercialização**. 2016.
- MELO, R. A. C. *et al.* **Caracterização e diagnóstico de cadeia produtiva de brássicas nas principais regiões produtoras brasileiras**. 2017.
- OLIVEIRA, A. M. **Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam brássicas**. 2019. 83 f. (Dissertação de Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto Biológico, São Paulo.
- OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-188, 2008.
- PEIXINHO, G. S. *et al.* Ação do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon nardus* L.) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 428-431, 2020.
- PORCINO, M. M. *et al.* Óleos essenciais no manejo de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em frutos de tangerineira ‘Dancy’. **Revista Caatinga**, v. 36, n. 2, p. 291-299, 2023.
- POSE, G. *et al.* Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 348-353, 2010.
- RAUT, J. S. KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250–264, 2014.
- RAZA, A. *et al.* The plant family Brassicaceae: Introduction, biology, and importance. **The Plant Family Brassicaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses**, p. 1-43, 2020.

RIGOTTO, R. M. VASCONCELOS, D. P. ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

SAGHROUCHNI, H. *et al.* Carvacrol: A promising environmentally friendly agent to fight seeds damping-off diseases induced by fungal species. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 985, 2021.

SANTANA, V. S. MOURA, M. C. P. NOGUEIRA, F. F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 598-606, 2013.

SEGATTO, M. M. *et al.* Residential and occupational exposure to pesticides may increase risk for cutaneous melanoma: a case-control study conducted in the south of Brazil. **International journal of dermatology**, v. 54, n. 12, p.527-538, 2015.

SHARMA, S. H. *et al.* Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v.795, p.169–178, 2017

SHEMESH, R. *et al.*, Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 118, p. 175-182, 2016.

SILVA, A. C. *et al.* Socioeconomic profile of rural workers cancer sufferers. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 8, n. 3, p. 4891-4897, 2016.

SUBHANI, A. *et al.* Antifungal potential of commercially available fungicides against *Alternaria* blight of *Brassica*. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 53-58, 2018.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89-99, 2019.

TONIN, R. J. *et al.* Manejo de mancha de alternária em canola em função de espaçamentos de semeadura e uso de fungicidas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 22, n. 1, p. 44-51, 2023.

VENTUROSOSO, L. R. *et al.* Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 89-95, 2020.

WANG, J. *et al.* Inhibitory Effect and Mechanism of Carvacrol against Black Mold Disease Agent *Alternaria alternata* in Goji Berries. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 6, p. 402, 2024.

WIJESUNDARA, N. M. *et al.* Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1487, 2021.

YADAV, G. D.; KAMBLE, S. B. Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v.84, n.10, p.1499-1508, 2009.

YUAN, Y. *et al.* Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1024, 2016.

ZINNO, P. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from *Origanum vulgare* Genotypes Belonging to the Carvacrol and Thymol Chemotypes. **Plants**, v. 12, n. 6, 2023.

CAPÍTULO II

Potencial do carvacrol no controle *in vitro* de *Alternaria brassicicola* e análise da fitotoxicidade em sementes de brássicas

Potencial do carvacrol no controle *in vitro* de *Alternaria brassicicola* e análise da fitotoxicidade em sementes de brássicas

André Nunes de Oliveira^{a*}, Lavinia Gabriely de Albuquerque Freitas^a, Sérgio Batista Ramos^a, Giovana Gabrielli Correia da Costa Silva^a, Neri Antonio Biazus Junior^a, Iwanne Lima Coelho^b, Bruno Oliveira de Veras^c, Marcia Vanusa da Siva^c, Delson Laranjera^{a*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

^b Atlas Bioinsumos, Avenida Washington Martoni, n. 50, Parque Industrial I, 37950-500, São Sebastião do Paraíso- MG, Brasil.

^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife -PE, Brasil

* Autores correspondentes. Endereço de e-mail: andrenunes2110@gmail.com (André Nunes de Oliveira), e delson.laranjera@ufrpe.br (Delson Laranjera).

Resumo: A mancha de alternaria causada por *Alternaria brassicicola* é uma das principais doenças incidente nas brássicas. O carvacrol é terpeno que possui diversas aplicações, sendo comumente associado a atividades antifúngicas. Podendo ser uma alternativa para o controle dessa doença. Portanto, objetivamos verificar o potencial de controle *in vitro* do carvacrol sobre *Alternaria brassicicola*, bem como verificar o efeito fitotóxico do carvacrol na germinação de sementes de brássicas. A patogenicidade de quatro isolados de *A. brassicicola* (CFS131, CFS132, CFS135 e CFS143) foi confirmada em plantas de couve-manteiga, repolho e rúcula. A Concentração mínima inibitória variou entre os isolados, sendo 300 ppm para CFS131 e CFS132, 400 ppm para o isolado CFS135 e 500 ppm para CFS143. O potencial de inibição (PIC %) evidenciou que a partir de 250 ppm houve 100 % de inibição dos isolados CFS131 e CFS135 e com 150 ppm o CFS132 e CFS143 foram completamente inibidos. A CE₅₀ foi de 59,66; 91,63; 94,67 e 88,62 ppm para os isolados CFS132, CFS135, CFS131 e CFS143 respectivamente. Os químicos inibiram 100 % em todos as doses testadas. As sementes de couve foram tolerantes ao carvacrol, germinando 92 a 99 % em 25 a 250 ppm, reduzindo para 75 % quando exposta a 300 ppm. Em rúcula e repolho a germinação foi acima de 90 % em 25 a 100 ppm. A partir de 150 ppm, houve uma redução na germinação, sendo 50 e 75 % para repolho e rúcula, respectivamente. Os resultados apresentados nos permitem inferir que o

carvacrol apresenta eficácia para controle *in vitro* de *A. brassicicola*, bem como estudos relacionados a fitotoxicidade buscando uma forma na redução desse efeito.

Palavras chaves: Controle Alternativo; Terpenos: *Alternaria brassicicola*; Aternariose em brássicas.

Introdução

Em 2022, segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, a área cultivada de brássicas chegou a mais de 2,3 milhões de hectares, resultando em mais de 72 milhões de toneladas de vegetais colhidos. O continente asiático responsável por 63 % dessa produtividade, estando o restante distribuído na Europa (28,4 %), Americas (4,7 %), África (3,3 %) e Oceania (0,3 %). No Ranking mundial a China, União Soviética e Índia lideram como as maiores produtoras, possuindo aproximadamente 16,6; 8,2 e 4,0 milhões de toneladas produzidas (FAO, 2024). No Brasil o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estimou que no ano de 2017 foram mais de 983 mil toneladas colhidas das principais brássicas alimentícias (IBGE, 2017).

A família Brassicaceae possui uma ampla distribuição mundial e uma alta diversidade de espécies, podendo agrupar culturas alimentícias como repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-chinesa (*Brassica campestris* var. *chinensis*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *viridis*), couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), brócolis (*Brassica oleracea* var. *itálica*), que são consumidos mundialmente devido ao seu alto valor nutricional. Além de espécies alimentícias essa família possui plantas com valor ornamental (*Alyssum* sp. e *Cheiranthus* sp.), e culturas oleaginosas como a canola (*Brassica napus*). Devido a essa gama de aplicações essa família possui uma importante relevância no cenário nutricional e econômico (Aires, 2015).

O gênero *Alternaria* é comumente encontrado na forma saprofítica em solos ou tecidos vegetais em decomposição. Algumas espécies são fitopatogênicas, causam uma série de doenças com impacto econômico em uma grande variedade de plantas hospedeiras, incluindo cereais, plantas ornamentais, oleaginosas e vegetais (Thomma, 2003). Os sintomas característicos da doença incluem inicialmente manchas foliares marrons, que evoluem para anéis concêntricos com halo amarelado ao redor da lesão, que levam à desfolha severa e perda considerável de rendimento (Schmey *et al.*, 2024). Os danos decorrentes da doença podem gerar de 10 a 70 % perdas na produção, promovendo prejuízos econômicos ao produtor (Singh-

Saharan; Mehta; Meena, 2016b; Singh *et al.*, 2017; Choudlhary *et al.*, 2018).vNo Brasil, *A. brassicicola* é a espécie predominante nas áreas de cultivo dessas hortaliças (Michereff *et al.*, 2012). A doença pode afetar os mais diversos órgãos da planta, desde as sementes, folhas, cabeças, haste até o caule (Singh Saharan; Mehta; Meena 2016a).

O manejo da mancha foliar causada por *Alternaria* vem sendo baseado em uma série de estratégias que incluem o uso de preventivo de fungicidas, eliminação de restos culturais, aplicação de bioestimulantes e extratos vegetais (Ishieze *et al.*, 2023). Embora a resistência genética tenha comprovadamente a forma mais eficaz de controlar a doença, devido a sua durabilidade e ser ecologicamente seguro, a ausência ou quantidade limitada de variedades resistentes fez com que os agricultores adotem fungicidas como principal via de controle (Rashid *et al.*, 2014). No entanto, a aplicação indiscriminada de fungicidas químicos pode ocasionar vários riscos à saúde, além de diversos impactos negativos no meio ambiente. Dessa forma, pesquisas acerca de produtos alternativos para o manejo da mancha de alternaria vem sendo realizada visando a diminuição do uso de defensivos químicos e, consequentemente, redução de ricos ao ambiente e a saúde humana (Pun *et al.*, 2020).

Na agricultura os óleos essenciais surgem com a perspectiva no controle de doenças, estudos recentes mostram a eficácia desses produtos no manejo doenças fúngicas associadas a sementes, ocasionando a diminuição da incidência da doença ou gerar a proteção contra o patógeno (Santos *et al.*, 2024). Óleos essenciais de lavanda, capim-limão, lavanda, louro e manjerona doce já foram testados para o gênero *Alternaria*, possuindo controle que variou de 36 a 90 %. A eficiência desses óleos está relacionada à composição química, onde os compostos presentes podem atuar de forma isolada ou em sinergismo com outras moléculas secundárias no controle do fitopatógeno (Moumni *et al.*, 2021).

Diversas plantas que compõem a família Lamiaceae são utilizadas para extração de óleos essenciais, sendo utilizados nos mais diversos setores, como aromaterapia, medicina alternativa, alimentação, cosméticos e perfumaria. Dentre os componentes majoritários o carvacrol é um dos monoterpenos oxigenados predominantemente encontrado em algumas espécies dessa família (Popa *et al.*, 2021). Diversos estudos mostram a eficiência do carvacrol com agente antimicrobiano. Estudos recentes mostram o controle de importantes fitopatógenos, como *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Botrytis cinera*, *Colletotrichum fructicola* e *Alternaria* *oalernata*, sendo o principal mecanismo de ação dessa molécula a degradação da parede celular (Hou *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024; Zamuner *et al.*, 2023).

Diante dos prejuízos decorrentes da mancha de alternaria causada por *A. brassicicola* na cultura das brássicas e levando em consideração a ação do carvacrol no controle de diversos fitopatógenos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial carvacrol como agente de controle de *A. brassicicola*.

Material e métodos

Obtenção da molécula e Manutenção dos Isolados

A molécula pura de carvacrol foi adquirida comercialmente na plataforma Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>).

Foram utilizados quatro isolados de *Alternaria brassicicola* (CFS-131, CFS-132, CFS-135 e CFS-143), cedidos pela Coleção de Fungos de Solo (CFS), ao Laboratório de Fungos de Solo, do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia – PPGF, situado no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Os fungos foram cultivados em placas de Petri, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) por sete dias em temperatura de 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Após o crescimento da colônia pura, discos miceliais de aproximadamente 0,5 cm foram transferidos para tubos criogênicos de 2 mL contendo água destilada esterilizada (ADE) e acondicionados em temperatura ambiente para preservação e utilização dos isolados em todos os experimentos (Castelani, 1963).

Teste de Patogenicidade

As mudas de rúcula, repolho e couve-manteiga, com aproximadamente 10 dias de idade, foram adquiridas comercialmente na Sementeira Vitória (BR-232, Vitória de Santo Antão – PE, 55602-015, Brasil). Após o surgimento da terceira folha definitiva, as plântulas foram transferidas para vasos de 500 mL contendo o substrato (terra vegetal).

Após 40 dias do transplante, as folhas foram inoculadas por aspersão de uma suspensão aquosa de esporos (1×10^5 conídios mL⁻¹) de *A. brassicicola*, com adição de Tween 20 (0,1%). O controle negativo foi definido por ADE + Tween 20 (-0,1%). Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até a avaliação dos sintomas da doença (Moreira, 2008). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cinco plantas para cada cultura e para cada isolado.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI):

A Concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada pelo método da microdiluição em microplacas de poliestireno, com 96 poços de fundo plano (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) contendo meio de cultivo batata dextrose – BD (extrato de batata 200 g e dextrose 20 g L⁻¹). A molécula de carvacrol foi diluída em tween 20 (0,1%) e álcool P.A. nas proporções 1:1:1. Para CMI, definiu-se as seguintes concentrações: 1000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 50; 25; 13 ppm (partes por milhão).

Para cada tratamento, foi definido 180 µL o volume máximo de cada poço, sendo 160 µL (BD + molécula) e de 20 µL da suspensão de esporos (1×10^5 conídios mL⁻¹), considerou-se um poço igual a uma repetição de cada tratamento, foram utilizadas duas repetições para cada concentração testada. O controle positivo (CP), foi definido 160 µL de BD + 20 µL suspensão de esporos e o controle negativo (CN) 160 µL de BD + 20 µL de ADE.

As microplacas foram mantidas sob agitação constante a 75 rpm em um agitador horizontal (Nova Ética®. Agitador MOD. 109) mantidas em iluminação constantes a 28 ± 2 °C. Após 24 h foi adicionado 30 µL de resazurin (0,01 %) (Sigma–Aldrich) em todos os poços e as placas foram incubadas por 4 h a 28 ± 2 °C em câmara escura. A mudança de coloração azul (oxidado) para ausência de respiração e para rosa (reduzido) presença de respiração celular foi gerado um quadro colorimétrico, que por sua vez foi utilizado como parâmetro para verificar possíveis concentrações com potenciais fungicidas.

Para verificar o efeito fungicida (EFC) e efeito fungistático (EFS), as concentrações foram recuperadas por alíquota de 30 µL, e semeadas em meio de cultura BDA com auxílio da alça de Drigalsk (duas placas/dose). As placas foram incubadas por 92 h a 28 ± 2 °C. Após esse período, foi avaliada a emergência de colônias fúngicas compatíveis ao gênero *Alternaria*. As doses nas quais houve a emergência de colônias foram caracterizadas como EFS e nas doses nas quais não houve emergência de colônia como EFC.

Determinação da Inibição de Crescimento Micelial (ICM):

O preparo da solução estoque foi elaborada com carvacrol previamente acrescido de tween 20 (0,1%) e álcool P.A. em proporções iguais (1:1:1). Em seguida, foi adicionado ao meio de cultivo BDA em estado semilíquido (47 ± 2 °C), as seguintes concentrações da solução estoque, anteriormente mencionada: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 ppm.

O meio de cultivo previamente tratado foi transferido para placas de Petri (15 mL/placa de 90x15 mm) e após a solidificação, depositou-se na superfície central da placa um disco

cilíndrico de meio BDA (0,5 cm Ø) contendo estruturas fúngicas de *A. brassicicola* com sete dias de cultivo. As placas tratadas (6 placas/tratamento) foram acondicionadas por 14 dias, sob temperatura de 26±2 °C e luz contínua.

Para a avaliação, em intervalos de 48 h, foram aferidos os valores médios do diâmetro de crescimento micelial de *A. brassicicola* (DCM) e ao fim do período de avaliações, foi determinada a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC), a partir da equação:

$$PIC = \frac{C_c - C_f}{C_c} * 100, \text{ sendo } C_f = \text{crescimento final e } C_c = \text{Crescimento final tratamento controle.}$$

Determinação da CE50:

Os valores de ICM e do logaritmo de cada dose foram utilizados para determinar as equações lineares $Y = a + bx^2$, representativas a cada isolado testado, sendo: Y = porcentagem de inibição de crescimento micelial e x = Log (dose de inibição). A equação linear obtida foi utilizada para a determinação da Log (CE 50), onde $\text{Log (CE}_{50}) = (50 - a)/b$ e os valores de CE 50 determinados pela transformação: $\text{CE}_{50} = (\text{Log CE } 50) 10$.

Análise do produto químico comercial recomendado

Foram utilizados três produtos químicos, com o princípio ativo difenoconazol, clorotalonil e futriafol. As doses utilizadas foram: dose recomendada (DR) do produto; 2x a dose recomendada (2xDR) e metade da dose recomendada (1/2DR). Após a seleção da dosagem os produtos foram submetidos a luz UV para esterilização por 20 min. para a determinação do ICM seguiu-se a metodologia descrita anteriormente no ensaio IVCm de carvacrol sobre *A. brassicicola*.

Análise da fitotoxicidade do Carvacrol a sementes de brássicas

O experimento foi realizado de acordo com os métodos de Formagio *et al.* (2010) adaptados por Ribeiro *et al.* (2012). Foram utilizadas sementes orgânicas convencionais de couve manteiga, repolho e rúcula (TOPSEED Premium®). A porcentagem de germinação das sementes foi avaliada em placas de Petri (90x15mm) contendo meio de cultivo BDA tratados com uma solução estoque de carvacrol nas seguintes doses: 0, 25, 50 100, 150, 200, 250 e 300 ppm. Os tratamentos foram dispostos em quatro repetições, sendo uma placa por repetição com 25 sementes por placa, totalizando 100 sementes por tratamento.

As sementes foram previamente desinfestadas em etanol 70% (1 min), hipoclorito de sódio a 5% (3 min) e duas lavagens em ADE (2 min cada lavagem) e postas para secar em papel filtro estéril (Alfenas; Marfia, 2016). Após a secagem as sementes foram depositadas sobre o

meio tratado em pontos equidistantes. As placas foram acondicionadas em bancada com presença de luz branca contínua a 26 ± 2 °C. Após 5 dias os tratamentos foram avaliados considerando a taxa de germinação (%) de cada arranjo experimental. A taxa de germinação de sementes foi avaliada a partir da diferença entre o número de sementes germinadas e sementes não germinadas e posterior proporcionalidade em porcentagem, onde uma semente representa 1% de germinação.

Análise de dados:

As diferenças de ação inibitória do carvacrol sobre o desenvolvimento de *A. brassicicola* foram inferidas por análises de variância – ANOVA em delineamento inteiramente casualizado - DIC das médias de ICM. Nas análises significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando software Sisvar v5.6.

Resultados

Teste de patogenicidade

Todos os isolados foram patogênicos sobre folhas de couve-manteiga, repolho e rúcula, induzindo sintomas característicos da mancha de alternaria. Em couve-manteiga e repolho, os sintomas iniciaram por pequenas pontuações necróticas apresentando halo amarelado ao redor das lesões que, posteriormente, evoluíram para machas necróticas depressivas, tornando-se lesões coalescentes, após a evolução dos sintomas mencionados. (Figura1). Em rúcula, os sintomas iniciaram com manchas necróticas que evoluíram para machas de coloração marrom cansando o encarquilhamento foliar (Figura 1). A patogenicidade dos respectivos isolados foi confirmada com o reisolamento de *A. brassicicola* que apresentou colônias morfológicamente compatíveis com as iniciais, a partir dos tecidos sintomáticos, finalizando os postulados de Koch.

Determinação da concentração mínima inibitória

Segundo o padrão colorimétrico observado nas microplacas, foi constatada a presença de três cores distintas: azul (ausência de respiração), roxo (redução de respiração) e rosa (alta respiração) (Figura 2). Para os isolados CFS131 e CFS132, a partir da concentração de 300 ppm não houve alteração na coloração e os poços permaneceram azuis, semelhantemente ao padrão do controle negativo. Observou-se comportamento semelhante aos isolados CFS135 e CFS143

a partir de 400 ppm e 500 ppm, respectivamente, indicando ausência de respiração metabólica do fungo e a dose mínima inibitória a cada isolado (Figura 2).

Na análise dos efeitos EFC e EFS observou-se que, para os isolados CFS131 e CFS132, as concentrações de 300 e 350 ppm houve emergência de colônias em meio BDA, sugerindo que essas doses apresentaram um efeito fungistático sobre esses isolados. No entanto, a partir de 400 ppm não houve emergência dessas colônias, demonstrando efeito fungicida (Figura 3). O isolado CFS135 apresentou EFS das concentrações de 400 e 650 ppm, e EFC a partir de 700 ppm. O isolado CFS143 as concentrações de 500 a 650 ppm apresentaram efeito fungistático, as concentrações de 700 a 1000 ppm se mostraram fungicidas (Figura 4).

Determinação da Inibição de Crescimento Micelial (ICM):

O carvacrol proporcionou 100 % de controle para todos os fitopatógenos a partir da concentração de 250 ppm. Os Isolados CFS131 e CFS135 se mostram persistente ao carvacrol, havendo crescimento até na concentração de 250 ppm, no entanto esse composto foi capaz de promover uma inibição de 92,19 e 94,58 % respectivamente. Essas doses não diferiram estatisticamente as concentrações de 250 a 400 ppm que provocaram 100 % de controle (Figura 5). Na concentração 150 ppm, houve inibição de 74,27 e 83,23 % para CFS131 e CFS135, respectivamente. A 100 ppm, o carvacrol inibiu 40 % do crescimento micelial desses isolados mencionados anteriormente e nas concentrações de 50 e 25 ppm o PIC% foi inferior a 9 % de inibição (Figuras 5, 6 e 7).

Para os isolados CFS13 e CFS143, o potencial máximo de inibição foi atingido na concentração de 150 ppm, todas as concentrações subsequentes e maiores a essa provocaram 100 % de inibição. A 100 ppm o PIC foi de 82,81 % em CFS132 e apenas 48,42 % para CFS143. As concentrações de 50 e 25 ppm reduziram o crescimento do isolado CFS132 em 35,52 e 12,71 %, para o as mesmas concentrações observamos 17,07 e 3,76 % de inibição relacionado ao isolado CFS143 (Figuras 5, 8 e 9).

Determinação da CE₅₀:

Com base nos resultados do ICM, foi possível determinar valores da CE₅₀ para os quatro isolados testados. Os resultados indicam que para inibir 50 % do desenvolvimento micelial dos isolados CFS131, CFS135 e CFS143 são necessários 91,63; 94,67 e 88,62 ppm, respectivamente. Estes valores não diferem estatisticamente. O isolado CFS132, apresentou uma de CE₅₀ de 59,66 ppm (Figura 10).

Análise do produto químico comercial recomendado:

Todos os produtos comerciais testados, clorotalonil, difenoconazol e flutriafol foram eficientes no controle *in vitro* de *A. brassicicola*, obtendo 100 % de inibição nas três concentrações testadas. Evidenciando que, mesmo utilizando 1/2 da dose recomendada, obtivemos 100 % de inibição do desenvolvimento micelial (Figura 11).

Análise da fitotoxicidade do Carvacrol em sementes de brássicas

Para as sementes de couve-manteiga, houve germinação em todas as concentrações testadas, sendo nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm obtidos valor 92 a 99 % de germinação, não diferindo estatisticamente. Na concentração de 300 ppm, observou-se redução de germinação para 75 % (Tabela 1; Figura 13).

Nos testes com sementes de repolho, apenas nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm foram obtidos 95, 94 e 93 % de germinação, respectivamente. Nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm houve 50, 25 e 5% de germinação e na maior concentração, 300 ppm não houve germinação de sementes (Tabela 1; Figura 14).

As sementes de rúcula não houve redução na germinação nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm onde foram observados níveis de germinação de 99, 96 e 92 %, respectivamente. Nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm houve 75, 19 e 7% de germinação e em 300 ppm apenas 2 % das sementes emergiram (Tabela 1; Figura 15).

Discursão

Patel *et al.* (2023), verificaram a patogenicidade *A. brassicicola* em folhas de couve-manteiga, mostrando similaridade entre seus resultados obtidos com os apresentados nesse trabalho. No entanto, algumas variações podem ocorrer em decorrências das condições ambientais, espécies hospedeiras, genótipos, condições nutricionais e patótipos do agente causal (Singh Saharan; Mehta; Meena 2016a).

O carvacrol é um terpeno que possui diversas atividades biológicas. A aplicação dessa molécula como agente antifúngico tem sido amplamente explorada. O modo de ação do carvacrol no controle de outros fitopatógenos tem sido abordado em diversos trabalhos científicos. Segundo Pei *et al.* (2020), o carvacrol atua efetivamente na inibição do crescimento micelial de *C. fructicola*, atingindo 100 % de inibição a 400 ppm, interferindo diretamente na germinação dos conídios e no alongamento do tubo germinativo de *C. fructicola in vitro*. Esse efeito também foi observado para hifas e conídios de *B. cinerea*, com potencial máximo foi

atingido em uma concentração inferior (140 ppm) ao estudo anterior (Zang *et al.*, 2019). Esses efeitos diferem do observado nesse estudo, onde o potencial máximo inibição foi determinado em concentrações acima de 200 ppm.

De acordo com Li *et al.*, (2023), a exposição de hifas e conídios ao carvacrol causou danos e alterações na morfologia de *A. alternata*. O micélio e esporos tratados com carvacrol apresentaram encolhimento, que se tornou mais evidente com o aumento da concentração. A concentração de 100 ppm foi capaz de inibir 100 % do crescimento micelial. Sendo sua CE₅₀ 36,71 ppm, evidenciando uma maior suscetibilidade da espécie quando comparadas aos valores de inibição e CE₅₀ para *A. brassicicola* expostos neste trabalho. Consequentemente, concentrações mais elevadas de carvacrol causam danos significativos nas hifas e esporos de *A. alternata* impedindo seu desenvolvimento (Li *et al.*, 2023).

A membrana celular fúngica desempenha diversas atividades importantes, como a absorção de nutrientes, troca substâncias e energia com o ambiente e manter a viabilidade celular, tornando assim um alvo para o controle (Sant *et al.*, 2016). O carvacrol pode atuar causando anomalias na morfologia de fitopatogênicos, levando ao rompimento das membranas citoplasmáticas, desorganização das organelas intracelulares e vazamento de componentes celulares (Pei *et al.*, 2020). No controle de *Aspergillus flavus*, o carvacrol pode afetar quatro vias metabólicas, no entanto apenas a via glicerofosfolipídios foi associada ao efeito de controle. Além disso o carvacrol pode inibir a produção de aflatoxina (Qu; Li; Wang; 2022).

Ademais, os tratamentos com carvacrol induziram a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causaram lesão oxidativa à membrana celular por meio da peroxidação lipídica, podem ainda danificar a integridade da mitocôndria (Hou *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2020). Em um estudo recente foi mostrado a capacidade do carvacrol em destruir membranas plasmáticas e se ligar ao sulco menor do DNA, inibindo a proliferação fúngica ao perturbar a estabilidade do DNA (Yin *et al.*, 2024). Atualmente, não foram recuperados estudos que abordem especificamente os mecanismos de ação desse composto para o controle de *A. brassicicola*. Contudo, baseado nos resultados apresentados nesse trabalho é suposto que alguns ou todos os mecanismos citados acima podem estar relacionados ao controle de *A. brassicicola* devido à capacidade de controle *in vitro* abordada nesse presente estudo.

Os efeitos fitotóxicos nas sementes de couve, repolho e rúcula que foram observados nesse trabalho, podem estar relacionados a efeito alelopáticos ocasionados pelo carvacrol. Em estudos conduzidos por Zamuner *et al.* (2023) e Santos *et al.* (2024) é descrito que tanto a

interferência de óleos essenciais que contêm carvacrol em sua composição, quanto a molécula isolada, estão associadas a diminuição da germinação de sementes e no desenvolvimento de suas raízes. Além disso, os óleos essenciais do gênero *Origanum*, que apresentam o carvacrol como um dos principais componentes, são relatados como fitotóxicos a ervas daninhas e culturas comerciais, como pepino e tomate (Ibáñez; Blázquez, 2020). Apesar de interferir diretamente no desenvolvimento de sementes, o carvacrol quando aplicado nas folhas podem não apresentar efeito danoso, a exemplo dos resultados observados em *Citrus sinensis*, no qual esse composto foi testado quanto o seu efeito protetor e os resultados demonstram a ausência de efeito danoso as plantas de *C. sinensis* (Zamunner *et al.*, 2023).

Conclusão

O carvacrol apresenta eficácia controle *in vitro* de *A. brassicicola*, podendo ser utilizado em estudos futuros visando o manejo da mancha-de-alternaria. Apesar da interferência na germinação das sementes de couve, repolho e rúcula, estudos adicionais devem ser conduzidos sobre sua fitotoxicidade buscando a redução desse efeito. Adicionalmente, estudos sobre a eficácia da molécula *in vivo* devem ser realizados, bem como verificar o principal mecanismo de ação para o controle de *A. brassicicola*.

Referências

- Aires A (2015) *Brassica* composition and food processing. In: Preedy V. R. (Ed.), Processing and impact on active components in food. San Diego, pp. 17-25
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00003-2>
- Alfenas CA, Ferreira FA, Marfia RG, Gonçalves RC (2016) Isolamento de fungos Fitopatogênicos. In: Alfenas, A. C; Marfia, R. G. Métodos em Fitopatologia. 2ª ed., Viçosa (MG), pp. 55 – 91.
- Castellani A (1963). The “water cultivation” of pathogenic fungi. Ann. Soc. Belg. Med. Tr. 44:217-220.
- Choudhary CS, Mishra AK, Singh RS, Mukherjee U, Pandey A (2018). Management of alternaria blight of Indian mustard in Bihar. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7:1053-1058.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOStats. Acesso em: 18 de junho de 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Formágio A, Masetto T, Baldivia D, Vieira M, Zarate N (2010) Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. Revista brasileira de Biociências, 8(4):349-354.

- 364 Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L (2020) Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its
365 two main components, carvacrol and thymol, on the phytopathogen *Botrytis*
366 *cinerea*. PeerJ, 8:9626. <https://doi.org/10.7717/peerj.9626>
- 367 Ibáñez MD, Blázquez MA (2020) Phytotoxic effects of commercial essential oils on selected
368 vegetable crops: Cucumber and tomato. Sustain. Chem. Pharm. 15:100209
369 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100209>
- 370 IBGE, 2017. Censo Agropecuário 2017. Acesso: 18 de junho de 2024, Disponível em:
371 <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/> .
- 372 Ishieze PU, Amuji CF, Ugwuoke KI, Baiyeri PK, Eze MO (2023) Comparative Efficacy of
373 Systemic and Combination Fungicides for the Control of Alternaria Leaf Spot of
374 Cabbage. Applied Microbiology, 3(3):906–914.
375 <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030062>
- 376 Li H, Ding J, Liu C, Huang P, Yang Y, Jin Z, Qin W (2023) Carvacrol Treatment Reduces
377 Decay and Maintains the Postharvest Quality of Red Grape Fruits (*Vitis vinifera* L.)
378 Inoculated with *Alternaria alternata*. Foods, 12(23):4305.
379 <https://doi.org/10.3390/foods12234305>
- 380 Michereff SJ, Noronha MA, Xavier Filha MS, Câmara MP, Reis A (2012). Survey and
381 prevalence of species causing *Alternaria* leaf spots on brassica species in
382 Pernambuco. Horticultura Brasileira, 30(2):345-348. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000200027>
- 384 MOREIRA, P.A.A. Diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (schwn.) wilt. de
385 cultivos convencionais e orgânicos de brássicas de Pernambuco. 2008, 48 f. Dissertação
386 em fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008
- 387 Mounni M, Romanazzi G, Najar B, Pistelli L, Ben Amara H, Mezrioui K, Karous O, Chaieb
388 I, Allagui MB (2021) Antifungal Activity and Chemical Composition of Seven
389 Essential Oils to Control the Main Seedborne Fungi of Cucurbits. Antibiotics.
390 10(2):104. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020104>
- 391 Patel, S. N., Kumar, P., Raghuvanshi, V. V., Patel, S. K., Siddharth, P., Singh, A., & Milan,
392 A. (2023). Morphological Characterization and Pathogenicity Test of Alternaria Leaf
393 Spot of Chinese Cabbage (*Brassica chinensis* L.). International Journal of Plant & Soil
394 Science, 35(19), 1616-1625. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i193707>
- 395 Pei S, Liu R, Gao H, Chen H, Wu W, Fang X, Han Y (2020) Inhibitory effect and possible
396 mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*, Postharvest Biology and
397 Technology, 163:111126, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111126>
- 398 Popa CL, Lupitu A, Mot MD, Copolovici L, Moisa C, Copolovici DM (2021) Chemical and
399 Biochemical Characterization of Essential Oils and Their Corresponding Hydrolats
400 from Six Species of the *Lamiaceae* Family. Plants, 10(11):2489.
401 <https://doi.org/10.3390/plants10112489>
- 402 Pun LB, Chhetri K, Pandey A, Poudel, R. (2020). *In vitro* evaluation of botanical extracts,
403 chemical fungicides and *Trichoderma harzianum* against *Alternaria brassicicola*
404 causing leafspot of cabbage. Nepalese Horticulture, 14(1):68-76.
405 <https://doi.org/10.3126/nh.v14i1.30612>

- 406 Qu C, Li Z, Wang X (2022) UHPLC-HRMS-Based Untargeted Lipidomics Reveal
407 Mechanism of Antifungal Activity of Carvacrol against *Aspergillus flavus*. Foods.
408 11(1):93. <https://doi.org/10.3390/foods11010093>
- 409 Rashid MH, Hossain MA, Kashem MA, Kumar S, Rafii MY, Latif MA (2014). Efficacy of
410 combined formulations of fungicides with different modes of action in controlling
411 *Botrytis* gray mold disease in chickpea. The Scientific World Journal, 1–6.
412 <https://doi.org/10.1155/2014/639246>
- 413 Ribeiro LDO, Barbosa S, Balieiro FP, Beijo LA, Santos BR, Gouvea CMCP, Paiva LV
414 (2012) Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens*
415 (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. Revista Brasileira de Biociências , 10(2):220-
416 225.
- 417 Sant DG, Tupe SG, Ramana CV, Deshpande MV (2016) Fungal cell membrane-promising
418 drug target for antifungal therapy. J. Appl. Microbiol, 121:1498-
419 1510 <https://doi.org/10.1111/jam.13301>
- 420 Santos AB, Dias LRC, Da Silva PHS, Laranjeira D, Athayde Sobrinho C, Da Silva L MA
421 (2024). Seed treatment with essential oils to control *Sclerotium rolfsii* Sacc. DELOS:
422 Desarrollo Local Sostenible, 17(55):01-17. <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n55-015>
- 423 Schmey T, Tominello-Ramirez CS, Brune C, Stam R, (2024) *Alternaria* diseases on potato
424 and tomato. Molecular Plant Pathology, 25(3):3435. <https://doi.org/10.1111/mpp.13435>
- 425 Singh HK, Singh RB, Kumar P, Singh M, Yadav JK, Singh PK, Chauhan MP, Shakywar R C,
426 Maurya KN, Priyanka BS, Srivastava T, Yadav SK, Maurya MK (2017). *Alternaria*
427 blight of rapeseed mustarda review. Journal of Environmental Biology, 38;1405-1420.
428 <https://doi.org/10.22438/jeb/38/6/MS-248>
- 429 Singh Saharan G, Mehta N, Meena PD (2016a) The Disease. In: Singh Saharan, G., Mehta,
430 N., Meena, P.D. *Alternaria* Diseases of Crucifers: Biology, Ecology and Disease
431 Management. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0021-8_2
- 432 Singh Saharan G, Mehta, N, Meena PD (2016b). Infection Process, Pathogenesis and Disease
433 Cycle. In: Singh Saharan, G., Mehta, N., Meena. *Alternaria* Diseases of Crucifers:
434 Biology, Ecology and Disease Management. Springer, Singapore.
435 https://doi.org/10.1007/978-981-10-0021-8_4
- 436 Thomma BPHJ (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specifi parasite. Molecular
437 plant pathology, 4(4):225-236.
- 438 Wang J, Zhou Y, Wang P, Zhao L, Zhang H, Qu H, Xu F (2024) Inhibitory Effect and
439 Mechanism of Carvacrol against Black Mold Disease Agent *Alternaria alternata* in
440 Goji Berries. Journal of Fungi. 2024; 10(6):402. <https://doi.org/10.3390/jof10060402>
- 441 Yin J, Wu S, Yang Y, Wang D, Ma Y, Zhao Y, Chen, Z. (2024). In Addition to Damaging the
442 Plasma Membrane, Phenolic Monoterpenoid Carvacrol Can Bind to the Minor Groove
443 of DNA of Phytopathogenic Fungi to Potentially Control Tea Leaf Spot Caused by
444 *Lasiodiplodia theobromae*. Phytopathology®, 114(4):700-716.
445 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-23-0263-R>

- 446 Zamuner CFC, Marin VR, Dilarri G, Hypolito GB, Sass DC, Ferreira H. (2023). Oregano
447 essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control
448 citrus canker. *Frontiers in Agronomy*, 5:1148969.
449 <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1148969>
- 450 Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H (2019) Antifungal activity of thymol and carvacrol
451 against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J Food Sci Technol*, 56:2611–2620.
452 <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0>

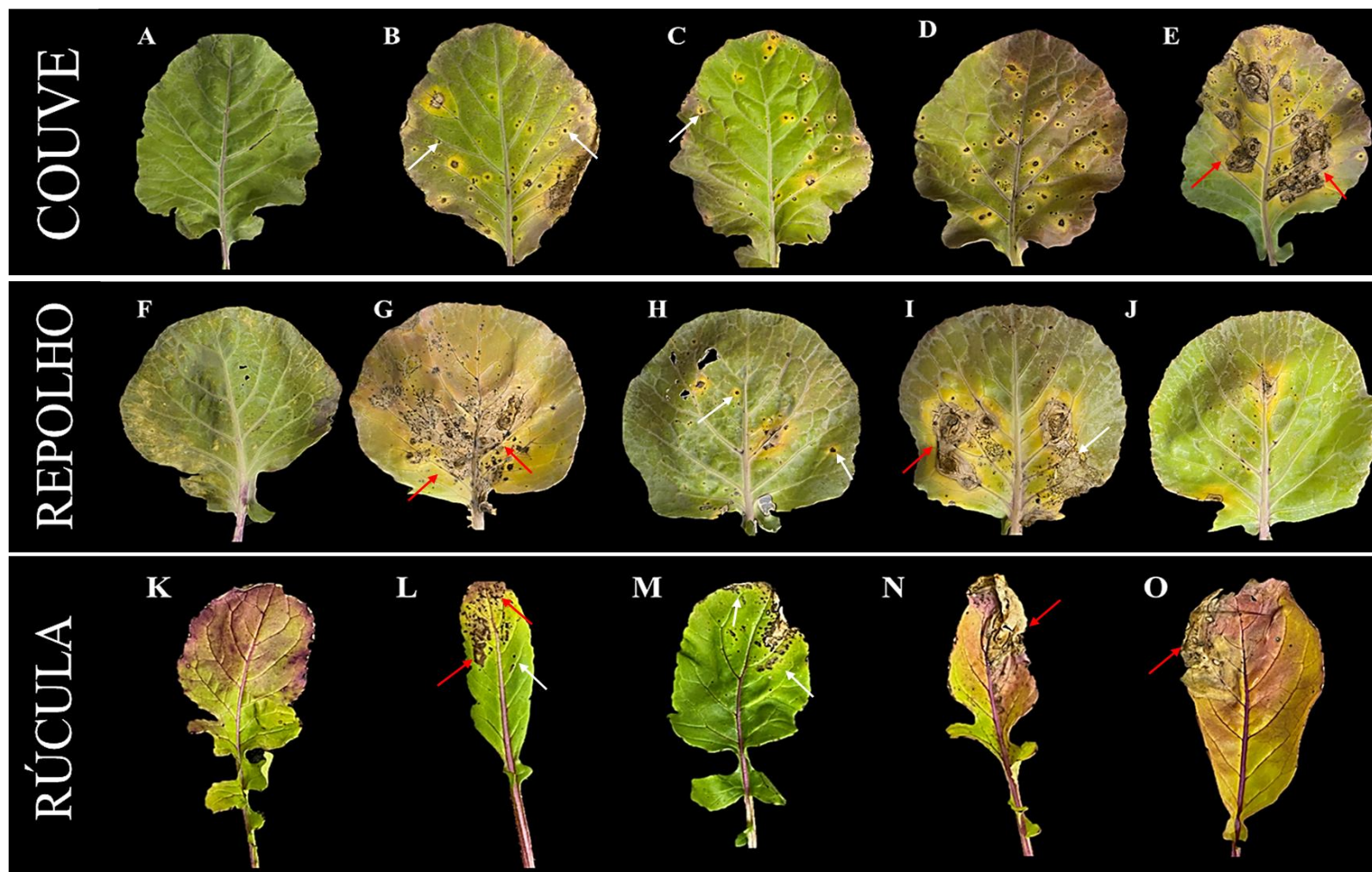


Figura 1. Sintomas de mancha-de-alternaria observados em folhas de brássicas (couve, repolho e rúcula), após 21 dias da data de inoculação de *Alternaria brassicicola*, isolados CFS131 (B, G e L), CFS132 (C, H e M), CFS135 (D, I e N) e CFS143 (E, J e O) tratamento controle (A, F, K). Setas brancas indicam sintomas iniciais; setas vermelhas indicam sintomas finais.

Dose em ppm	CFS-131	CFS-132	CFS-135	CFS-143
1000	**	**	**	**
950	**	**	**	**
900	**	**	**	**
850	**	**	**	**
800	**	**	**	**
750	**	**	**	**
700	**	**	**	**
650	**	**	*	*
600	**	**	*	*
550	**	**	*	*
500	**	**	*	*
450	**	**	*	
400	**	**	*	
350	*	*		
300	*	*		
250				
200				
150				
100				
50				
25				
13				
C-				
C+				

Figura 2. Avaliação da concentração mínima inibitória, para os isolados de *Alternaria brassicicola* (CFS131, CFS132, CFS135 e CFS143). as cores rosa e violeta indicam presença de respiração celular, azul indica ausência de respiração.

**Efeito fungicida; * Efeito fungistático;

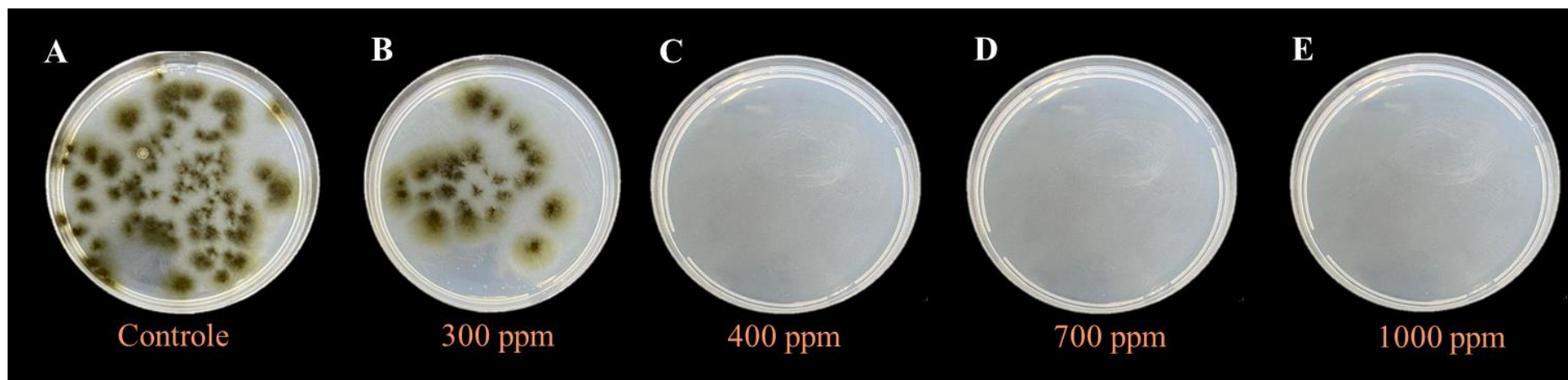


Figura 3. Colônias de *Alternaria brassicicola* emergentes observadas a partir recuperação de meio BD tratado com carvacrol, concentrações de 300, 400 700 e 1000 ppm demonstrando efeito fungistático (B) e efeito fungicida (C, D e E). Tratamento controle apresenta crescimento normal (A). Imagem representativa para os isolados CFS131 e CFS132.

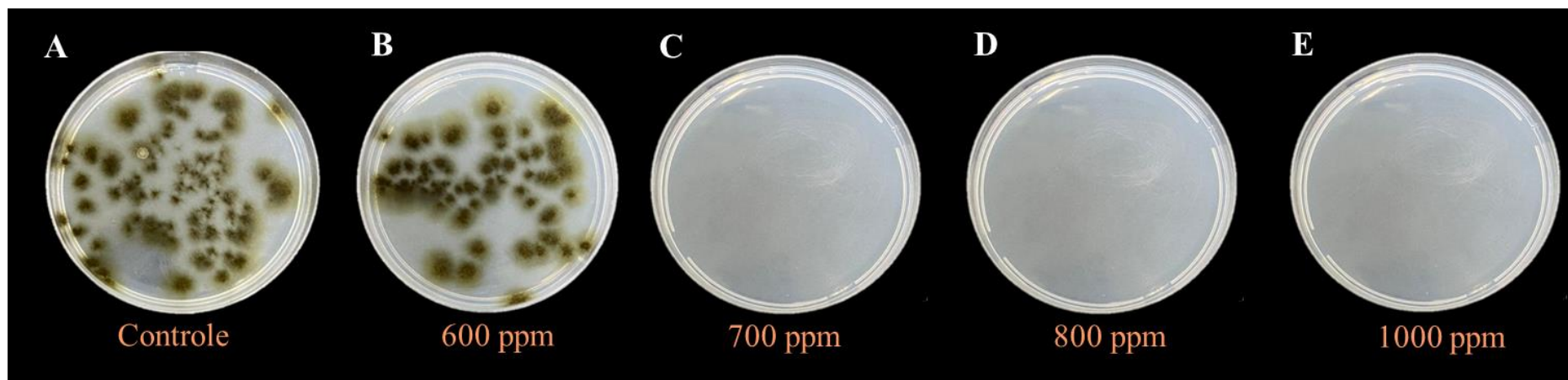


Figura 4. Colônias de *Alternaria brassicicola* emergentes observadas a partir recuperação de meio BD tratado com carvacrol, concentrações de 600, 700 800 e 1000 ppm demonstrando efeito fungistático (B) e efeito fungicida (C, D e E). Tratamento controle apresenta crescimento normal (A). Imagem representativa para os isolados CFS135 e CFS143.

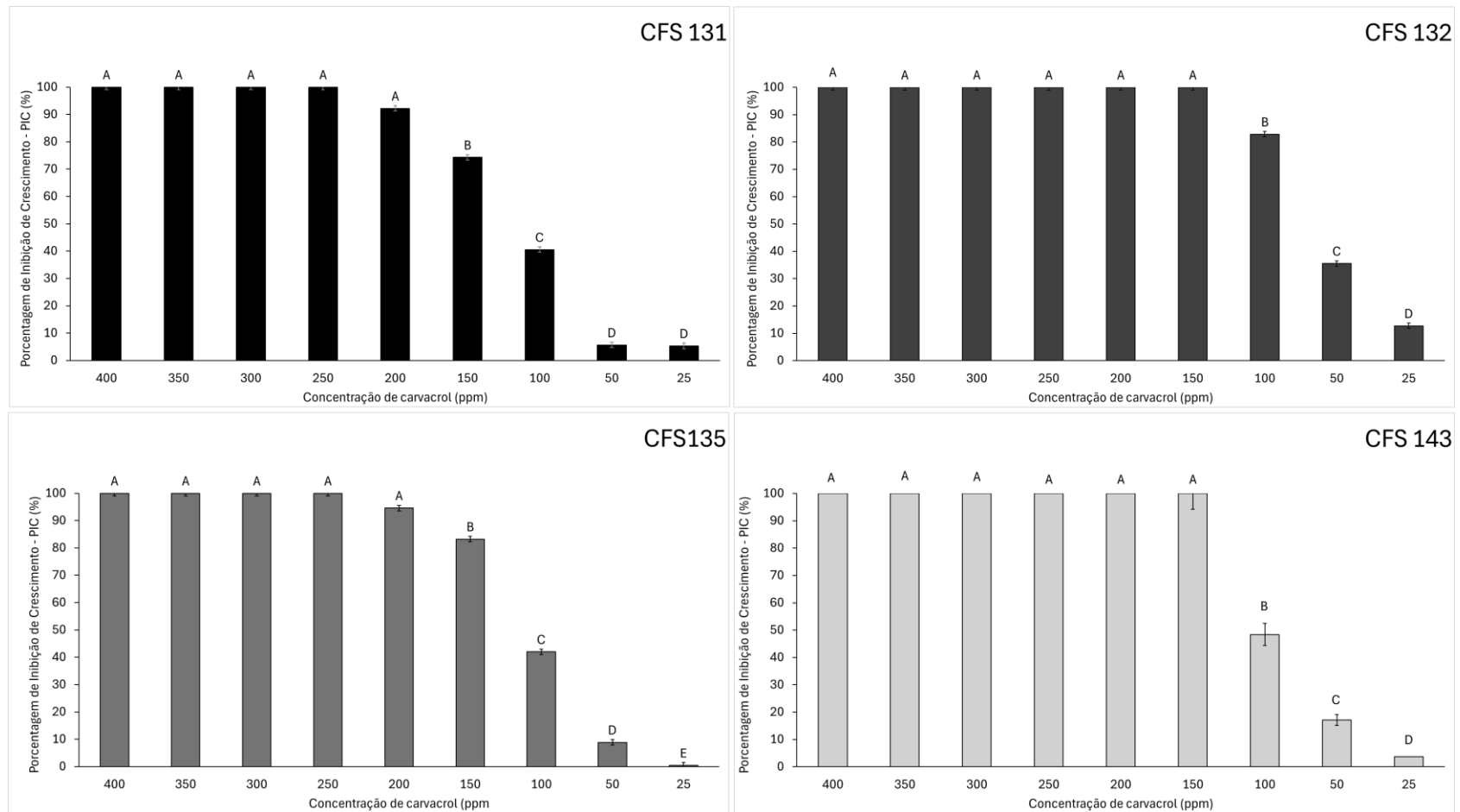


Figura 5 Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC %) de *Alternaria brassicicola* (CFS131, CFS132, CFS135 e CFS143) cultivados *in vitro* sob diferentes doses de carvacrol (ppm). Valores médios de PIC foram determinados segundo a equação: $PIC = \frac{Cc - Ct}{Cc} * 100$, sendo Cc = Crescimento do controle; Ct = Crescimento tratamento; Para um isolado, diferentes letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

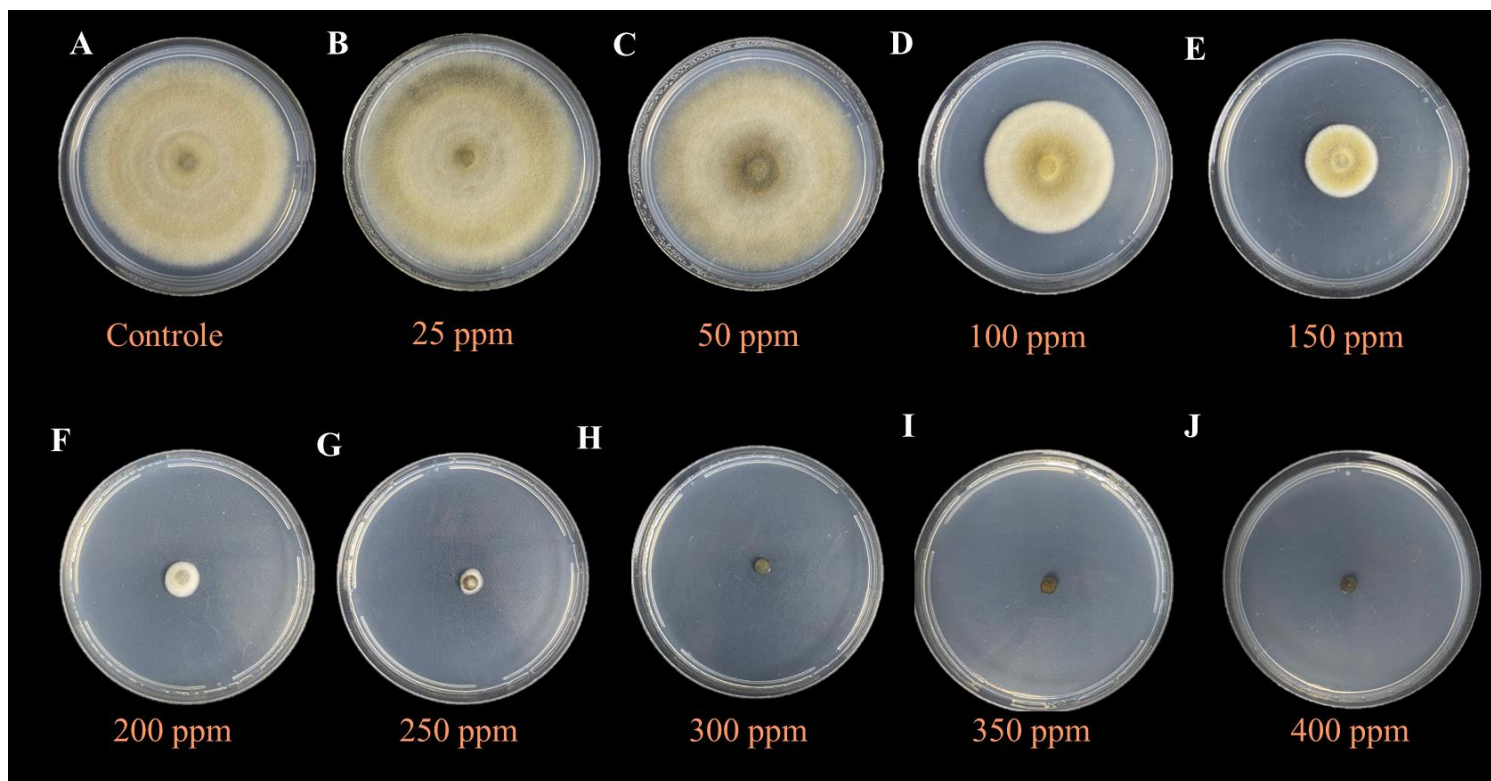


Figura 6. Observação dos padrões de desenvolvimento micelial de *Alternaria brassicicola*, isolado CFS131 em meio de cultura BDA, tratado com carvacrol, no intervalo de doses de 25 a 400 ppm (B, C, D, E, F, G, H, I e J) durante 15 dias. Controle (A) não acrescido de carvacrol.

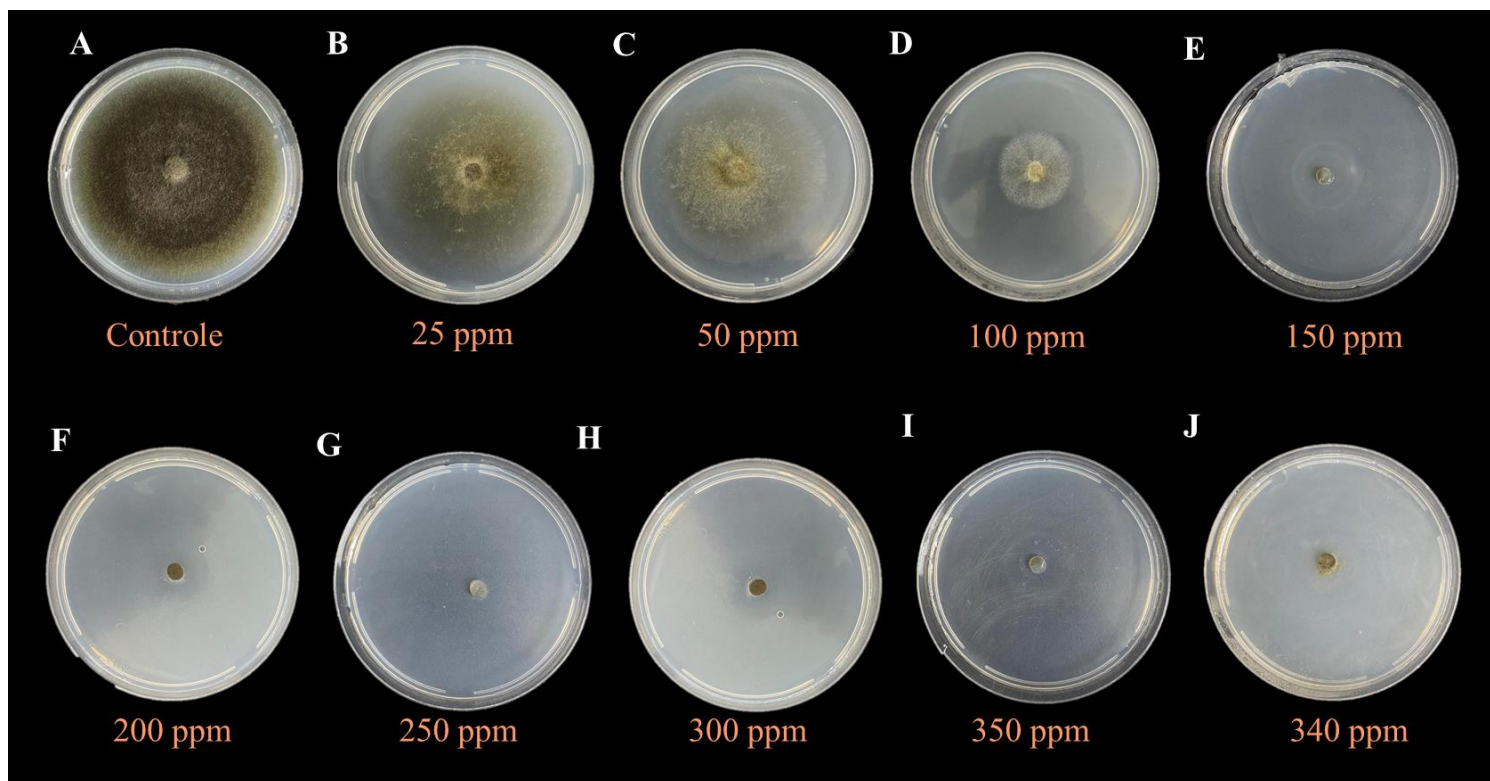


Figura 7. Observação dos padrões de desenvolvimento micelial de *Alternaria brassicicola*, isolado CFS132 em meio de cultura BDA, tratado com carvacrol, no intervalo de doses de 25 à 400 ppm (B, C, D, E, F, G, H, I e J) durante 15 dias. Controle (A) não acrescido de carvacrol.

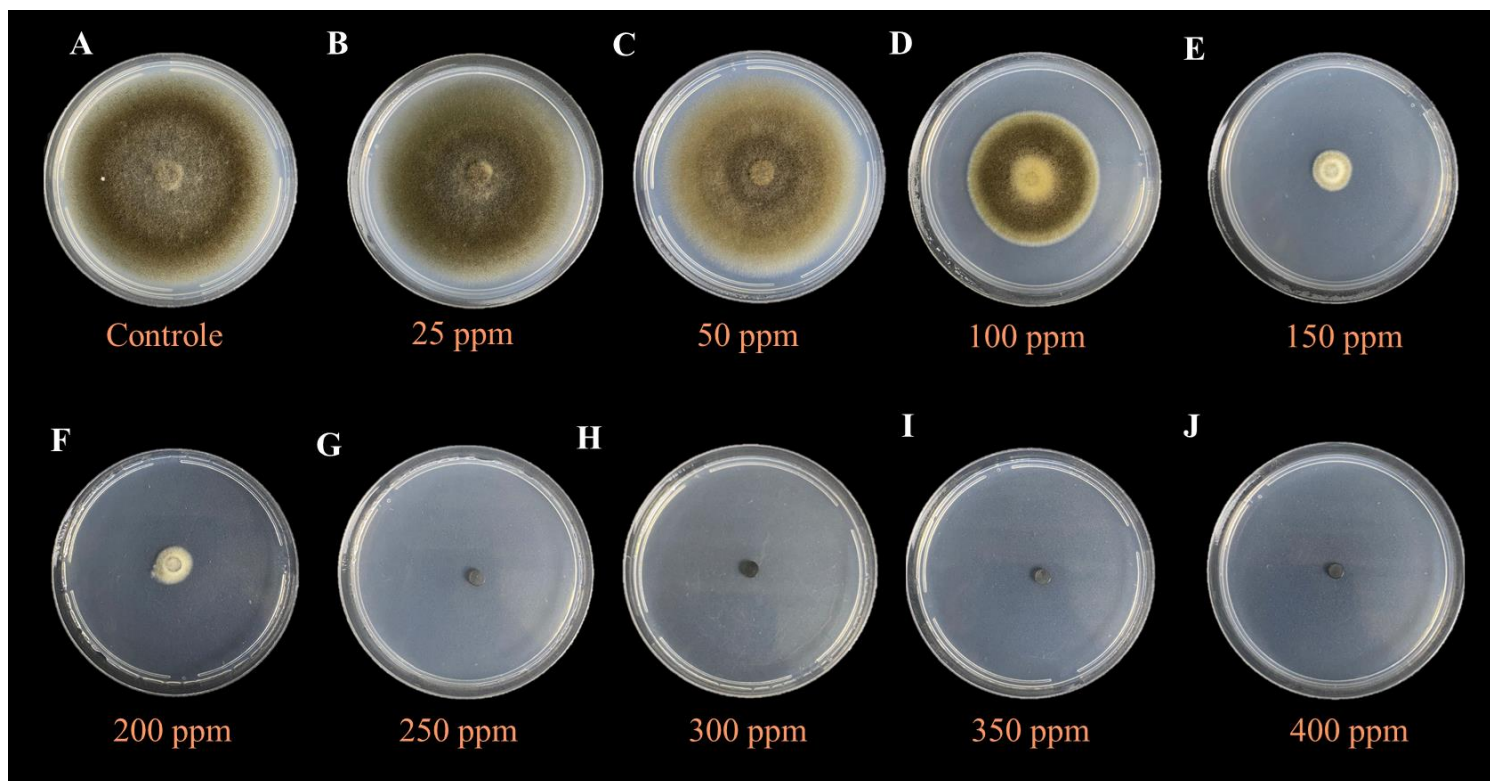


Figura 8. Observação dos padrões de desenvolvimento micelial de *Alternaria brassicicola*, isolado CFS135 em meio de cultura BDA, tratado com carvacrol, no intervalo de doses de 25 à 400 ppm (B, C, D, E, F, G, H, I e J) durante 15 dias. Controle (A) não acrescido de carvacrol.

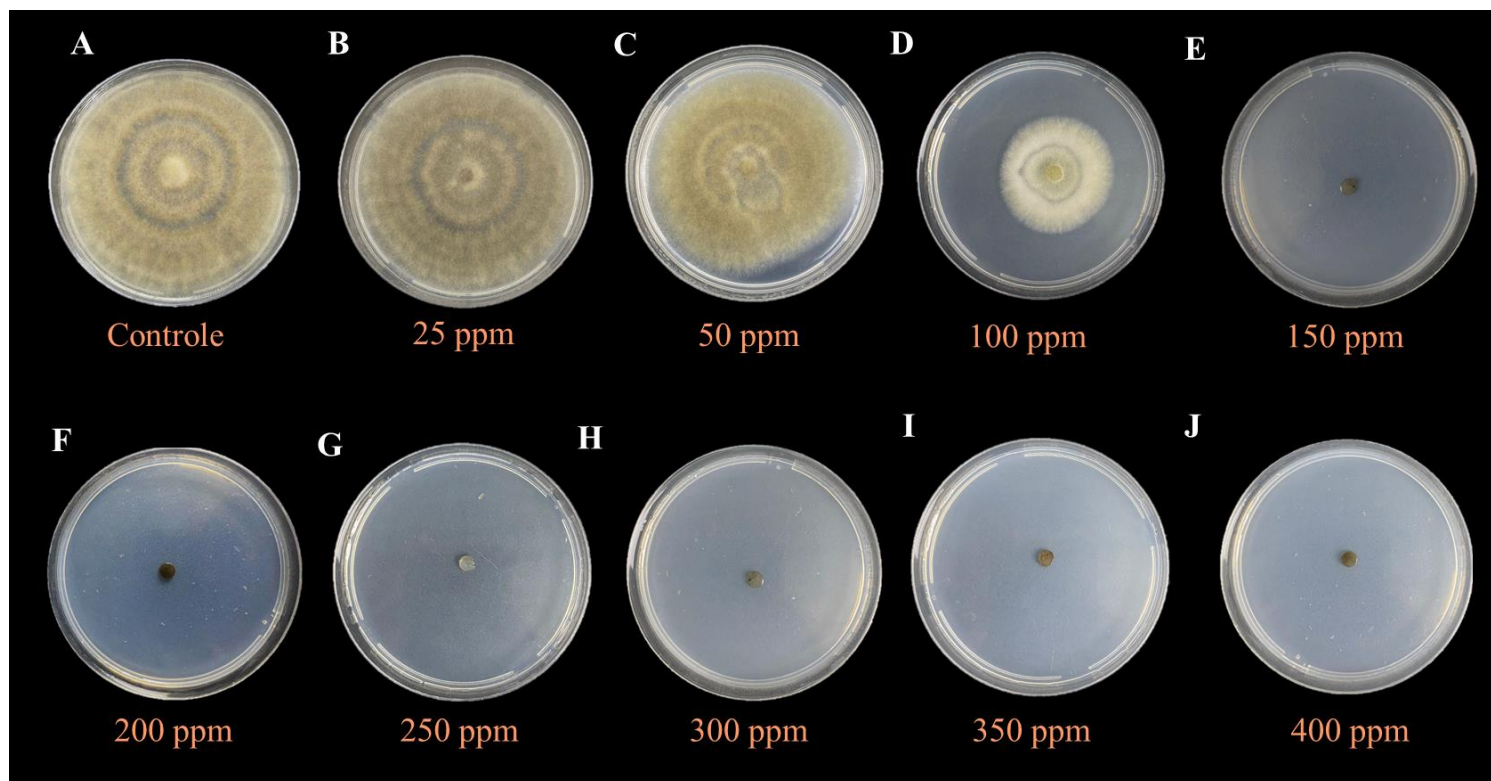


Figura 9. Observação dos padrões de desenvolvimento micelial de *Alternaria brassicicola*, isolado CFS135 em meio de cultura BDA, tratado com carvacrol, no intervalo de doses de 25 à 400 ppm (B, C, D, E, F, G, H, I e J) durante 15 dias. Controle (A) não acrescido de carvacrol.

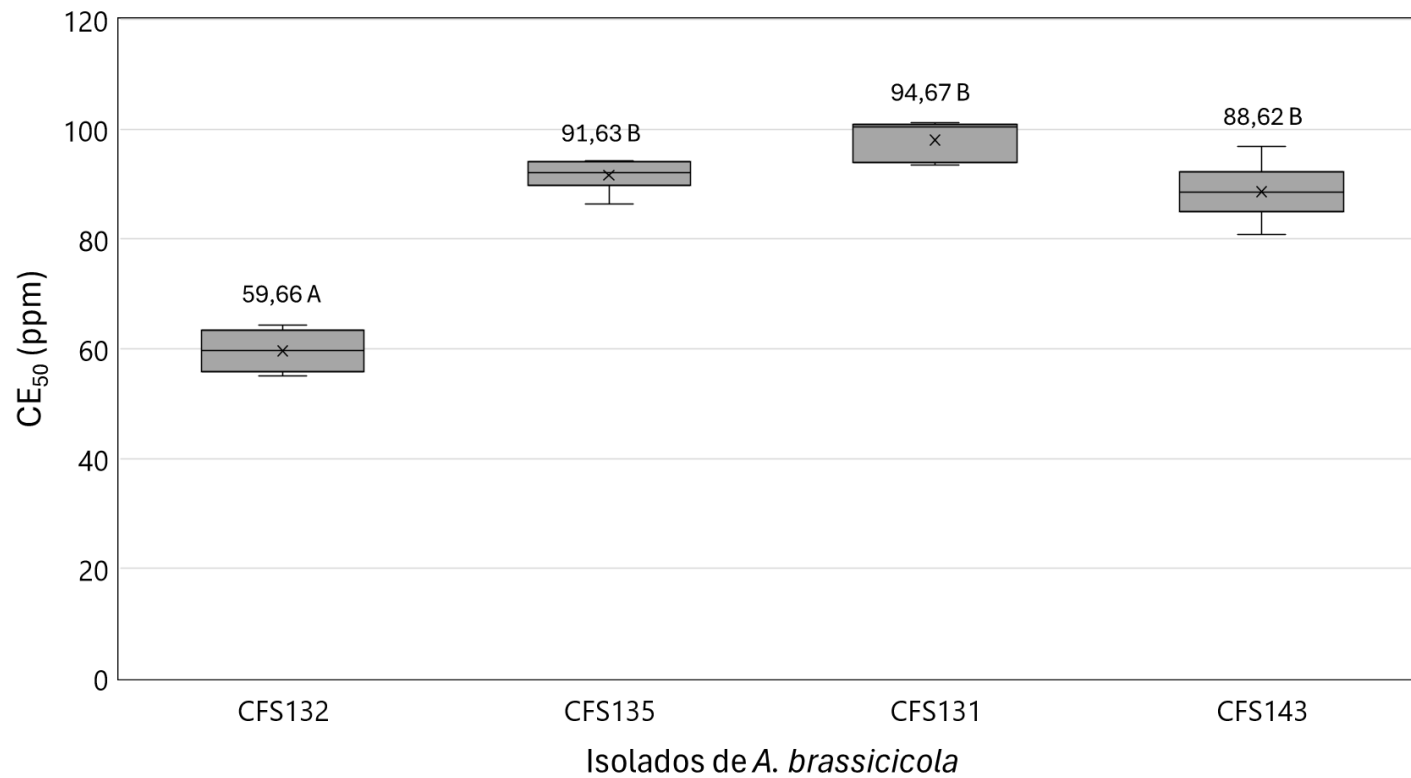


Figura 10. Determinação *in vitro* das doses de carvacrol capazes de inibir 50% do crescimento micelial - CE₅₀ (ppm) dos isolados de *Alternaria brassicicola* (CFS131, CFS132, CFS135 e CFS143). Nota: Gráfico boxplot com valores médios de CE₅₀ seguidos por letras maiúsculas (grafados acima do box). Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

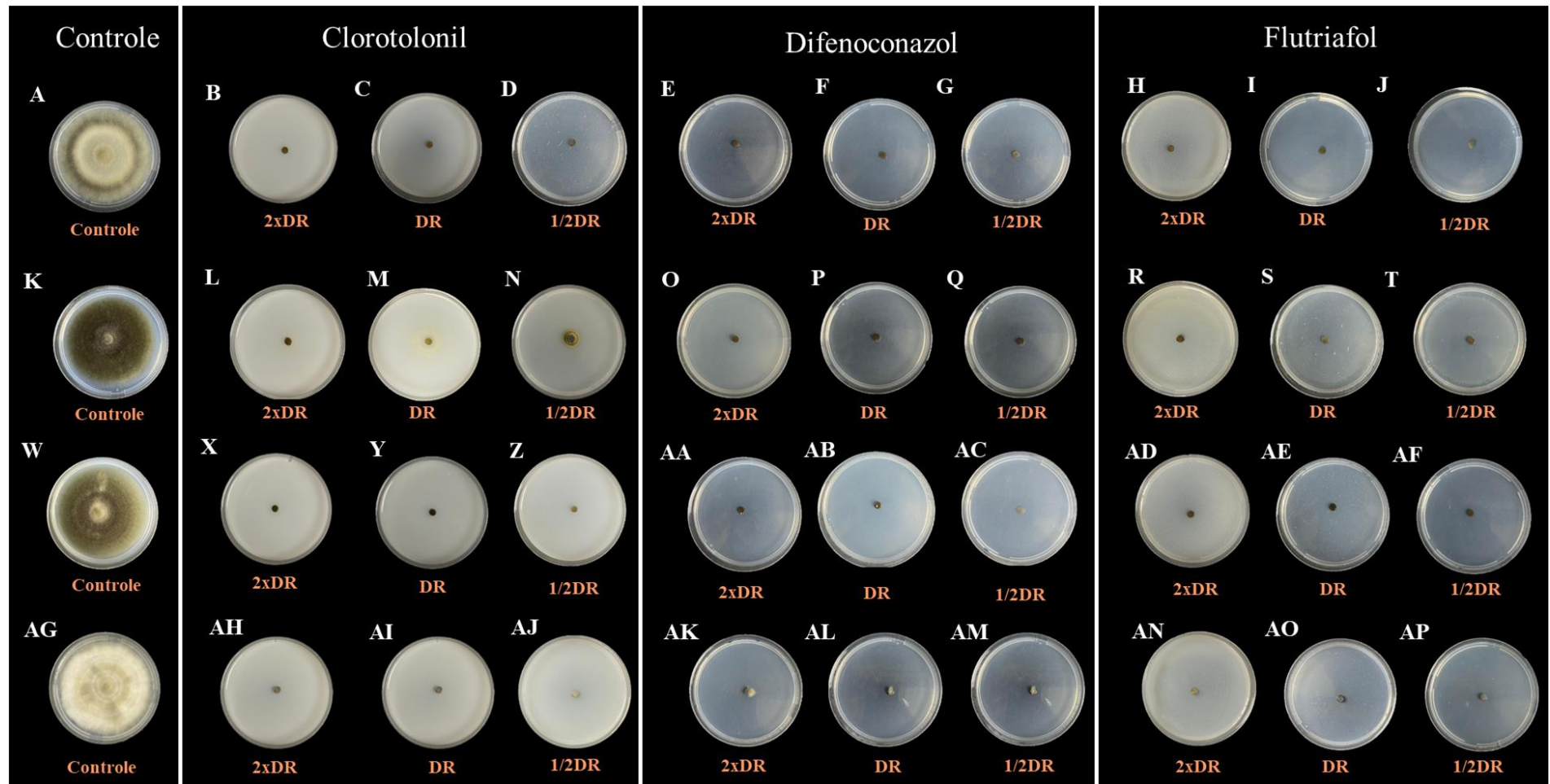


Figura 11. Análise do crescimento micelial dos isolados CFS3131 (B - J), CFS132 (L - T), CFS135 (X - AF) e CFS143 (AH - AP), em meio de cultura BDA tratado com produtos químicos a base de clorotolonil, difenoconazol e flutriafol, na dose recomendada (DR), duas vezes a dose recomendada (2xDR) e metade da dose recomendada (1/2DR), durante 15 dias. Controle (A, K, W e AG) não acrescido dos fungicidas.

Tabela 1. Efeito do carvacrol sobre a germinação in vitro de sementes de couve, repolho e rúcula, após quatro dias de incubação em meio agar água tratado com diferentes concentrações.

Carvacrol (ppm)	PG (%) [*]					
	Couve		Repolho		Rúcula	
0 ^{**}	99 ± 1,5	A	96 ± 2	A	99 ± 1,5	A
25	99 ± 1,5	A	95 ± 3,5	A	99 ± 1,5	A
50	99 ± 1,5	A	94 ± 4	A	96 ± 2	A
100	92 ± 2	A	93 ± 6,5	A	92 ± 4	A
150	96 ± 4	A	50 ± 10	B	75 ± 9	B
200	98 ± 2	A	25 ± 13	C	19 ± 7	C
250	92 ± 2	A	5 ± 1,5	D	7 ± 3	CD
300	75 ± 9	B	0 ± 0	D	2 ± 1	D

^{*} PG = Porcentagem de germinação de sementes. Valores médios ± valores de desvio médio; Na coluna, médias seguidas por letras diferentes diferem (p≤0,01) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em delineamento inteiramente casualizado.

^{**} Tratamento controle. Sementes germinadas na ausência de carvacrol.

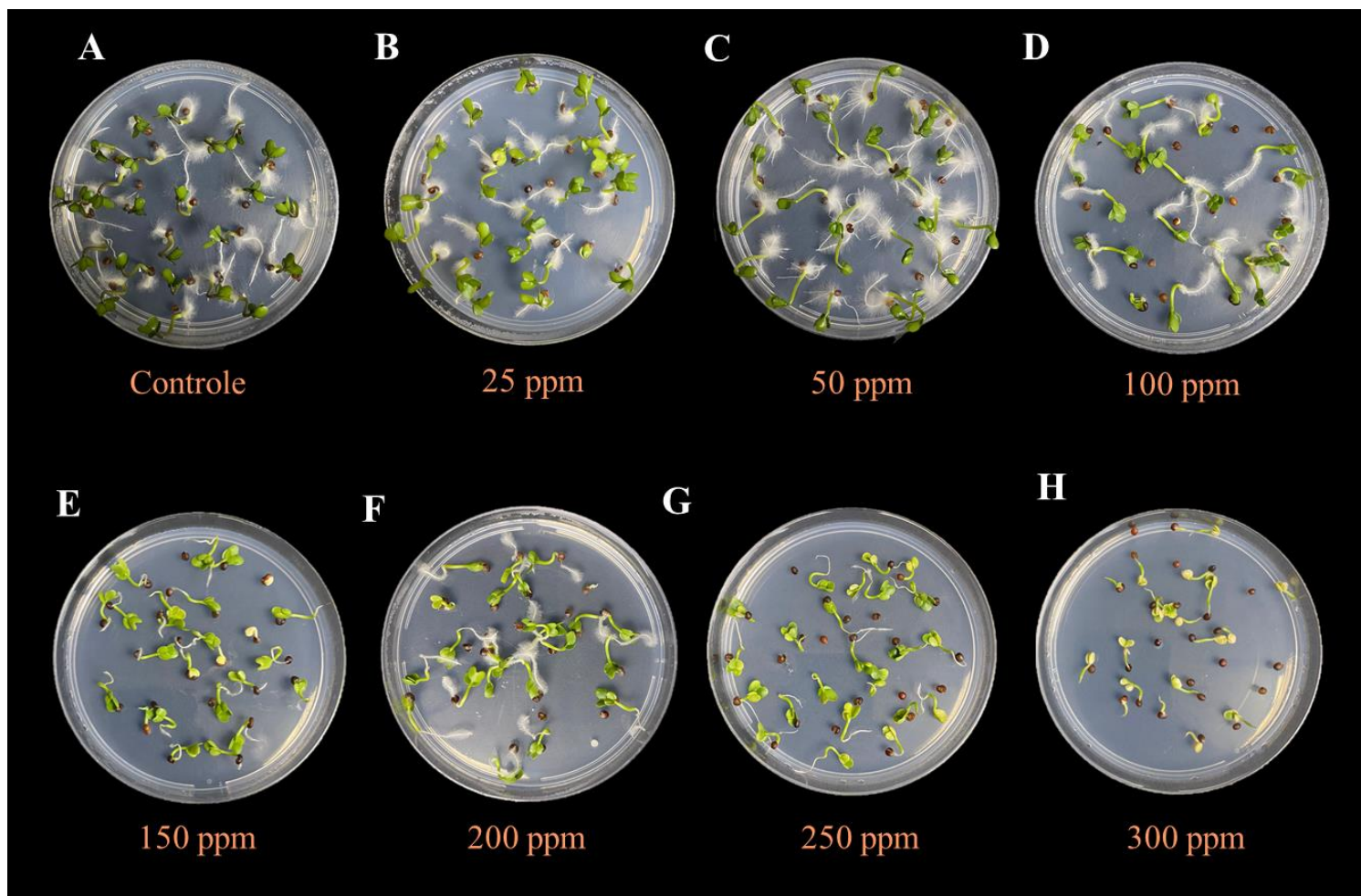


Figura 13. Padrão de germinação de sementes de couve-manteiga, em meio de cultura Agar água tratados com carvacrol, nas doses de 25 a 300 ppm (B, C, D, E, F, e H), por 4 dias. Controle (A) contendo apenas Agar água.

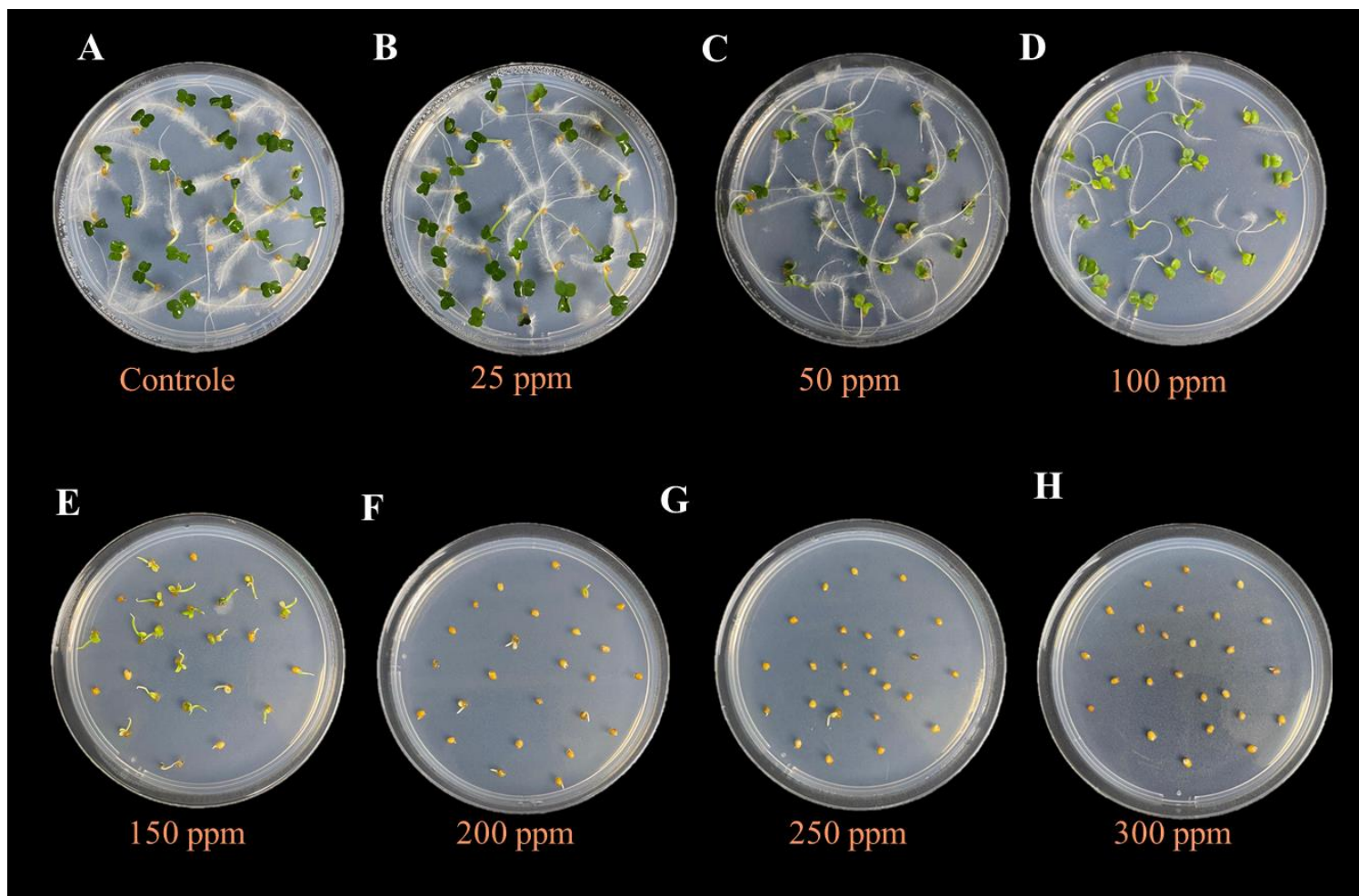


Figura 14. Padrão de germinação de sementes de repolho, em meio de cultura Agar água tratados com carvacrol, no intervalo de doses de 25 a 300 ppm (B, C, D, E, F, e H), por 4 dias. Controle (A) contendo apenas Agar água.

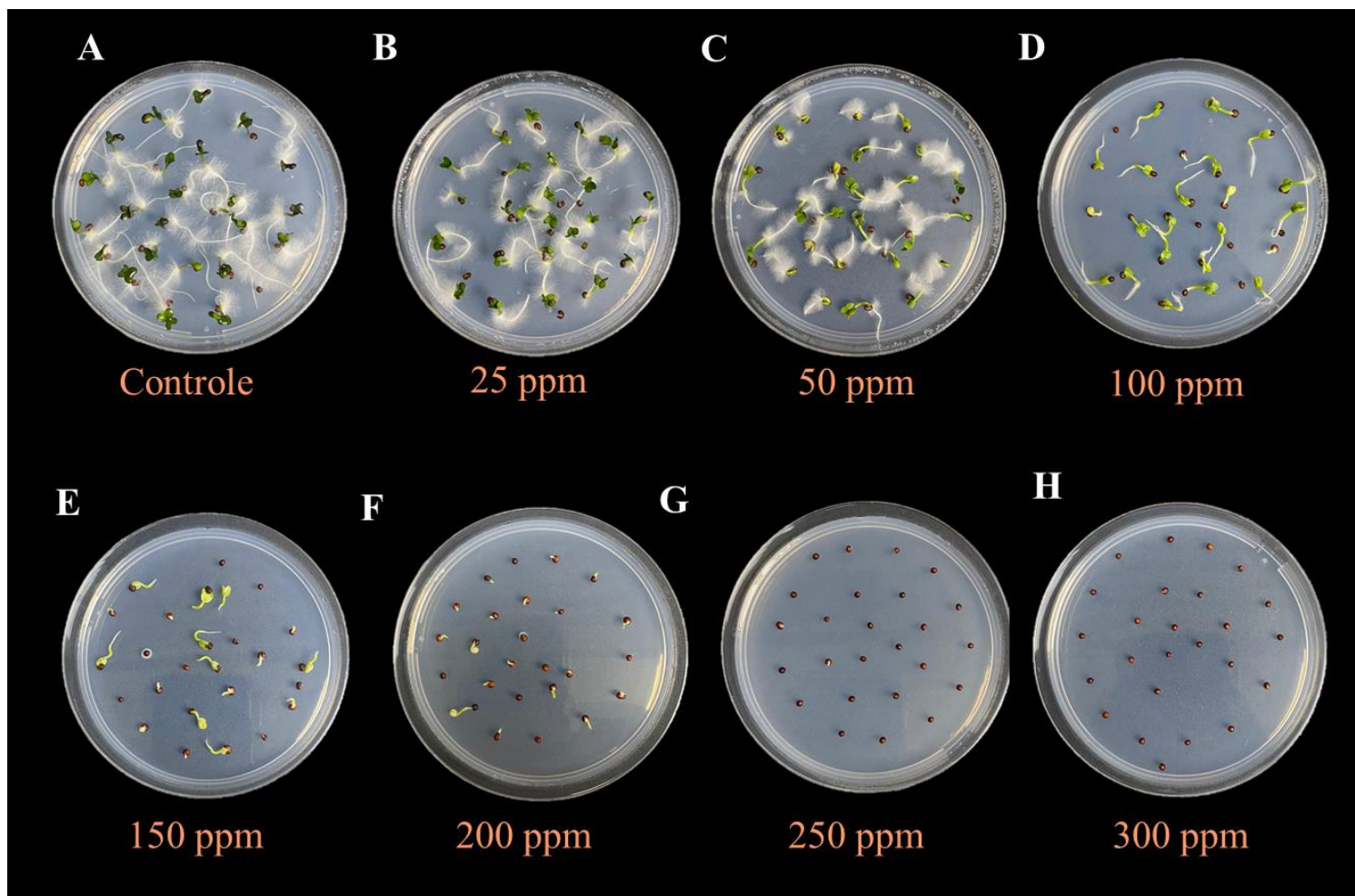


Figura 15. Padrão de germinação de sementes de rúcula, em meio de cultura Agar água tratados com carvacrol, no intervalo de doses de 25 a 300 ppm (B, C, D, E, F, e H), por 4 dias. Controle (A) contendo apenas Agar água.

CAPÍTULO III



Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

- O carvacrol mostrou-se eficiente no controle *in vitro* de *Alternaria brassicicola*.
- Todos os princípios ativos testados apresentaram 100% de inibição do crescimento de micelial de *A. brassicicola in vitro*.
- O carvacrol inibiu a germinação das sementes de repolho e rúcula significativamente nas concentrações a partir de 150 ppm.