

Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*

Natural monoterpenes effect on the mycelial growth and conidial germination of Corynespora cassiicola

Adriano Lopes Romero¹*, Ricardo Ribeiro de Oliveira², Rafaelle Bonzanini Romero¹, Alessandra Lescano de Almeida², Sergio Paulo Severo de Souza Diniz², João Batista Vida²

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Campo Mourão, BR 369, Km 0,5, CEP 87301-006, Campo Mourão, PR, Brasil
²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

*autor correspondente
✉ adrianoromero@utfpr.edu.br

RESUMO: Os monoterpenos possuem ampla diversidade estrutural e apresentam atividade inibitória contra uma grande gama de bactérias e fungos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fungitóxico de sete monoterpenos naturais {timol (1), carvacrol (2), *p*-cimeno (3), D-limoneno (4), (-)-mentona (5), (-)-mentol (6) e (+)-mentol (7)} sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. A partir da análise das estruturas moleculares dos monoterpenos 1-7 e seus efeitos nos testes avaliados, observou-se a seguinte sequência de atividade: fenóis > alcoóis > cetonas > hidrocarbonetos. Entre os monoterpenos avaliados, o timol (1), carvacrol (2), (-)-mentol (6) e (+)-mentol (7) foram eficientes no controle *in vitro* de *C. cassiicola*, contudo estudos complementares a campo são necessários para avaliar o potencial de uso desses compostos.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, atividade antifúngica, timol, carvacrol.

ABSTRACT: Monoterpenes have ample structural diversity and present inhibitory activity against a wide range of bacteria and fungi. In this context, the present work aimed to evaluate the fungitoxic effect of seven natural monoterpenes: {thymol (1), carvacrol (2), *p*-cymene (3), D-limonene (4), (-)-menthone (5), (-)-menthol (6), and (+)-menthol (7)} on the mycelial growth and conidial germination of *Corynespora cassiicola*. Based on the analyses of the molecular structures of monoterpenes 1-7 and their effect in the evaluated tests, the following sequence of activity was observed: phenols > alcohol > ketones > hydrocarbons. Among the monoterpenes evaluated, thymol (1), carvacrol (2), (-)-menthol (6), and (+)-menthol (7) were efficient in the *in vitro* control of *C. cassiicola*; however, complementary field studies are necessary to evaluate the potential application of these composites.

KEYWORDS: Natural products, antifungal activity, thymol, carvacrol.

Introdução

O desenvolvimento de métodos de controle de pragas, desde a origem da agricultura, tem sido um desafio para o homem e, dentro desta perspectiva, o principal método utilizado são os compostos químicos sintéticos. Problemas de poluição do meio ambiente e efeitos tóxicos de produtos químicos sintéticos aos organismos não alvos estimularam as pesquisas em torno do potencial de pesticidas de origem vegetal (AMADIOHA, 2000). Desta forma, vários óleos essenciais têm sido pesquisados como uma alternativa no controle fitossanitário em sistemas de cultivos, em substituição aos pesticidas sintéticos (DINIZ et al., 2009). Esses produtos naturais têm sido amplamente estudados

por possuírem alta atividade antimicrobiana, baixa toxicidade ao homem, serem de fácil degradação e por apresentarem pouco impacto ao meio ambiente (MARQUES; MONTEIRO; PEREIRA, 2004). Entre os constituintes dos óleos essenciais, os monoterpenos são reportados por suas atividades inibitórias contra várias bactérias e fungos. O timol (**1**) e o carvacrol (**2**), por exemplo, são dois fenóis monoterpênicos que apresentam atividade inibitória contra uma grande gama de bactérias (HAO; BRACKET; DOYLE, 1998; ULTEE; GORRIS; SMID, 1998) e fungos (CHAO; YOUNG, 2000; VÁZQUEZ et al., 2001).

Corynespora cassiicola, agente causal da mancha alvo ou mancha de corinespora, encontra-se associado a mais de 70 hospedeiras (SILVA et al., 1995), causando danos em algumas de expressão agrônômica, como tomate (LEROY; LOURD, 1989; SIVIERO; NODA; ASSIS, 1995), soja (YORINORI; HOMECHIN, 1977), pepino (VERZIGNASSI; VIDA; TESSMAM, 2003; VIDA et al., 2001), seringueira (GASPAROTTO; FERREIRA; JUNQUEIRA, 1988), mamoeiro (DUARTE; ASANO; ALBUQUERQUE, 1983), entre outras. Em pepino ‘tipo japonês’, a mancha alvo tem se destacado como uma das principais enfermidades nos períodos quentes do ano, causando danos de até 60% (VERZIGNASSI; VIDA; TESSMAM, 2003; VIDA et al., 2001). Fato semelhante tem ocorrido na cultura do tomate na região norte do Brasil, onde danos de até 100% à cultura são relatados (LEROY; LOURD, 1989). Ambos os autores, Verzignassi, Vida e Tessmam (2003) e Leroy e Lourd (1989), ressaltam a baixa eficiência dos fungicidas empregados para o controle da doença no campo.

A baixa eficiência no controle da mancha alvo pode estar relacionada com a resistência do patógeno a determinados grupos químicos tradicionalmente empregados para o controle a campo. Date et al. (2004) e Hasama, Morita e Kato (2001) identificaram a existência de biótipos de *C. cassiicola* resistentes a fungicidas do grupo dos Benzimidazóis (Tiofanato-metílico). Date et al. (2004) ainda relatam que, dos 193 isolados avaliados, um foi resistente a fungicidas do grupo das Estrubilurinas (azoxistrobina).

Assim, além dos problemas relacionados à poluição e toxicidade dos produtos químicos sintéticos, a baixa eficiência de alguns fungicidas no controle de *C. cassiicola* ressalta a necessidade de se encontrar novos compostos que possam ser utilizados no manejo dessa doença a campo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma série de monoterpenos naturais na germinação de conídios e crescimento micelial de *C. cassiicola* isolado de tomateiro.

Material e Métodos

Obtenção dos monoterpenos naturais

Neste trabalho, foram utilizados os seguintes monoterpenos: timol (**1**), carvacrol (**2**), *p*-cimeno (**3**), D-limoneno (**4**), (-)-mentona (**5**), (-)-mentol (**6**) e (+)-mentol (**7**). Estes monoterpenos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich ou isolados a partir de óleos essenciais, utilizando cromatografia em coluna de sílica gel.

Determinação da composição química

A identificação e a pureza dos monoterpenos foram determinadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$).

Obtenção e multiplicação do isolado de *Corynespora cassiicola*

O isolado de *C. cassiicola* foi obtido de plantas de tomateiro cv. Santa Clara com sintomas típicos de mancha alvo. O isolamento em cultura pura foi feito em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar), que foram utilizadas para a obtenção das culturas monospóricas. Estas culturas foram mantidas em tubos de ensaio com meio BDA à temperatura de 8 ± 2 °C para o armazenamento. Para a multiplicação, fragmentos de micélio da cultura monospórica foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, e estas foram mantidas em câmara climatizada do tipo ‘BOD’, a 25 ± 2 °C, sob luz fluorescente contínua, por 7 dias.

Atividade antifúngica

Efeito de monoterpenos no crescimento micelial: O meio de cultivo BDA foi preparado conforme a rotina, em *erlenmeyers* com a capacidade de 1,0 litro. Contudo, momentos antes de serem vertidos em placas de Petri, quando a temperatura encontrava-se em torno de 40 °C, foram adicionadas aos recipientes soluções contendo os monoterpenos de interesse, previamente preparadas. Estes foram agitados suavemente para que fossem homogeneizados, de modo que, no final, fossem obtidas placas de Petri contendo o meio com as diferentes concentrações de cada monoterpeno a ser avaliado (250; 500; 1000 e 5000 ppm). Foram utilizadas três placas de Petri (9,0 cm Ø) por tratamento. Depois da solidificação, discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro, e sete dias de idade, foram transferidos para o centro das placas, e estas foram incubadas em câmara climatizada do tipo ‘BOD’, a 25 ± 2 °C, sob luz fluorescente contínua. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas após oito dias, de maneira qualitativa, adotando-se a seguinte escala: (-) Ausência de crescimento; (+) até 1 cm; (++) 1,1 a 2,5 cm; (+++) > 2,6 cm.

Efeito de monoterpenos na germinação de conídios: Placas de Petri, contendo culturas monospóricas de *C. cassiicola*, com 14 dias de idade, foram utilizadas para a obtenção da suspensão de conídios. Em cada placa, adicionaram-se 8,0 mL de água destilada e esterilizada e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, raspou-se a superfície do meio de cultivo para a liberação dos conídios das hifas. O extrato obtido foi filtrado em dupla camada de gaze para a obtenção da suspensão de conídios, a qual foi ajustada para a concentração de 5×10^4 conídios/mL. Para a avaliação da germinação de conídios de *C. cassiicola* mediante a aplicação dos diferentes monoterpenos, foram utilizadas placas de ELISA com 96 “poços” (*wells*). Cada tratamento foi composto de três repetições, sendo um “poço” considerado uma unidade experimental. Em cada “poço” (*well*) da placa, foram depositados 100 µL da suspensão de conídios e, em seguida, 100 µL de solução de cada monoterpeno, de forma que se obtivessem concentrações finais de 250; 500;

1000; e 5000 ppm. Depois da preparação, as placas foram mantidas a 25 °C sob iluminação constante durante 48 horas. Para a determinação do número de conídios germinados de cada tratamento e repetição, utilizou-se microscópio óptico. Para tal, as placas de Elisa foram drenadas e, para a visualização ao microscópio, foram invertidas.

Resultados e Discussão

Os efeitos dos monoterpenos timol (**1**), carvacrol (**2**), *p*-cimeno (**3**), D-limoneno (**4**), (-)-mentona (**5**), (-)-mentol (**6**) e (+)-mentol (**7**), Figura 1, sobre o crescimento micelial e germinação de conídios do fitopatógeno *C. cassiicola* são apresentados na Tabela 1. Observou-se que os efeitos dos monoterpenos sobre o crescimento micelial e/ou germinação de conídios do fitopatógeno *C. cassiicola* são dependentes da concentração e da estrutura molecular.

Entre todos os monoterpenos testados, apenas o timol (**5**) inibiu completamente o crescimento micelial de *Corynespora cassiicola*, em todas as concentrações avaliadas. Para este monoterpeno, a inibição completa da germinação de conídios ocorreu para as três maiores concentrações (500; 1000; e 5000 ppm), sendo observada, para a menor concentração (250 ppm), uma inibição de 82,0%. Resultado semelhante foi observado para o carvacrol (**2**), que inibiu completamente tanto o crescimento micelial, quanto a germinação de conídios nas três maiores concentrações avaliadas (500; 1000; e 5000 ppm). Contudo, na menor concentração, observou-se um pequeno crescimento micelial [(+) até 1,0 cm], e inibição de 40,0% da germinação de conídios (Tabela 1). Estes resultados sugerem que a posição do grupo OH no anel aromático influencia muito pouco as atividades avaliadas. Vários óleos essenciais que possuem em sua composição timol (**1**) e/ou carvacrol (**2**) apresentam atividade antimicrobiana contra um

amplo espectro de micro-organismos. Diniz et al. (2009), por exemplo, observaram que o óleo essencial de tomilho, constituído por timol (50%), *p*-cimeno (20%), carvacrol (4,5%) e outros (25,5%), apresentaram atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* e *Myrothecium verrucaria*. Segundo Juven et al. (1994), os fenóis monoterpênicos **1** e **2** ligam-se aos grupos amins e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas das bactérias, alterando sua permeabilidade e resultando na morte da bactéria. Já a atividade antifúngica pode ser explicada, segundo Zambonelli et al. (1996), pela degeneração das hifas, que causa a liberação do conteúdo celular.

Para os monoterpenos *p*-cimeno (**3**) e D-limoneno (**4**), em todas as concentrações avaliadas, observaram-se crescimento micelial e germinação de conídios (Tabela 1). Estes resultados sugerem que a hidrofobicidade dos monoterpenos não é um requisito para as atividades em questão, uma vez que o *p*-cimeno (**3**), precursor dos fenóis monoterpênicos **1** e **2**, apesar de possuir alto coeficiente de partição, influenciou muito pouco o crescimento micelial, assim como a germinação de conídios de *C. cassiicola*. No entanto, a presença do grupo OH nos monoterpenos **1** e **2** é de extrema importância para conferir os efeitos de inibição do crescimento micelial e de germinação de conídios de *C. cassiicola*. Essas características estruturais são concordantes com o mecanismo de ação proposto por Juven et al. (1994) e Zambonelli et al. (1996), no qual a presença de grupos hidrofílicos na estrutura molecular aumenta significativamente a atividade antibacteriana e/ou antifúngica.

Para o monoterpeno (-)-mentona (**5**), observou-se inibição completa no crescimento micelial e na germinação de conídios na maior concentração utilizada (5000 ppm). Na concentração de 1000 ppm, observou-se inibição de 100,0% do crescimento micelial e de 76,0% da germinação dos conídios. Para as demais concentrações, 500 e 250 ppm, observaram-se crescimento

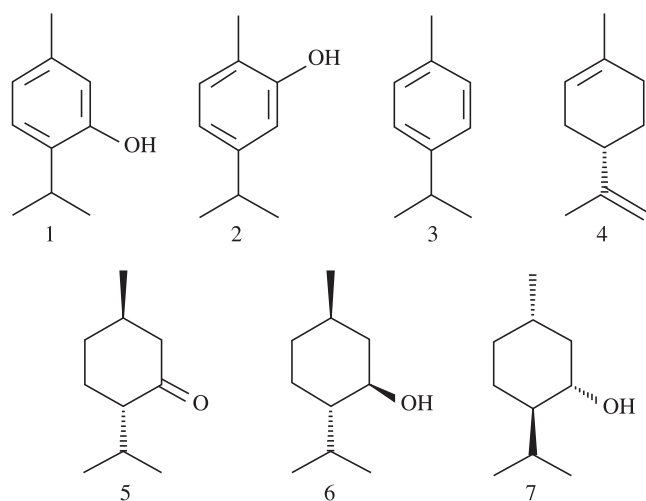


Figura 1. Monoterpenos naturais abundantes em óleos essenciais: timol (**1**), carvacrol (**2**), *p*-cimeno (**3**), D-limoneno (**4**), (-)-mentona (**5**), (-)-mentol (**6**) e (+)-mentol (**7**).

Tabela 1. Efeito de alguns monoterpenos na germinação de conídios e crescimento micelial de *C. cassiicola*.

Composto	Concentração (ppm)			
	250	500	1000	5000
timol	82%* (-)**	100% (-)	100% (-)	100% (-)
carvacrol	40% (+)	100% (-)	100% (-)	100% (-)
<i>p</i> -cimeno	0% (+++)	16% (++)	16% (+)	16% (+)
D-limoneno	16% (+++)	16% (+++)	40% (++)	60% (+)
(-)-mentona	6% (+++)	24% (++)	76% (-)	100% (-)
(-)-mentol	30% (++)	42% (-)	100% (-)	100% (-)
(+)-mentol	30% (+)	56% (-)	100% (-)	100% (-)

*Porcentagem de conídios não germinados, ** Crescimento micelial: +++ vigoroso, ++ moderado, + leve, - ausente.

micelial de “+++” e “++” e inibição da germinação de conídios de 6,0% e 24,0%, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados sugerem, assim como na discussão anterior, que a presença de um grupo hidrofílico nos monoterpenos aumenta a atividade frente ao *C. cassicola*. Uma possível explicação para esta observação é a menor habilidade de formar ligações de hidrogênio do monoterpeno **5** em relação os fenóis monoterpênicos **1** e **2**.

Os monoterpenos enantioméricos (–)-mentol (**6**) e (+)-mentol (**7**) comportaram-se de forma semelhante nos testes avaliados. Para as concentrações de 5000 e 1000 ppm, observou-se completa inibição tanto do crescimento micelial, quanto da germinação de conídios. Para a concentração de 500 ppm, observaram-se inibição completa do crescimento micelial e inibição da germinação de conídios de 42,0% e 56,0%, respectivamente para o (–)-mentol (**6**) e o (+)-mentol (**7**). Na menor concentração (250 ppm), constataram-se um crescimento micelial de “++” e “+”, respectivamente para o (–)-mentol (**6**) e o (+)-mentol (**7**), e inibição da germinação de conídios de 30,0% para ambos (Tabela 1). Estes resultados sugerem que: i) monoterpenos enantioméricos não apresentam diferenças significativas frente ao fitopatógeno *C. cassicola*; ii) fenóis monoterpênicos são mais ativos frente ao fitopatógeno *C. cassicola* do que os alcoóis monoterpênicos.

A partir da análise das estruturas moleculares dos monoterpenos **1-7** e seus efeitos nos testes avaliados, observou-se a seguinte sequência de atividade: fenóis > alcoóis > cetonas > hidrocarbonetos. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Kurita e Koike (1983), que reportaram que a atividade antifúngica de óleos essenciais frente ao *Fusarium verticillioides* segue a seguinte sequência de atividade: fenóis > alcoóis > aldeídos > cetonas > hidrocarbonetos.

Conclusão

Os resultados obtidos *in vitro* sugerem a potencialidade de aplicação dos monoterpenos timol, carvacrol e mentol para o controle de doenças ocasionadas pelo fitopatógeno *Corynespora cassicola*. No entanto, estudos futuros desenvolvidos a campo são requeridos para avaliar a fungitoxicidade e viabilidade destes monoterpenos.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Referências

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachia indica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 287-290, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00080-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00080-0)

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, n. 5, p. 639-649, 2000. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>

DATE, H. et al. Sensitivity of *Corynespora cassicola*, causal agent of *Corynespora* leaf spot of cucumber, to thiophanate-methyl, diethofencarb and azoxystrobin. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 70, n. 1, p. 10-13, 2004. <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.70.10>

DINIZ, S. P. S. S. et al. Atividade do óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra Fungos Fitopatogênicos. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

DUARTE, M. L. R.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. C. Estudos comparativos das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 205-214, 1983.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, N. T. V. Mancha de *Corynespora cassicola* em folhas de seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 278-280, 1988.

HAO, Y. Y.; BRACKET, R. E.; DOYLE, M. P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. **Food Microbiology**, London, v. 15, n. 4, p. 367-378, 1998. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1997.0193>

HASAMA, W.; MORITA, S.; KATO, T. Control of *Corynespora* Target Leaf Spot of Cucumber by Use of Negatively-Correlated Cross Resistance between Benzimidazole Fungicides and Diethofencarb. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 57, n. 3, p. 319-325, 2001. <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.57.319>

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 626-631, 1994. PMID:8027009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x>

KURITA, N.; KOIKE, S. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oils components. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 67-75, 1983. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb1961.47.67>

LEROY, M.; LOURD, M. Doença foliar do tomateiro causada por *Corynespora cassicola* em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 32-36, 1989.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

SILVA, W. P. K. et al. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassicola*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 43, n. 3, p. 609-618, 1995. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9950609>

SIVIERO, A.; NODA, H.; ASSIS, L. A. G. Progresso da mancha alvo do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 281, 1995. Suplemento.

ULTEE, A.; GORRIS, L. G. M.; SMID, E. J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 211-218, 1998. PMID:9750293. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00467.x>

- VÁZQUEZ, B. L. et al. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 157-163, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00429-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00429-9)
- VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; TESSMAM, D. J. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino “japonês” sob estufa no Norte do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 570, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000500023>
- VIDA, J. B. et al. Manejo de doenças em cultivos protegidos. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado, fitossanidade, cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2001. p. 53-118.
- YORINORI, J. T.; HOMECHIN, M. Doenças de soja identificadas no Estado do Paraná no período de 1971 a 1976. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 108, 1977.
- ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9-10, p. 491-494, 1996. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb00330.x>

Recebido: 02/09/2011
Aprovado: 28/12/2012