UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAMES MATHEUS OSSACZ LACONSKI

ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA SOB O DESENVOLVIMENTO MICELIAL DO AGENTE CAUSAL DA CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO (*Pseudocercospora kaki)*

IVAIPORÃ, PR

2024

JAMES MATHEUS OSSACZ LACONSKI

ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA SOB O DESENVOLVIMENTO MICELIAL DO AGENTE CAUSAL DA CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO (*Pseudocercospora kaki)*

Artigo apresentado ao curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Fitossanidade.

Orientadora: Profa. Dra. Natasha Akemi Hamada

IVAIPORÃ, PR

2024

Óleo essencial de cravo da índia sob o desenvolvimento micelial do agente causal da cercosporiose do caquizeiro (*Pseudocercospora kaki*)

James Matheus Ossacz Laconski

RESUMO

O estudo objetivou verificar o efeito da utilização de óleo essencial de cravo da índia (*Syzygium aromaticum)* sob o desenvolvimento micelial do fungo *Pseudocercospora kaki*, agente causal da cercosporiose do caquizeiro. O mesmo contou com 7 tratamentos, sendo: T1) testemunha; T2) 0,001 µL mL^{-1}; T3) 0,001 µL mL^{-1}; T4) 0,1 µL mL^{-1}; T5) 1,0 µL mL^{-1}; T6) 5,0 µL mL^{-1}; T7) 10,0 µL mL^{-1}. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de petri. Os tratamentos foram acrescidos ao meio de cultura BDA fundente (45-50 ºC) e vertidos em placa de Petri de 9 cm de diâmetro. No centro de cada placa foi adicionado um disco de colônia fúngica de 5 mm de diâmetro, e estas por sua vez foram incubadas em estufa tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas, sob temperatura de 22 ± 2 °C. Aos 3 até os 10 dias de incubação, foi avaliado o diâmetro médio das colônias, aos 6 e 10 dias a porcentagem de inibição do crescimento micelial e após a coleta de dados calculou-se a taxa de crescimento micelial. Houve inibição do crescimento micelial do patógeno quando na presença de doses iguais ou superiores a 1,0 µL mL^{-1} de óleo essencial de cravo da índia, evidenciando a presença de compostos com efeito antimicrobiano e o potencial de uso deste no controle de *P. kaki*.

Palavras-chave: *Diospyros kaki. Syzygium aromaticum*. Controle alternativo. Doença. Micélio.

ABSTRACT

The study aimed to verify the effect of using clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) on the mycelial development of the fungus *Pseudocercospora kaki*, the causal agent of persimmon leaf spot. The experiment included seven treatments: T1) control; T2) 0.001 µL mL^{-1}; T3) 0.001 µL mL^{-1}; T4) 0.1 µL mL^{-1}; T5) 1.0 µL mL^{-1}; T6) 5.0 µL mL^{-1}; T7) 10.0 µL mL^{-1}. A completely randomized design was used with eight replicates, each consisting of a Petri dish. The treatments were added to BDA culture medium, melted (45-50 °C), and poured into 9 cm diameter Petri dishes. A 5 mm diameter fungal colony disc was placed in the center of each dish, and they were incubated in a BOD incubator, with a 12-hour photoperiod, at a temperature of 22 ± 2 °C. From 3 to 10 days of incubation, the average colony diameter was evaluated, and at 6 and 10 days, the percentage of mycelial growth inhibition was assessed. After data collection, the mycelial growth rate was calculated. Inhibition of the pathogen's mycelial growth occurred in the presence of doses equal to or greater than 1.0 µL mL^{-1} of clove essential oil, highlighting the presence of compounds with antimicrobial effects and the potential use of this oil in the control of *P. kaki*.

Keywords: *Diospyros kaki. Syzygium aromaticum*. Alternative control. Disease. Mycelium

1 INTRODUÇÃO

A intensificação da produção agrícola, traz como consequência a diminuição da diversificação de espécies nos cultivos, e por conseguinte há a ocorrência de doenças de plantas em níveis que exijam controles mais eficientes. Dessa forma, a necessidade de utilização de agrotóxicos para o controle de doenças tem sido cada vez mais frequente na agricultura. Esse método de controle químico, embora se destaque por sua simplicidade e efetividade, tem seus efeitos positivos suprimidos pela favorabilidade de ocorrência de microrganismos resistentes, contaminação do solo e da água, presença de resíduos nos produtos agrícolas e desequilíbrio ambiental (PIERRE, 2009; VENTUROSO et al., 2011).

Dessa forma, métodos de controle alternativos, voltados a minimização desses impactos no ambiente e ao homem são cada vez mais exigidos. O uso de produtos alternativos ao controle químico, como os produtos biológicos, que envolvem os extratos de plantas e algas, óleos essenciais, microrganismos indutores de resistência ou de controle direto têm sido testados, buscando verificar seus efeitos no crescimento micelial, germinação de conídios e esporulação de fungos em meio de cultura (PIERRE, 2009; COSTA et al., 2011).

Os óleos essenciais são misturas complexas, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, e na maioria das vezes são constituídos por moléculas de natureza terpênica. Os óleos essenciais têm se mostrado uma alternativa viável e sustentável na agricultura, pois em virtude de suas origens naturais, facilidade de degradação na natureza e ação fungitóxica, podem contribuir para a manutenção do equilíbrio ecológico (DRAWANZ et al., 2020).

A atividade antifúngica do cravo da índia vem sendo relatada por alguns autores. Estudos realizados por Mangany et al. (2015) verificaram que ao testar distintos óleos essenciais para controle de *Fusarium oxysporum*, o óleo de cravo da índia inibiou 83% do crescimento fúngico na concentração de 250 µL L^{-1} e 100% a partir da concentração de 500 µL L^{-1}.

O caquizeiro (*Diospyros kaki*) é uma espécie frutífera de clima subtropical, cultivado em todo o mundo. Os frutos apresentam ótima aceitação no mercado interno, devido ao sabor, boa aparência e elevada qualidade nutricional, sendo uma boa alternativa ao pequeno produtor, por apresentar alta produtividade e rusticidade da planta, sendo acometido por poucos problemas fitossanitários. Entretanto, algumas

doenças se destacam, como a cercosporiose (*Pseudocercospora kaki*), a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) e galha da coroa (*Agrobacterium tumefaciens*) (AMORIM et al., 2016; ALVES, 2019; ANTICHERA, 2019).

A cercosporiose, também chamada de mancha angular é a principal doença do caquizeiro. Seus sintomas envolvem manchas delimitadas pelas nervuras, caracterizando um aspecto angulado às lesões. A preocupação com a incidência dessa doença está associada principalmente a queda precoce das folhas, maturação antecipada dos frutos e a redução da produção na safra seguinte. As recomendações de controle envolvem a aplicação de calda sulfocálcica, calda bordalesa, oxicloreto de cobre e mancozebe, não havendo recomendações de utilização de óleos essenciais (AMORIM et al., 2016; ANTICHERA, 2019).

Como são poucos os estudos envolvendo esse patossistema, associado à sua extrema relevância para os cultivos e buscando métodos de controle ambientalmente mais seguros, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de distintas doses de óleo essencial de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) no crescimento micelial do agente causal da cercosporiose do caquizeiro (*Pseudocercospora kaki)* em meio de cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO CAQUIZEIRO

O caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) é uma planta de clima subtropical, introduzida no Brasil no final do século 19, devido à sua excelente adaptação aos climas tropical e temperado. Trata-se de uma planta de porte arbóreo (Figura 1A), que pode atingir até 12 metros de altura, possuindo copa arredondada e ramificada. Seu desenvolvimento inicial é lento, podendo chegar a maturidade por volta dos 7 a 8 anos. Apresenta folhas de hábito caducifólio, com coloração verde-brilhante, suas flores são branco-amareladas, que surgem nas axilas das folhas durante a primavera e o verão (Figuras 1B e 1C) (PIO, SCARPARE FILHO e MOURÃO FILHO, 2003; LOPES et al. 2014).

Trata-se ainda de uma planta dioica, apresentando flores masculinas e femininas, havendo apenas em alguns casos, plantas que produzem somente flores femininas, que exigem variedades polinizadoras. A formação dos frutos, pode se dar

em alguns casos por partenocarpia, ou seja, sem sementes. Os frutos costumam ser esféricos e levemente achatados de coloração que vai do amarelo-claro, laranja, vermelho ao roxo-escuro. A polpa é de coloração vermelho-alaranjada, e as sementes apresentam coloração castanha e formato achatado (Figura 1D) (PIO, SCARPARE FILHO e MOURÃO FILHO, 2003; LOPES et al. 2014).

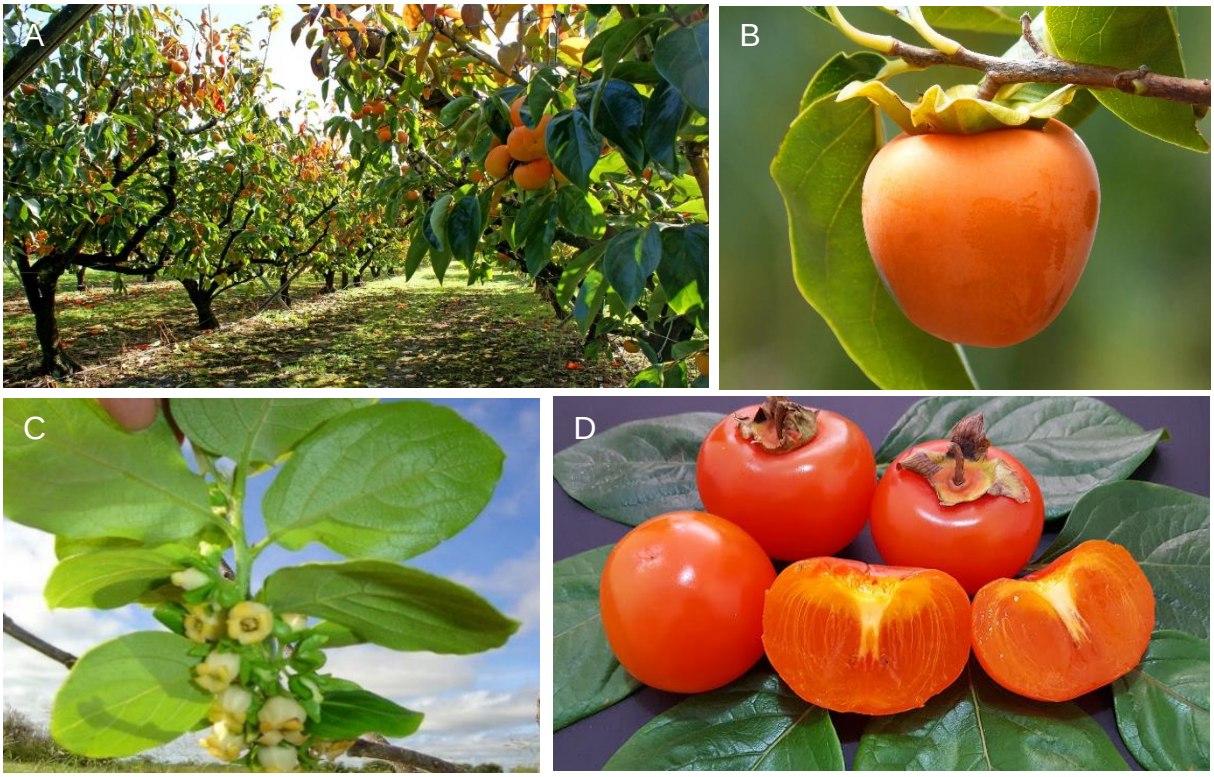

Figura 1. A. Plantas de caquizeiro em pomar. B. Coloração externa de frutos de caquizeiro. C. Coloração das flores de caquizeiro. D) Coloração da polpa de caqui. Fonte: (LOPES et al., 2014).

De acordo com Tecchio, Pereira e Motta (2019) os maiores produtores mundiais de caqui são China, Coréia do Sul, Espanha, Japão, Azerbaijão e Brasil. Sendo que os países asiáticos (China, Coreia e Japão) são responsáveis por 86% da produção mundial e 96% da área cultivada. O Brasil se encontra em 5ª colocação em relação à área destinada à produção da fruta, ficando atrás da China, Japão, Coreia do Sul e Azerbaijão. Já quanto à produtividade, o Brasil fica em 3ª colocação, atrás apenas de Israel e Uzbequistão (FAOTAST, 2024).

Ainda no cenário nacional, a produção brasileira é de 65,4 mil toneladas, e é concentrada nas regiões sudeste e sul. Os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo,

Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná se destacam. O Rio Grande do Sul, desponta com 31,8 mil toneladas, e o Paraná se concentra na 5ª colocação, com uma quantidade produzida de 2,9 mil toneladas (IBGE, 2017).

Quanto às principais cultivares plantadas no Brasil, há uma variabilidade de acordo com os estados. Em São Paulo predomina as cultivares Taubaté, Rama Forte e Fuyu, no Rio Grande do Sul, Fuyu e Kioto, e em Santa Catarina predominam as cultivares Fuyu e Rama Forte (FIOVARANÇO e PAIVA, 2007).

A crescente preocupação com a saúde humana tem promovido uma grande demanda pelo consumo de frutas. Desse modo, a busca por maiores produtividades para atender o mercado se mostra essencial. De modo geral, o caquizeiro é uma planta rústica, sem muitos problemas fitossanitários, entretanto, algumas doenças se destacam, como a cercosporiose (*Pseudocercospora kaki*), a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) e galha da coroa (*Agrobacterium tumefaciens*) (ELIAS et al., 2008; AMORIM et al., 2016).

2.2 A CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO

A cercosporiose do caquizeiro, também denominada como mancha angular do caquizeiro é uma doença foliar que tem como agente causal o fungo *Pseudocercosporsa kaki*. A doença encontra-se disseminada em diversos países produtores da fruta e em área com alta severidade da doença, pode haver a queda prematura de folhas e maturação precoce dos frutos. Ainda assim, devido à redução da área foliar, o acúmulo de carboidratos no sistema radicular é prejudicado, e por conseguinte a brotação, florescimento e produção do ano seguinte são afetados (KIMATI et al., 1997; BASSANEZI et al., 2001; ANTICHERA, 2019; BRAUN et al., 2020).

As lesões da doença podem aparecer em ambas as faces da folha e podem apresentar de 1 a 8 mm de tamanho, com coloração escura, pardo-avermelhada, com bordos pretos bem definidos. As lesões são delimitadas pelas nervuras, tornando um aspecto angular (Figuras 2A e 2B). Sendo assim, a doença reduz a taxa fotossintética da planta, devido a destruição da área foliar, e consequentemente pode levar também à antecipação da queda natural das folhas (KIMATI et al., 1997; ANTICHERA, 2019; BRAUN et al., 2020).

O fungo apresenta frutificação na superfície foliar, produz corpos de frutificação e apresenta estroma globular pardo escuro, com 40 a 76 µm de diâmetro, conidióforos oliváceos e estreitos no ápice, com 2 a 7 septos e dimensões de 2-3 x 44-88 µm (Figuras 2C, 2D, 2E, 2F e 2G) (KIMATI et al., 1997; ANTICHERA, 2019; BRAUN et al., 2020).

Para o controle da cercosporiose, recomenda-se a aplicação de calda sulfo-cálcica no inverno, enquanto no período vegetativo, logo após a frutificação são recomendadas de 3 a 4 pulverizações com calda bordalesa. Recomenda-se também a utilização de fungicidas registrados para a cultura e o uso de cultivares com algum grau de resistência ou resistentes (KIMATI et al., 1997).

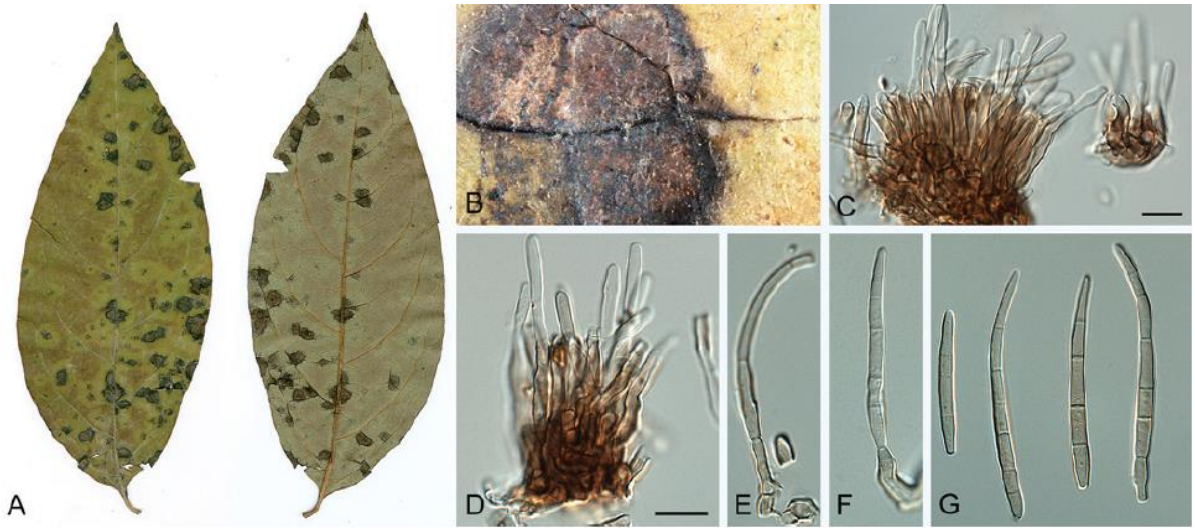

Figura 2. A. Manchas foliares na superfície superior e inferior de folha de caquizeiro. B. Close da mancha foliar com frutificação. C e D. Conidióforos. E, F e G. Conídios. Barras de escala: 10 µm. Fonte: (CROUS et al., 2013).

De acordo com Kimati et al. (1997) em um levantamento envolvendo o grau de resistência das variedades de caquizeiro à cercosporiose, com base no número de manchas por folha, aponta a variedade Fuyu como muito suscetível, as variedades Rama-Forte e Giombo como moderadamente sustetíveis e a variedade Taubaté como resistente.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

O metabolismo vegetal corresponde a um conjunto de reações químicas que ocorrem nesse organismo. Esse metabolismo pode ser dividido em primário e secundário. O metabolismo primário envolve a síntese de carboidratos, aminoácidos, proteínas e nucleotídeos, sendo esses compostos comuns aos seres vivos e diretamente relacionados à manutenção da vida. Já o metabolismo secundário, envolve a produção de substâncias, limitado a um menor número de espécies, que conferem vantagens à sobrevivência da vida do vegetal, permitindo melhor adaptação às condições impostas pelo ambiente (BETTIOL e MORANDI, 2009; PINTO et al., 2011).

Os metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos: compostos fenólicos, componentes contendo nitrogênio e terpenos. Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor e cor dos vegetais, proteção contra injúrias, ataque de animais e raios ultravioletas. Os componentes nitrogenados apresentam anel fenólico ligado ao nitrogênio e são produzidos pelo vegetal como mecanismo de defesa. Já os terpenos são a classe mais variada, podendo atrair insetos polinizadores, repelir patógenos, captar a luz nos fotossistemas, dissipam radicais livres gerados pela fotossíntese, conferem às plantas as cores amareladas, alaranjadas e avermelhadas (BETTIOL e MORANDI, 2009; VIZZOTTO, KROLOW e WEBER, 2010; BATISTA, 2019).

Os óleos essenciais são misturas complexas, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, e na maioria das vezes são constituídos por moléculas de natureza terpênica (DRAWANZ et al., 2020). Têm se apresentado como alternativa viável no manejo de microrganismos fitopatogênicos, pelo seu elevado potencial antimicrobiano, fungicida e/ou fungistático, bem como pela sua compatibilidade com outros métodos de manejo de doenças, de fácil aquisição, baixo custo e principalmente por ser ecologicamente correto (OLIVEIRA et al., 2023).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (PEREIRA et al. 2018). Dentre essas plantas têm-se o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (DIAS et al., 2021), erva de São João (*Ageratum conizoides*) (SCAPIN et al., 2010), laranja-lima (*Citrus aurantifolia*) (FIALHO e PAPA, 2015), tangerina (*Citrus reticulata*) (AZEVEDO et al., 2020), hortelã (*Mentha viridis*) (PEREIRA et al. 2018) e cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) (LIMA et al., 2022).

2.4 CRAVO DA ÍNDIA

A árvore produtora do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) é nativa da Indonésia. Pertencente à família das Myrtáceas, particularmente com representantes ricos em óleos essenciais. A planta apresenta ciclo perene, que cresce a uma altura que varia de 10 a 12 metros. As folhas do craveiro da índia são ovais e grandes, enquanto as flores são de cor vermelha e se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais (Figura 3A) (MAZZAFERA, 2003; OLIVEIRA, OLIVEIRA e SACRAMENTO, 2007).

O cravo da índia é a gema floral seca, ele é colhido na forma de botão floral maduro e comercializado na forma de botão floral seco (Figura 3B). Os botões adquirem primeiro uma cor pálida, e gradualmente se tornam verdes, então eles se tornam vermelho brilhante quando prontos para a colheita (ALMA et al. 2007; OLIVEIRA, OLIVEIRA e SACRAMENTO, 2007).

Figura 3. A. Botões florais de cravo da índia, variando de coloração verde à avermelhada. B. Botões florais secos de cravo da índia. Fonte: Biodiversity4All (2024).

O cravo é majoritariamente utilizado como condimento na culinária, em função do seu marcante aroma e sabor, conferido pelo eugenol, principal componente do óleo essencial do cravo da índia. Esse composto fenólico chega a representar 95% do óleo extraído. Além disso, exibe comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico, antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO NETO e LOPES, 2007).

Embora não existam relatos de óleo de cravo da índia inibindo o crescimento micelial de *Pseudocercosporsa kaki,* há diversos trabalhos em outros patossistemas. Em morangueiro, para controle de *Botrytis cinerea* foi possível verificar diminuição do diâmetro do crescimento micelial diário aos 48, 72 e 96 horas após a inoculação do fungo em meio de cultura contendo extrato de cravo da índia, demonstrando ação de inibição do crescimento micelial do fungo na concentração de 10% (DRAWANZ et al., 2020). Fialho et al. (2015) também relataram ações fungitóxicas e fungicidas do óleo de cravo da índia no fungo *Phakopsora euvitis*, agente casual da ferrugem da videira. Em goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) também foram verificadas inibições no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. sob doses superiores à 1000 µL mL^{-1} (ITAKO et al., 2021).

De acordo com Oliveira et al. (2023) a aplicação dos óleos essenciais tem se tornado cada vez mais difundida no controle de organismos fitopatogênicos. Os autores mencionam que esses agem estabelecendo um potencial de membrana através da parede celular, interrompendo a montagem de moléculas de energia como o ATP, e consequentemente causando danos nas estruturas celulares. Ainda tem a capacidade de desintegrar a membrana das mitocôndrias, interferindo na via do sistema de transporte de elétrons bloqueando a capacidade de germinação dos esporos, levando a morte celular (BECERRIL, NERÍN e SILVA, 2020).

3 METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no período de maio a junho de 2024. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), no desenvolvimento de *Pseudocercosporsa kaki*. Para isso foi avaliado o crescimento micelial deste fungo cultivado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), acrescido de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, obtido em comércio de produtos naturais, com garantia de 85% de eugenol.

O isolado fúngico foi obtido de folhas de caquizeiro com lesões de cercosporiose em pomar comercial do município de Ivaiporã, PR. Foi feito o isolamento indireto do fungo por meio de fragmentos de 0,5 cm^2 contendo tecido lesionado e sadio, o qual foi transferido para placas de Petri, contendo o meio BDA. A cultura foi incubada em câmara de crescimento, ajustada a temperatura de 22 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Após o crescimento do fungo, realizou-

se a repicagem do mesmo para a obtenção da cultura pura, também em meio de cultura BDA.

O ensaio consistiu de 7 tratamentos, sendo: T1) testemunha; T2) 0,001 µL mL^{-1}; T3) 0,001 µL mL^{-1}; T4) 0,1 µL mL^{-1}; T5) 1,0 µL mL^{-1}; T6) 5,0 µL mL^{-1}; T7) 10,0 µL mL^{-1}. O estudo foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de petri. Os tratamentos foram acrescidos ao meio de cultura BDA fundente (45-50 ºC) e vertidos em placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

No centro de cada placa foi adicionado um disco de colônia fúngica de 5 mm de diâmetro, que por sua vez foram incubadas em estufa tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas, sob temperatura de 22 ± 2 °C por 10 dias. Foram avaliados o diâmetro médio das colônias, a inibição do crescimento micelial e a taxa de crescimento micelial.

Após 48 horas da incubação, foi iniciada a mensuração diária do diâmetro médio das colônias (DMC), em dois sentidos perpendiculares, utilizando uma régua milimetrada, diariamente até o preenchimento total da placa pelo fungo que ocorreu após 10 dias de incubação. Em comparação com a testemunha, avaliou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) aos 6 e 10 dias após a incubação, que consistiu na seguinte equação (MENTEN et al., 1976):

$$PICM = (DMT - DMt/ DMT) * 100$$

Em que ‘PICM’ corresponde à porcentagem de inibição do crescimento micelial; ‘DMT’ ao diâmetro médio das colônias da testemunha e ‘DMt’ ao diâmetro médio da colônia do tratamento. A taxa de crescimento micelial (TCM), expresso em mm dia^{-1}, foi determinado utilizando a equação:

$$TCM = D/N$$

Em que ‘TCM’ é a taxa de crescimento micelial; ‘D’ o diâmetro médio atual da colônia; e ‘N’ o número de dias após a incubação.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a uma probabilidade de erro de 5% e foram realizadas análises de regressão e selecionadas as que melhor se ajustaram aos

dados de inibição de crescimento micelial aos 6 e 10 dias após a incubação, utilizando o software SISVAR v. 5.8 (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do óleo essencial de cravo da índia promoveu redução do diâmetro médio das colônias em todos os dias de avaliação e da taxa de crescimento micelial diário. O diâmetro médio das colônias foi superior com o tratamento 1 (testemunha), e com a utilização da dose de 0,001 µL mL^{-1} (T2) dos 4 aos 10 dias após a incubação. A partir dos 4 dias após a incubação o diâmetro médio das colônias manteve-se constante entre os tratamentos (Tabela 1).

O tratamento 3, que corresponde à dose de 0,01 µL mL^{-1}, promoveu médias distintas em relação aos demais tratamentos. Bem como com o tratamento 4 (0,1 µL mL^{-1}) que evidenciou médias distintas em relação às demais doses testadas (Tabela 1). Os tratamentos 5, 6 e 7 que correspondem respectivamente as doses de 1,0, 5,0 e 10,0 µL mL^{-1} inibiram totalmente o crescimento micelial do patógeno, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 1).

A inibição do crescimento micelial aos 6 e 10 dias após a incubação promoveram resultados similares. Médias inferiores foram obtidas com os tratamentos 1 e 2. Verificou-se também que doses iguais ou superiores à 1,0 µL mL^{-1}, que corresponde aos tratamentos 5, 6 e 7 promoveram médias iguais entre si em ambos os dias de avaliação. Os valores de inibição de crescimento micelial para esses tratamentos foi de 100% (Tabela 2).

A taxa de crescimento micelial diário do patógeno foi influenciada pelas doses de óleo essencial de cravo da índia. Médias superiores de crescimento foram verificadas com os tratamentos 1 e 2, que evidenciaram 7,83 e 7,44 mm por dia. O tratamento 3 (0,01 µL mL^{-1}) promoveu crescimento de 5,35 cm, e o tratamento 4 (0,1 µL mL^{-1}) 2,69 cm diários, ambos diferentes entre si e em relação aos demais tratamentos. Não foi verificado crescimento micelial diário para os tratamentos 5, 6 e 7, esses mostraram-se iguais entre si e distintos dos demais tratamentos. (Tabela 2).

As médias de Inibição do crescimento micelial de *Pseudocercosporsa kaki* aos 6 (A) e 10 (B) dias após a incubação sob doses de óleo essencial de cravo da índia foram submetidos a análise de regressão, sendo o melhor ajuste obtido com equações polimoniais, que apresentaram coeficientes de determinação que variaram de 0,61 e

0,55, aos 6 e 10 dias após a incubação, respectivamente (Figura 4). Os baixos coeficientes de determinação (0,55) são explicados pelo fato de que esse produto não permitiu o crescimento do fungo sob concentrações maiores, em estudos preliminares realizados. Sendo assim, utilizou-se concentrações menores a fim de se obter uma curva de regressão que melhor descrevesse o comportamento da variável em questão. Situação obtida somente sob concentrações em que o fungo apresentasse uma taxa de crescimento diferente de 0.

Em estudo realizado por Costa et al. (2011) por cromatografia gasosa acoplada com espectrofotmetria de massa foi possível identificar que o óleo de cravo da índia é composto majoritariamente em 83,6% de eugenol, 11,6% de acetato de eugenila e 4,2% de cariofileno. Resultados que demonstram que o óleo de cravo da índia apresenta em grande parte da sua composição um importante composto fenólico, o eugenol.

A presença do eugenol é o principal composto que confere a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo da índia. De acordo com Mangany et al. (2015) a ação se deve à natureza lipofílica do eugenol, permitindo sua difusão entre as cadeias de ácidos graxos das membranas celulares. Isso tem um efeito profundo na permeabilidade, na fluidez das membranas celulares e na modificação das estruturas celulares do fungo. Além disso, esse composto pode interromper a síntese de ATP, causando danos à parede celular, promover o extravasamento do citoplasma e a desorganização das hifas.

Tabela 1. Diâmetro médio da colônia de *Pseudocercosporsa kaki* aos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias após a incubação sob doses de óleo essencial de cravo da índia. Ivaiporã, PR. 2024.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (mm)							
	Dias após incubação							
	3	4	5	6	7	8	9	10
T1. Testemunha	20,7 a[1/]	30,7 a	41,1 a	50,9 a	59,6 a	65,3 a	71,9 a	78,3 a
T2. 0,001 µL mL^{-1}	17,1 b	27,1 a	40,0 a	50,5 a	57,8 a	64,3 a	69,6 a	74,4 a
T3. 0,01 µL mL^{-1}	5,10 c	15,1 b	20,4 b	25,6 b	29,9 b	37,4 b	44,7 b	53,5 b
T4. 0,1 µL mL^{-1}	0,40 d	8,9 c	13,1 c	16,6 c	19,2 c	21,1 c	23,9 c	26,9 c
T5. 1,0 µL mL^{-1}	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
T6. 5,0 µL mL^{-1}	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
T7. 10,0 µL mL^{-1}	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Média	6,18	11,68	16,37	20,5	23,7	26,8	30,0	33,3
CV (%)	25,63	24,71	18,58	15,01	17,79	17,28	18,77	22,46

[1/] Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). Fonte: Autores, 2024.

Tabela 2. Inibição de crescimento micelial de *Pseudocercosporsa kaki* aos 6 e 10 dias após a incubação sob doses de óleo essencial de cravo da índia. Ivaiporã, PR. 2024.

Tratamentos	Inibição de crescimento micelial (%)		Taxa de crescimento micelial (mm dia^{-1})
	Dias após incubação		
	6	10	
T1. Testemunha	0,00 d[1/]	0,00 d	7,83 a
T2. 0,001 µL mL^{-1}	4,44 d	0,51 d	7,44 a
T3. 0,01 µL mL^{-1}	49,70 c	28,92 c	5,35 b
T4. 0,1 µL mL^{-1}	67,38 b	63,84 b	2,69 c
T5. 1,0 µL mL^{-1}	100,0 a	100,0 a	0,00 d
T6. 5,0 µL mL^{-1}	100,0 a	100,0 a	0,00 d
T7. 10,0 µL mL^{-1}	100,0 a	100,0 a	0,00 d
Média	60,21	56,18	3,33
CV (%)	6,96	14,76	22,46

[1/] Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). Fonte: Autores, 2024.

Em estudo realizado por Costa et al. (2011) buscando verificar o efeito da utilização de óleo de cravo da índia sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, verificaram alterações morfológicas nas hifas dos fungos. Foram verificadas a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares, diminuição da nitidez da parede celular, intensa fragmentação das hifas e menor turgência das mesmas.

Costa et al. (2011) atribuem os resultados à interação dos compostos do óleo essencial com lipídeos das membranas celulares do fungo, conforme já mencionado, mas também à sua hidrofobicidade, à ligação dos componentes do óleo a íons e moléculas de outras células, e exposição do conteúdo celular, inclusive o núcleo. Ainda assim, deve-se ressaltar que além do eugenol, substâncias minoritárias compõem o óleo essencial de cravo da índia. Essas substâncias, como acetato de eugelina e o cariofileno podem também exercer efeito antifúngico, ou se relacionam de forma sinérgica para promover a atividade antimicrobiana (COSTA et al., 2011).

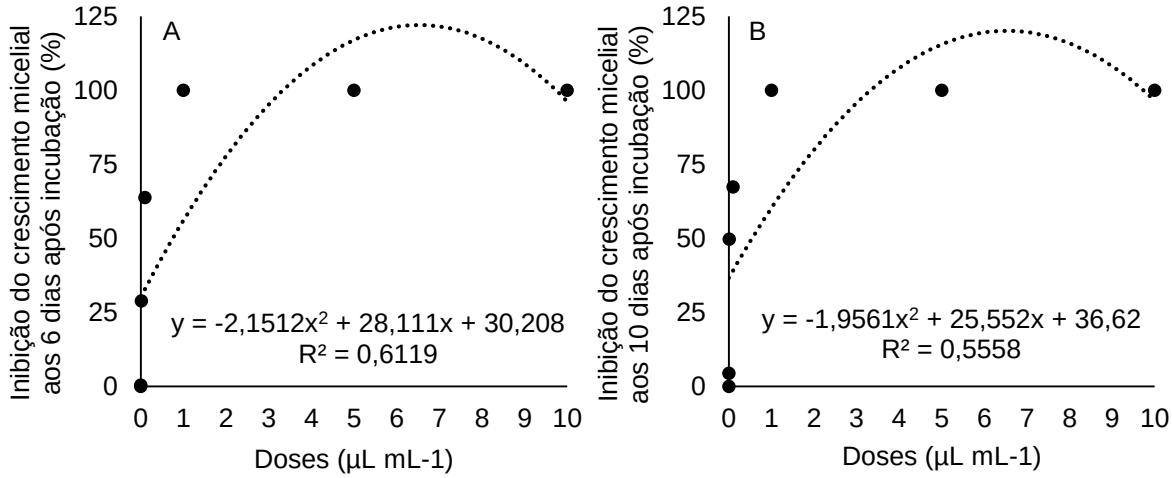

Figura 4. Modelos polimoniais da inibição do crescimento micelial de *Pseudocercosporsa kaki* aos 6 (A) e 10 (B) dias após a incubação sob doses de óleo essencial de cravo da índia. Ivaiporã, PR. 2024.

A ação antimicrobiana de óleos essenciais também pode estar associado à inibição da formação da parede celular dos fungos, ao comprometimento das mitocôndrias fúngicas, inibindo o transporte de elétrons mitocondriais, à inibição da divisão celular, por interferir na síntese de RNA ou DNA e/ou inibir a síntese de proteínas e à inibição de bombas de efluxo e a síntese de ergosterol, conforme relatado por Lagrouh, Dakka e Bakri (2017), Nazzaro, Coppola e Feo (2017) e Raveau, Fontaine e Sahraoui (2020).

O ergosterol é um composto lipídico que constitui a membrana plasmática de células fúngicas. Sua presença confere adequada estruturação, promove a permeabilidade seletiva de substâncias, modula a fluidez da membrana celular e promove a proteção das células. Sob a ausência dessa substância todas essas estruturas e processos são afetados de forma negativa, além disso pode promover a inibição de síntese e deposição de quitina nas paredes celulares e membranas das células fúngicas. A quitina é um dissacarídeo que atua como um invólucro protetor e como um material de suporte a defesa dos organismos em que ocorrem, portanto, sua ausência compromete a integridade celular dos fungos (LOUGERCIO-LEITE et al., 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Os resultados obtidos se assemelham a diversas outras pesquisas, contudo não foram encontrados trabalhos envolvendo o uso de óleo essencial de cravo da índia sob o desenvolvimento *in vitro* do agente causal da cercosporiose do caquizeiro

(*Pseudocercospora kaki*). Em estudo realizado foi Sharma et al. (2016) ao testarem o efeito de distintos óleos essenciais para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* observaram que o mais ativo foi o óleo essencial de cravo da índia, exibindo inibição completa do crescimento micelial e germinação de esporos a 125 µL mL^{-1}. Além disso, os autores também verificaram em microscopia eletrônica hifas enrugadas e esporos encolhidos e rompidos.

Os efeitos do uso de cravo da índia para a inibição do desenvolvimento de fitopatógenos *in vitro* são também relatados por Fontana et al. (2017) para o agente causal da podridão parda do pessegueiro (*Monilinia fructicola*). Foram verificadas reduções no índice de velocidade de crescimento micelial, crescimento micelial e aumentos no percentual de inibição do crescimento desse patógeno. Gomes (2008) também verificou inibição do desenvolvimento fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides* sob doses de óleo essencial de cravo da índia. Os autores testaram óleo de capim limão, tomilho e cravo da índia, e esse foi o que apresentou maior redução no crescimento micelial do fungo. E ainda, doses de 150, 300 e 600 ppm, proporcionaram maior inibição do crescimento micelial do que o fungicida utilizado.

Em estudo realizado por Rozwalka et al. (2008) avaliando o efeito fungitóxico de óleos essenciais de diversas plantas medicinais e aromáticas, também verificaram inibição total, aos 3, 5 e 8 dias, do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloesporioides*, agentes causais da antracnose em frutos de goibabeira. Em morangueiro, Lorenzetti et al. (2011) avaliando a bioatividade de óleos essenciais verificaram que sob o uso de óleo de cravo da índia, concentrações de 1000 µL mL^{-1} inibiram completamente a esporulação durante o período analisado e reduziu o crescimento micelial do fungo, resultados que são favoráveis ao controle de doenças, uma vez que o retardo ou a ausência de produção de estruturas reprodutivas diminuem ou inibem o avanço das doenças.

Pseudocercosporsa kaki é um patógeno que ocasiona grandes problemas em áreas produtoras de caqui, e mesmo assim poucos são os ativos registrados para a rotação de agroquímicos, havendo apenas nove produtos registrados no Paraná, os quais correspondem a 3 grupos químicos (triazois, estrobirulinas e isoftalonitrilas). Além disso, não há produtos biológicos registrados para a cultura, sendo assim, os óleos essenciais constituem uma alternativa para o manejo de doenças (ADAPAR, 2024).

Os óleos essenciais também têm se apresentado como alternativa viável no manejo de microrganismos fitopatogênicos. Esses podem ser relacionados com outros métodos de controle, possuem baixa toxicidade para mamíferos, baixo custo e potencial para controle de outros organismos, como insetos e ácaros (VIEIRA, ANDRADE E NASCIMENTO, 2012; OOTANI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2023).

Além disso, de acordo com Lorenzetti et al. (2011) a identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais, que exercem efeito no controle das doenças é uma ferramenta que pode auxiliar na indústria química, quanto a obtenção de novos produtos. Os autores também mencionam que tendo em vista as exigências mercadológicas do mercado consumidor por produtos de práticas agrícolas menos agressivas e sustentáveis, os óleos podem ser ferramentas que auxiliem nessas demandas, proporcionando a proteção de plantas.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos, o uso do óleo essencial de cravo da índia apresenta potencial de uso para controle da cercosporiose do caquizeiro. Contudo, novos estudos são necessários na busca por investigar os efeitos e comportamento do óleo *in vivo*, tendo em vista que as condições climáticas como umidade relativa do ar, exposição solar, temperatura e entre outras, podem reduzir a atividade antifúngica do produto.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) sob doses iguais ou superiores a 1,0 µL mL^{-1} são capazes de inibir totalmente o desenvolvimento *in vitro* do agente causal da cercosporiose do caquizeiro (*Pseudocercosporsa kaki*).

6 REFERÊNCIAS

ALMA, M. H. et al. Chemical composition and contente os essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). BioResources, v. 2, n. 2. 2007.

ALVES, R. F.; Etiologia da cercosporiose do caquizeiro. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo. 2019.

AMORIM, L. et al. Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Ceres Ltda. 2016.

ANTICHERA, T. S. S. Resistência de cultivares de caquizeriros à cercosporiose (*Psdeudocercospora kaki*) e o efeito da doença na fisiologia da planta. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. 2019.

AZEVEDO, P. T. M. et al. Effect of mistures of essential oils of citrus species on the control of *Colletotrichum gloesporioides*. Research, Society and Development, v. 9, n. 11. 2020.

BECERRIL, R.; NERÍN, C.; SILVA, F. Encapsulation systems for antimicrobial food packaging componentes: An update. Molecules, v. 25. n. 3. 2020.

BASSANEZI, R. B. et al. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. Plant Pathology, v. n. 4. 2001.

BATISTA, D. V. S. Bioatividade do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) e de revestimentos com fécula sobre a antracnose em mamão na pós-colheita. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2019.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 2009.

BRAUN, U. et al. Taxonomy and phylogeny of cercosporoid ascomycetes on *Diospyros* spp. with special emphasis on *Pseudocercospora* spp. Fungal systematics and evolution. v. 6, n. 1. 2020.

CARVALHO, R. R. C. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. Scientia Plena, v. 9, n. 7. 2011.

CAMPANA FILHO, S. P.; et al. Extração, estrutura e propriedades de α- e β-quitina. Química Nova, v. 30, n. 3. 2007.

COSTA, A. R.T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. Revista brasileira de plantas medicinais, v.13, n. 2. 2011.

DIAS, P. P. et al. Atividade fungitóxica *in vitro* do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) e controle de *Rhizoctonia solani* em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar maravilha quatro estações. Summa Phytopathologica, v. 47, n. 4. 2021.

DRAWANZ, B. B. et al. Óleos essenciais e hidrolatos de orégano e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* isolados de morangos. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 15, n. 4. 2020.

ELIAS, N. F.; et al. Avaliação nutricional e sensorial de caqui cv. Fuyu submetido à desidratação osmótica e secagem por convecção. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 2. 2008.

FAOTAST. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops and livesctock products. 2024. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL. Acesso em 15 de abril de 2024.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, v.35, n.6, 2011.

FIALHO, R. O. et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. Arquivos do Instituto Biológico, v. 82, n. 1. 2015.

FIALHO, R. O.; PAPA, M. F. S. Atividade antifúngica in vitro de óleos essenciais sobre *Sphaceloma ampelinum*. Cultura agronômica, v. 24, n. 1. 2015.

FIOVARANÇO, J. C.; PAIVA, M. C. Cultura do caquizeiro no Brasil e no Rio Grande do Sul: situação, potencialidade e entraves para o seu desenvolvimento.

FONTANA, D. C.; et al. Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pessegueiro. Revista Cultivando o Saber, v. 10, n. 2. 2017.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quimica nova, v. 30, n. 2. 2007.

GOMES, L. I. S. Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras. 2008.

ITAKO, A. T. et al. Effect of essential oils on the development of *Colletotrichum* sp. fungus in fragments of *Feijoa sellowiana* fruits. Acta Scientiarum, v. 43, n.1. 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2014: Caqui. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76269. Acesso em 18 de maio de 2024.

KIMATI, H. et al. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potential of essential plant oils to controle insects and microorganisms. Neotropical Biology and Conservartion, v. 5, n. 2. 2010.

LAGROUH, F. DAKKA, N. BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plant and the machanism of action of secondary metabolites from plants. Journal de Mucologie Medicale, v. 27, n. 1. 2017.

LIMA, T. S. et al. Essential oil of clove (*Syzygium aromaticum)* to control *Sclerotium rolfsii* in vitro. Revista Agro@mbiente, v. 16, n. 1. 2022.

LOUGERCIO-LEITE, C.; et al. A particularidade de ser um fungo - I. Constituintes celulares. Biotemas, v. 19, n. 2. 2006.

LOPES, P. R. C.; Cultivo do caquizeiro no Vale do São Francisco. Circular técnica n. 107. Embrapa. 2014.

LORENZETTI, E. R.; et al. Bioatividades de óleos essenciais no controle de *botrytis cinerea* isolado de morangueiro. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 13, n.1. 2011.

MANGANY, M. C. et al. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. South African Journal of Botany, v. 99, n. 1. 2015.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. Revista Brasil, v. 26, n. 2. 2003.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. Fitopatologia Brasileira, v. 1, n. 2. 1976.

NAZZARO, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. D. Essential oils and antifungal activity. Pharmaceuticals, v. 10, n. 86. 2017.

OLIVEIRA, V. S.; et al. Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Scytalidium* sp. da palma forrageira. Revista Brasileira de Meio Ambiente, v. 11, n. 2. 2023.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F.F.; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. Bahia Agrícola, v. 8, n. 1. 2007.

OOTANI, M. A.; et al. Use of essential oils in agriculture. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 4, n. 2. 2013.

PEREIRA, M. N. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. Ambiência Guarapuava, v. 14. n. 3. 2018.

PIERRE, R. O. Óleo essencial e extrato de cravo-da-índia no controle de *Colletotrichum gloesporioides*, agente da mancha manteigosa, em sementes e mudas de café. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras. 2009.

PINTO, M. S. T. et al. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. Revista Brasileira de Biociências, v. 9, n. 2. 2011.

PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. A cultura do caquizeiro. Piracicaba: Esalq. 2003.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A. L. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. Foods, v, 9, n. 3. 2020.

ROZWALKA, L. C.; et al. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plant in the inhibition of *Colletotrichum gloesporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. Ciência Rural, v. 38, n. 2. 2008.

SCAPIN, C. R. et al. Fungitoxicidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilium turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 12, n. 1. 2010.

TECCHIO, M. A.; PEREIRA, R. T.; MOTTA, V. C. Caqui. Panorama nacional da produção. Revista Campo e Negócios. Disponível em: https://revistacampoenegocios.com.br/caqui-panorama-nacional-da-producao/.

TICO, B. M. et al. Controle alternativo e biológico de patógenos em sementes de melancia. Scientia Plena, v. 18, n. 7. 2022.

VENTUROSO, 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, n. 1. 2011.

VIEIRA, G. H. C.; ANDRADE, W. P.; NASCIMENTO, D. M. Uso de óleos essenciais no controle do ácaro *Varroa destructor* em *Apis melífera*. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 42, n. 3. 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. 2010.