



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

USO DE EXTRATO DE CANELA, EXTRATO DE CRAVO E HIPOCLORITO DE SÓDIO NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* E *Alternaria alternata*

CAMILA RODRIGUES CARMELLO

Araras
2021

Rodrigues Carmello, Camila

Uso de extrato de canela, extrato de cravo e hipoclorito de sódio no controle de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* E *Alternaria alternata* / Camila Rodrigues Carmello -- 2021.
60f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Jean Carlos Cardoso

Banca Examinadora: Carlos Armênio Khatounian, Guilherme Henrique Martins Rodrigues Ribeiro

Bibliografia

1. Fungicidas botânicos. 2. Fitossanidade. 3. Agricultura orgânica. I. Rodrigues Carmello, Camila. II. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

USO DE EXTRATO DE CANELA, EXTRATO DE CRAVO E HIPOCLORITO DE SÓDIO NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* E *Alternaria alternata*

CAMILA RODRIGUES CARMELLO

**ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO
CO-ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). MARCIA MARIA ROSA MAGRI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Relatório de Defesa de Dissertação Candidata: Camila Rodrigues Carmello

Aos 28/07/2021, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Uso de extrato de canela, extrato de cravo e hipoclorito de sódio no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Alternaria alternata*, apresentada pela candidata Camila Rodrigues Carmello. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso
Prof. Dr. Carlos Armênio Khatounian
Prof. Dr. Guilherme Henrique Martins Rodrigues Ribeiro

Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	USP
Titular	UFSCar

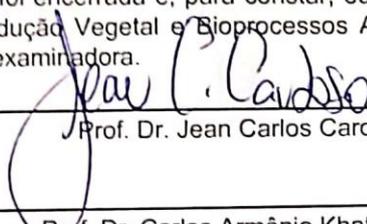
Conceito
Aprovado
Aprovado
Aprovado

Resultado Final
Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora*:

Todas as considerações de melhorias foram apresentadas a aluna durante a reunião de defesa da dissertação. A mesma deve entregar a nova versão com correções.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Mônica Cristina Risso de Brito, representante do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

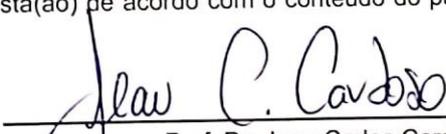

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso

Representante do PPG: Mônica Cristina Risso de Brito

Prof. Dr. Carlos Armênio Khatounian

Prof. Dr. Guilherme Henrique Martins Rodrigues Ribeiro

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Jean Carlos Cardoso, Carlos Armênio Khatounian, Guilherme Henrique Martins Rodrigues Ribeiro e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.


Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso

Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações

a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	05
REVISÃO DA LITERATURA	06
1 Tomate.....	06
2 Produção organica de tomates.....	07
3 Os impactos das pragas e doenças sobre a produção orgânica de tomates.....	07
4 <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	08
5 <i>Alternaria</i>	10
6 Impactos do uso de agrotóxicos e os fungicidas botânicos como alternativa de controle.....	11
7 Canela.....	12
8 Cravo.....	13
LITERATURA CITADA	14
CAPÍTULO 1. Extratos de canela e hipoclorito de sódio no controle in vitro de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> e <i>Alternaria alternata</i>	22
1 Resumo.....	22
2 Introdução.....	22
3 Materiais e Métodos.....	25
4 Resultados e Discussão.....	27
5 Conclusões.....	34
6 Literatura citada.....	34
CAPÍTULO 2. Uso de extrato de canela e extrato de cravo no controle de <i>Alternaria alternata in vitro</i> e na pós-colheita de tomate	38
1 Resumo.....	38
2 Introdução.....	38
3 Materiais e Métodos.....	41

3.1	Extrato de cravo e de canela no crescimento micelial <i>in vitro</i>	41
3.2	Influência do eugenol e cinamaldeído no crescimento micelial	42
3.3	Avaliação do tipo de efeito antifúngico dos extratos e princípios ativos do cravo e da canela.....	43
3.4	Efeitos dos extratos de canela e cravo sobre frutos de tomates inoculados com <i>Alternaria alternata</i> na pós-colheita...	44
4	Resultados e Discussão.....	45
4.1	Extrato de cravo e de canela no crescimento micelial <i>in vitro</i>	45
4.2	Influência do eugenol e cinamaldeído no crescimento micelial	48
4.3	Avaliação do tipo de efeito antifúngico dos extratos e princípios ativos do cravo e da canela.....	49
4.4	Efeitos dos extratos de canela e cravo sobre frutos de tomates inoculados com <i>Alternaria alternata</i> na pós-colheita.....	51
5	Conclusões.....	54
6	Literatura citada.....	54
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Alternaria Alternata</i> submetida a diferentes tratamentos com extrato aquoso de canela e extrato aquoso de cravo	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Capítulo 1

<p>Figura 1. Porcentagem de inibição crescimento micelial da raça 1 (FOL 27), 2 (FOL 1114) e 3 (FOL 1124) de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> e <i>Alternaria alternata</i> submetidas a tratamento com NaOCl e extrato aquoso de canela nas concentrações de 0 a 5%.....</p> <p>Figura 2. Inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial da raça 1 (FOL 27), 2 (FOL 1114) e 3 (FOL 1124) de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> submetidas a tratamentos com NaOCl e extrato aquoso de canela, na concentração de 5%...</p> <p>Figura 3 - Curva de crescimento micelial da raça 1 (FOL 27) do fungo <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>, sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p> <p>Figura 4- Curva de crescimento micelial da raça 2 (FOL 1114) do fungo <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>, sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p> <p>Figura 5 - Curva de crescimento micelial da raça 3 (FOL 1124) do fungo <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>, sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p> <p>Figura 6 - Curvas de crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Alternaria alternata</i>, sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p> <p>Figura 7 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p> <p>Figura 8- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Alternaria alternata</i> sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e de solução de hipoclorito de sódio.....</p>	<p>31</p> <p>31</p> <p>32</p> <p>32</p> <p>32</p> <p>33</p> <p>33</p> <p>34</p>
---	---

Capítulo 2

<p>Figura 1. Porcentagem de inibição crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> submetida a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.....</p>	<p>47</p>
---	-----------

Figura 2 - Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial de <i>Alternaria alternata</i> , submetidos a diferentes tratamentos. Controle; Canela 2,5%, Canela 5%, Cravo 2,5%, Cravo 5%, Canela 2,5% X Cravo 2,5%, Canela 5% x Cravo 5%....	48
Figura 3 - Porcentagem de inibição crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> submetida a tratamento com eugenol e cinamaldeido.....	49
Figura 4 - Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial de <i>Alternaria alternata</i> , submetidos a diferentes tratamentos. Controle; Canela 2,5%, Canela 5%, Cravo 2,5%, Cravo 5%, Canela 2,5% X Cravo 2,5%, Canela 5% x Cravo 5%....	50
Figura 5 - Porcentagem de inibição de germinação de <i>Alternaria alternata</i> submetida a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela. Médias seguidas pela mesma não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de probabilidade.....	51
Figura 6 - Porcentagem de incidência de <i>Alternaria alternata</i> em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.....	53
Figura 7 - Porcentagem de inibição crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.....	53
Figura 8 - Área abaixo da curva de progresso da doença de <i>Alternaria alternata</i> em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de probabilidade.....	54

USO DE EXTRATO DE CANELA, EXTRATO DE CRAVO E HIPOCLORITO DE SÓDIO NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* E *Alternaria alternata*

Autor: CAMILA RODRIGUES CARMELLO

Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). MARCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

Palavras-chave: *Cinnamomum* sp., *Syzigium* sp., Fungicidas botânicos, Fitossanidade, Agricultura orgânica, *Solanum lycopersicum*.

A cultura do tomate é muito sensível a problemas fitossanitários. Dentre as doenças fúngicas que afetam o cultivo, destacam-se a murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e a pinta preta, causada por *Alternaria alternata*. O emprego de defensivos agrícolas é uma das principais formas de manejo de pragas e doenças na cultura do tomate, fazendo com que as medidas de controle se baseiem em aplicações sistemáticas de fungicidas seguindo um calendário de aplicações semanais. Ao mesmo tempo em que a aplicação de fungicidas traz benefícios à produtividade das culturas hortícolas, o seu uso tem sido restringido pelos riscos ambientais e pela maior demanda de alimentos sem a presença de resíduos dessas substâncias. Nesse contexto, o uso de produtos naturais provenientes de plantas, utilizadas como alimentos, pode ser uma forma de controle alternativo. Com isso este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de inibição do crescimento *in vitro* de diferentes raças patogênicas de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (causador da murcha-de-fusarium) e de *Alternaria alternata* (causador da pinta-preta), pelo uso do extrato aquoso de canela, extrato aquoso de cravo e solução de hipoclorito de sódio. Também foi avaliada a ação desses compostos, aplicados em frutos de tomate (pós-colheita), na redução dos sintomas de pinta-preta. O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que no primeiro foram realizados testes *in vitro* para se observar o potencial do extrato aquoso de canela e da solução hipoclorito de sódio no controle de *A. alternata* e das três principais raças de *F. oxysporum f. sp. Lycopersici*. No segundo capítulo foram tratados os efeitos do extrato aquoso de canela e de cravo no controle de *A. alternata in vitro* e no pós-colheita de frutos de tomates. Foi possível observar a inibição completa do crescimento das três raças de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e também de *A. alternata* somente quando utilizado o hipoclorito de sódio a partir da concentração de 3%, e a inibição parcial com o uso do extrato de canela. Ambos, extrato de canela e solução de hipoclorito de sódio, em concentrações acima de 2%, reduziram os valores de IVCM. A inibição total do crescimento micelial de *A. alternata*, em condições *in vitro*, foi obtida com o uso do extrato de cravo a 5%. A combinação canela e cravo, tanto a 2,5 quanto a 5% também possibilitou a inibição completa do crescimento micelial. Além do efeito no crescimento micelial também foi possível verificar a inibição da germinação dos esporos e controle do fungo na pós-colheita de frutos de tomate.

USE OF CINNAMON EXTRACT, CLOVE EXTRACT AND SODIUM HYPOCHLORITE IN THE CONTROL OF *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and *Alternaria alternata*

Author: CAMILA RODRIGUES CARMELLO

Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

Co-adviser: Prof. Dr. MARCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

Key-words: (*Cinnamomum* sp., *Syzigium* sp., Botanical fungicides, Plant health, organic agriculture, *Solanum lycopersicum*)

The tomato crop is very sensitive to phytosanitary problems, among the fungal diseases that affect the crop, the Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and the black spot, caused by *Alternaria alternata*. The use of pesticides is one of the main ways to manage pests and diseases in tomato crops, making control measures based on systematic applications of fungicides following a calendar of weekly applications. While the application of fungicides brings benefits to the productivity of horticultural crops, their use has been restricted by environmental risks and the greater demand for food without the presence of residues of these substances. In this context, the use of natural products from plants and already used as food can be an alternative form of control. Thus, this work aims to evaluate the in vitro growth inhibition potential of different pathogenic races of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (causer of fusarium wilt) and *Alternaria alternata* (black spot), by the use of aqueous extract of cinnamon and aqueous extract of clove, in addition to the use of sodium hypochlorite solution, as well as its application to reduce symptoms of black pinta on tomato fruits in post-harvest. For this purpose, the work was divided into two chapters, where in vitro tests were performed in the first chapter to observe the potential of the aqueous extract of cinnamon and sodium hypochlorite in the control of *Alternaria alternata* and the three main races of *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. In the second chapter, the effects of the aqueous extract of cinnamon and the aqueous extract of clove on the control of *Alternaria alternata* in vitro and post-harvest of tomatoes were treated. Complete growth inhibition of the three races of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and *Alternaria Alternata* only when using sodium hypochlorite from a concentration of 3%, and a partial inhibition with the use of cinnamon extract. Both, cinnamon extract and sodium hypochlorite solution, at concentrations above 2%, reduced IVCN values. Total inhibition of *Alternaria* mycelial growth under in vitro conditions was obtained using 5% clove extract. The combination of cinnamon and clove, both at 2.5 and 5%, also enabled complete inhibition of mycelial growth. In addition to the effect on mycelial growth, it was also possible to verify the inhibition of spore germination and control of the fungus in the post-harvest of tomato fruits.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o oitavo maior produtor mundial de tomate, produzindo cerca de três milhões de toneladas/ano, sendo esta cultura considerada a segunda mais importante economicamente, dentre todas as hortaliças cultivadas no Brasil, apenas atrás da cultura da batata, chegando ao mercado de maneira *in natura* ou processado (GUEIROS, 2019). Por ser uma hortaliça de alto rendimento por área, é considerada uma ótima alternativa para produtores da agricultura familiar, pois, muitas vezes, agregam valor por serem destinados a segmentos especiais de mercado, como a de produtos orgânicos (PIETROBELLI, 2019; GERGELI, 2018). Porém a cultura do tomate é muito sensível a problemas fitossanitários, sendo relatadas cerca de duzentas doenças que afetam a produção no mundo todo, sendo os fungos responsáveis pela maioria das doenças infecciosas (LOPES, ÁVILA, 2005), sendo a fitossanidade um grande limitante a produção de tomateiros em sistemas orgânicos (MELO, 2017; SANTA ROSA *et al.* 2019).

Dentre as doenças fúngicas que afetam o cultivo de tomate, destaca-se a murcha-de-fusário e a pinta preta. A murcha de fusário é causada por diferentes raças do fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que devido a sua capacidade de produzir estruturas de resistência pode permanecer viável durante anos no solo e restos de culturas. Pode ser disseminado por meio de sementes e solo contaminados, sendo levados para outros locais principalmente por água e vento (ANDRADE *et al.*, 2009).

Atualmente, são descritas, três raças de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, definidas através de sua habilidade de infectar e causar doença em uma série de cultivares portadoras de diferentes loci de resistência da série I (= Immunity). Até o presente momento, três loci de resistência raça-específicos (I, I-2 e I-3) foram geneticamente caracterizados em espécies de tomate (PEREIRA, PINHEIRO, 2014). Em áreas infestadas por *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, os sintomas da doença podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais comuns nos estádios de florescimento e/ou de frutificação das plantas (KUROZAWA, PAVAN, 2005).

A pinta preta, causada por *Alternaria sp.* é considerada uma das mais importantes e frequentes doenças fúngicas da cultura do tomate no Brasil. Apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, podendo causar danos antes e após a colheita dos frutos (ITAKO, 2008). Além do potencial de causar perdas pela deterioração do produto, as espécies de *Alternaria* apresentam potencial de produção de micotoxinas que podem ser danosas à saúde humana, estando relacionadas a casos de câncer de esôfago (BAIA, 2019). Perdas de até 80% dos tomates já foram reportadas e relacionadas à ocorrência de *Alternaria sp.*, que normalmente é controlada por fungicidas. Porém, a presença de resíduos de fungicidas nos frutos e seus impactos no meio ambiente e na saúde do consumidor tem levado a procura de produtos alternativos para o controle de doenças (DERBALAH *et al.*, 2018).

O emprego de defensivos agrícolas é uma das principais formas de manejo de pragas e doenças na cultura do tomate, fazendo com que as medidas de controle de doenças fúngicas baseiem-se em aplicações sistemáticas de fungicidas seguindo um calendário de aplicações semanais fixo (KUHLCAMP, 2011). Ao mesmo tempo que a aplicação de fungicidas tem trazido benefícios a produtividade das culturas hortícolas, como é o caso do próprio tomateiro (COHEN *et al.* 2018), o seu uso tem sido restringido pelos riscos ambientais e a saúde (MAJEED *et al.*, 2017) e pela maior demanda de alimentos sem a presença de resíduos dessas substâncias (DIAS *et al.*, 2015), o que poderia representar um ganho para a produção de alimentos mais saudáveis. Além disso, em muitos sistemas produtivos, como aqueles de base orgânica, o uso dos agrotóxicos é proibido (BENDER, HEIJDEN, 2015), sendo no Brasil também proibida a sua aplicação, pela lei nº10.831, o que leva a necessidade de alternativas não sintéticas visando o controle desses patógenos. A ausência de

aplicações de fungicidas e pesticidas é o que causa o maior impacto na redução na produção de tomates em sistemas orgânicos, quando comparado ao sistema convencional de produção (RONGA *et al.* 2019).

Nesse contexto, o uso de produtos naturais, provenientes de plantas utilizadas como alimentos, pode ser uma alternativa que representaria ganhos consideráveis na promoção da produção de hortaliças mais saudáveis e sem resíduos de potencial tóxico (CARMELLO, CARDOSO, 2018). É fato que muitos compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas, e biossintetizados por estas, apresentam ação antifúngica, podendo ser utilizadas na forma de extratos vegetais e óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos (GLORIA, 2014).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, que são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários (VIZZOTTO *et al.*, 2010). Os metabólitos primários são responsáveis por processos envolvidos na manutenção da sobrevivência e do desenvolvimento das plantas, como é a produção de carboidratos pela fotossíntese. Os metabólitos secundários, por sua vez, são compostos químicos que auxiliam na sobrevivência imediata da célula, servindo como uma vantagem evolucionária de sobrevivência a fatores bióticos e abióticos que causam estresse, podendo atuar inclusive como defensivos naturais contra herbívoros ou microrganismos patogênicos (SANTOS *et al.*, 2013). Pesquisas realizadas com extrato bruto aquoso ou alcoólico e óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de conídios, quanto pela indução das chamadas fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, sintetizadas e acumuladas nas plantas após estresses físicos, químicos ou biológicos (STANGARLIN *et al.*, 2010; SCHWAN-ESTRADA, 2009). O uso de extratos de vegetais em proteção de plantas quando comparado aos produtos sintéticos apresenta como vantagens; a geração de novos compostos, baixa toxicidade, e um amplo modo de ação (SIMON *et al.*, 2016).

Entre as plantas que apresentaram grande potencial de aplicação como fungicida encontra-se a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), que tem como principal princípio ativo, o cinamaldeído, que é um composto antimicrobiano. Além disso, a canela apresenta ação e degradação rápida, maior seletividade biológica e baixa fitotoxicidade, o que a torna um produto de baixo impacto ambiental (GOMES

et al., 2016). Além disso não apresenta risco para a saúde humana, visto que é consumida como condimento.

Outra opção interessante e de baixo custo tem sido o hipoclorito de sódio, especialmente por ser permitido na agricultura orgânica. Por ser de baixo custo e de fácil acesso, o cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto químico mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água e dos alimentos (BOTH, 2009). Sendo assim, a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais e o uso do hipoclorito de sódio pode se apresentar como um método alternativo e promissor na proteção de plantas, pois são de fácil acesso e minimizam os problemas de toxicidade apresentados pelos produtos sintéticos, podendo ainda apresentar um efeito benéfico no desenvolvimento da planta (CARMELLO, CARDOSO, 2018; SCHWAN-ESTRADA, 2009; DINIZ *et al.*, 2008; MAIRESSE *et al.*, 2007)

OBJETIVOS

Identificar e caracterizar os efeitos de extratos aquosos de canela e cravo e de solução de hipoclorito de sódio sobre fungos fitopatogênicos de grande relevância na cultura do tomateiro, utilizando ensaios em condições *in vitro* (para *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e *Alternaria alternata*) e na pós-colheita de frutos (para *Alternaria alternata*).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Identificar os efeitos do extrato aquoso de canela e solução de hipoclorito de sódio no crescimento *in vitro* de micélios de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e *Alternaria alternata*.

Mensurar o potencial antifúngico do extrato aquoso de canela e extrato aquoso de cravo no crescimento de micélios e germinação de esporos *in vitro* de *Alternaria alternata* e se sua atividade é fungicida ou fungistática.

Identificar o efeito dos princípios ativos cinamaldeído e eugenol sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e se sua atividade é fungicida ou fungistática.

Identificar os efeitos do extrato aquoso de canela e de cravo no controle de *Alternaria alternata* na pós-colheita de frutos de tomate.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça muito popular na gastronomia brasileira, sendo muito apreciado no país pelo sabor e também pela concentração de substâncias benéficas, tal qual o licopeno (ANDRADE *et al*, 2009). É uma hortaliça originária da região Andina, que inclui partes do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru. Possui grande variabilidade de gêneros e ampla adaptabilidade em diferentes regiões (DOSSA; FUCHS; 2017).

O tomateiro é uma planta pertencente à ordem *Tubiflorae*, gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) da família Solanaceae. Embora seja uma planta perene, é cultivada anualmente com ciclo variando de 4 a 7 meses. A floração e a frutificação ocorrem paralelamente com a vegetação, pode apresentar hábito de crescimento, determinado ou indeterminado. No hábito de crescimento determinado há um crescimento vegetativo menos vigoroso e a planta lembra o aspecto de uma moita com a formação de um cacho de flores na extremidade das hastes. Nas plantas de hábito indeterminado ocorre a dominância da gema apical sobre as laterais (GONÇALVEZ, 2015). O fruto de tomate apresenta de 93% a 95% de água em sua constituição. A matéria seca, 5% a 7%, é constituída por compostos inorgânicos, ácidos inorgânicos, açúcares entre outros (TAVARES, 2017).

Por ser uma cultura que se desenvolve bem em diferentes sistemas de cultivo, apresentar alto rendimento se apresenta como uma ótima alternativa para produtores com pequenas propriedades e agricultura familiar, podendo agregar valor

quando destinados a segmentos especiais de mercado, como a de produtos orgânicos (PIETROBELLI, 2019; GERGELI, 2018). Por ser um fruto climatérico e possuir elevada atividade metabólica, o tomate é altamente perecível (ZAPATA *et al.*, 2008) As principais perdas na qualidade dos tomates na pós-colheita estão associadas aos danos físicos causados devido ao transporte e armazenamento inadequados, e ação de agentes microbianos.

2. Produção orgânica de tomates

O cultivo do tomate em sistema orgânico, o qual utiliza métodos ecológicos para o controle das pragas e doenças (ZORAN *et al.*, 2014), apresenta como vantagens, alta rentabilidade frente ao sistema convencional (SOUZA e GARCIA, 2013; MELO e SILVA, 2012), produção de frutos com melhor qualidade e proteção ao meio ambiente (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Hallmann (2012) concluiu em seus estudos que tomates de cultivo orgânico continham uma quantidade significativamente maior de açúcar, ácidos orgânicos, vitamina C e compostos fenólicos.

Segundo Organis (2017) o tomate é o segundo produto hortícola orgânico mais comercializado no mercado brasileiro, correspondendo a 21% dos produtos orgânicos comercializados, ficando atrás apenas da alface. A produção de tomates orgânicos é vista como desafiadora devido à alta suscetibilidade a pragas e doenças, o que torna o mercado inconstante durante o ano (NETO *et al.*, 2018). Entre os principais entraves à expansão da produção de tomate orgânico está a dificuldade em controlar de forma eficiente diversas pragas e doenças da cultura, a baixa disponibilidade de cultivares adaptada e a pouca oferta de sementes de qualidade (COSTA *et al.*, 2018).

3. Os impactos das pragas e doenças sobre a produção orgânica de tomates

A fitossanidade em tomate é um grande limitante a produção em sistemas orgânicos, devido a sua alta suscetibilidade a um grande número de doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (TALAMINI, NUNES 2018), sendo o maior desafio a ser vencido para maximizar a produtividade nos

sistemas orgânicos (MELO *et al*, 2009). Plantas de tomate em sistema orgânico são afetadas por doenças radiculares, se apresentando como mais frequentes o míldio (*Pythium* sp.), a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*) e a pinta preta (*Alternaria* sp.) (MELO *et al*, 2017).

As técnicas normalmente utilizadas na agricultura orgânica, objetivando o equilíbrio ecológico do sistema, são capazes de prevenir o aparecimento e a proliferação de grande parte de pragas e doenças, porém alguns organismos são persistentes e podem causar danos econômicos se não forem controlados, em especial a requeima ou mela (*Phytophthora infestans*), e a pinta preta (*Alternaria solani*) (SOUZA, 2010).

Dentre as alternativas que o produtor encontra, porém ainda pouco explorada para as condições tropicais do Brasil, há o emprego da resistência varietal, que consiste na seleção de cultivares mais resistentes a pragas e doenças de maior ocorrência na região ou época de cultivo. Esta pode ser uma estratégia interessante para o cultivo orgânico, evitando a ocorrência da praga ou doença associada ao cultivo, e ao mesmo tempo levando a produtividades maiores de frutos nesse sistema de cultivo (MELO *et al*. 2009; SANTA ROSA, CARDOSO, 2018).

No entanto, a resistência genética não está disponível para todas as doenças do tomateiro, sendo necessário o manejo adequado da cultura e técnicas de controle adicionais para obtenção de altas produtividades na cultura. Este é o maior limitante para a expansão do cultivo orgânico de tomateiros e fornecimento dos frutos de qualidade a preço competitivo no mercado de hortaliças de frutos.

Mesmo o tomate orgânico apresentando um grande potencial de mercado e uma alternativa econômica para os produtores familiares, ainda existe carência de informação científica em relação a sua conservação e qualidade no pós-colheita, principalmente em cultivares nacionais (OLIVEIRA, 2017; ROLIM *et al.*, 2011; FERREIRA, 2010).

4. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

A murcha de fusário do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma doença radicular, favorecida por temperatura alta e solos arenosos e/ou ácidos, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) e é um dos principais

problemas fitossanitários da produção de tomate no Brasil (GONZALEZ-CENDALES *et al.*, 2016, FILHO *et al.*, 2015; REIS, BOITEUX, 2007).

O *Fusarium oxysporum* é um fungo de importância mundial, com ampla gama de hospedeiros e distribuição em todas as regiões produtoras. É pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae e gênero *Fusarium* (BIJU, 2016). A espécie *Fusarium oxysporum* causa murchas em diferentes espécies hospedeiras, no entanto, dentro da espécie existe uma alta especialização em nível de espécies hospedeiras, distinguíveis como formaes especiales (abreviado f. sp.) (MARTINS, 2005). A espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é agrupada em três raças fisiológicas, conforme sua habilidade de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras contendo diferentes loci de resistência (SOUZA *et al.*, 2010). A morfologia da colônia em batata-dextrose-ágar (BDA) é muito variável e caracterizada pelo rápido crescimento. As colônias podem apresentar coloração variando de violeta à púrpura ou creme à laranja, com micélio aéreo e difuso. O fungo produz macro e microconídios e alguns isolados produzem clamidósporos abundantemente (OLIVEIRA, 2017).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta estruturas de resistência que asseguram sua sobrevivência em condições ambientais adversas, garantindo assim sua viabilidade durante anos em áreas de cultivo (CARRER-FILHO *et al.*, 2016), dissemina-se por meio de mudas infectadas, de implementos agrícolas, água de irrigação, e por sementes contaminadas (LOPES *et al.*, 2005; REIS, LOPES, 2012). Em mudas, os sintomas externos são caracterizados com a epinastia das folhas mais velhas, murchamento e por fim morte (MCGOVERN, 2015). No campo, a infecção pode ocorrer em qualquer fase, o patógeno penetra através de ferimentos nas raízes e causa amarelecimento, murcha e posterior morte da planta (KURAMAE, SOUZA, 2008). Os sintomas na parte aérea se manifestam primeiramente nas folhas mais velhas, progredindo para as folhas mais novas. Outros sintomas relacionados são aparecimento ocasional de raízes adventícias, murcha de folhas e caules jovens, desfolha e necrose marginal das folhas restantes, apodrecimento e queda dos frutos (AGRIOS, 2005). Quando o caule é cortado no sentido longitudinal, observa-se uma coloração marrom intensa logo abaixo da casca. O escurecimento dos vasos é característico desta doença e auxilia na sua identificação. O fungo penetra o tecido e atinge os vasos do xilema, onde se multiplica, interferindo no

processo de translocação de água desde as raízes até as folhas (GONÇALVEZ, 2015).

5. *Alternaria*

O tomate é susceptível a vários patógenos, destacando-se a mancha de alternaria, causada por *Alternaria sp.*, responsável por perdas econômicas consideráveis (WANG *et al.*, 2010). Este fungo está entre os patógenos mais comuns, e responsável pela deterioração pós-colheita de tomates no mundo todo (FAGUNDES *et al.*, 2014).

O gênero *Alternaria* é amplamente distribuído no mundo, e está entre os mais importantes fitopatógenos, tanto por causar doenças em diversas culturas, como pelo seu potencial de produção de micotoxinas. São conhecidas 71 micotoxinas e fitotoxinas produzidas por esse gênero, destacando-se o alternariol (AOH), o alternariol monometil-éter (AME), o altenueno (ALT) e a altertoxina I (ATX-I) (FREITAS-SILVA *et al.*, 2005). Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por alguns fungos e que possuem efeitos tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, tanto em animais quanto em humanos, via consumo de alimentos contaminados (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O fungo se adapta a baixas temperaturas, estando associado à perda de hortaliças e frutas armazenadas (POSE *et al.*, 2004). Pode sobreviver em restos de cultura, espécies suscetíveis ou no solo, na forma de micélio, esporos ou clamidósporos (TOFOLI, DOMINGUES, 2005). Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixa umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições. Ocorrendo calor e umidade suficientes, ocorre a germinação dos conídios e infecção das plantas, podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula ou através dos estômatos. Os sintomas da doença são evidentes de quatro a sete dias após o início da infecção (SANTOS, 2014).

O gênero *Alternaria* é composto por fungos micospóricos que possuem conídios com comprimento e largura variável, geralmente individuais, retos ou ligeiramente curvos, com corpo longo ou elipsoidal que se afina em direção ao ápice. Apresentam coloração palha, parda ou ouro claro, com septos transversais e poucos ou nenhum longitudinal (TOFOLI, DOMINGUES, 2004). Os conídios são inseridos em conidióforos septados retos ou sinuosos que ocorrem isolados ou em grupos. As

populações de *Alternaria spp.* são morfológicamente heterogêneas, diferindo quanto à coloração do micélio, produção de pigmentos em meio de cultura, presença ou ausência de esporulação em condições de laboratório, bem como quanto a patogenicidade e formação de setores em meio de cultura (PEIXOTO, 2015; TOFOLI, DOMINGUES, 2004). *Alternaria alternata* apresenta conídios em forma de clava ou pera invertidos, formados em longas cadeias catenuladas, com apêndices curtos, e comprimento inferior a um terço do corpo, possuindo até oito septos transversais e vários longitudinais ou oblíquos. As colônias são escuras de tamanho uniforme, com 56 a 63 mm de diâmetro. Seu micélio aéreo é cinza-esverdeado com a parte posterior preta. (SANTOS, 2014).

A pinta preta ou mancha de *Alternaria* é uma das doenças mais frequentes e importantes da cultura do tomate. É causada por fungos do gênero *Alternaria*, sendo a *Alternaria solani* e *Alternaria alternata* as espécies responsáveis por perdas econômicas consideráveis na pós-colheita de tomates (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os sintomas em folhas são caracterizados por manchas foliares necróticas, marrom-escuras a pretas, com a presença de anéis concêntricos, bordos definidos, podendo ou não apresentar um halo amarelado ao redor. As lesões em hastes, caules e pecíolos são pardo-castanhas, alongadas e concêntricas (TOFOLI, 2016). Os sintomas nos frutos ocorrem no ponto de inserção do pedúnculo, como manchas escuras que se originam na região de ligação entre o cálice e os frutos. As manchas são geralmente de coloração marrom a preta, firmes e com a presença típica de anéis concêntricos (PALARETTI, 2018).

6. Impactos do uso de agrotóxicos e os fungicidas botânicos como alternativa de controle

Apesar dos benefícios no controle de pragas e doenças, o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos tem como principais consequências à contaminação ambiental e dos próprios alimentos, a exposição ocupacional e intoxicações acidentais, além dos impactos ambientais como a perda de biodiversidade, impactos aos biomas e biotas que margeiam as áreas de cultivo, entre outras (BURRALI, 2020; CAMPOS *et al.* 2018; HOSSAIN *et al.* 2017; NASCIMENTO e MELNYK, 2016). Atualmente, os resíduos de fungicidas em concentrações potencialmente prejudiciais a saúde continuam sendo um problema no consumo de diferentes tipos

de alimentos, com destaque para as espécies usadas na horticultura como frutas e vegetais (LOPEZ-FERNANDEZ *et al.* 2012; LOZOWICKA *et al.* 2016; QIN *et al.* 2021).

A substituição desses produtos sintéticos por produtos naturais é uma alternativa necessária visando à melhoria no consumo de frutas e hortaliças, resultando em alimentos de alta qualidade nutricional e funcional, e aumento a segurança de seu consumo sem riscos à saúde causados por resíduos de fungicidas e outras moléculas sintéticas (CEGLIE *et al.* 2016; CAMPOS *et al.* 2018). A exploração da atividade biológica de compostos do metabolismo secundário de plantas, presentes no extrato bruto, óleo essencial ou princípios ativos isolados de plantas, provenientes de diferentes espécies vegetais, podem constituir-se num método eficiente de controle alternativo de pragas e doenças associadas à produção de alimentos (SCHAWN-ESTRADA 2009).

De uma maneira geral, o uso de extratos de plantas visando sua aplicação na proteção de cultivos, quando comparado aos produtos sintéticos, pode apresentar como principais vantagens a geração de novos compostos com amplo espectro de ação, e a menor toxicidade de alguns compostos, diminuindo os riscos associados a aquisição de resistência a ingredientes ativos e diminuindo os riscos de toxicidade aos seres humanos, seja pelo operador na aplicação, seja no consumo desses alimentos, bem como reduzida toxicidade ao meio ambiente (STALIN *et al.* 2008; SIMON *et al.* 2016).

7. Canela

A canela é uma planta da espécie *Cinnamomum sp*, pertencente à família Lauraceae. Apresenta aproximadamente 10-15 m de altura, tem folhas com formato oval e flores que florescem em pequenos maços, com cor esverdeada e odor característico (CASTRO, 2010). É originária do Sri Lanka e do Sudoeste da Índia, conhecida como “*kayu manis*”, que significa “madeira doce”. No Brasil é conhecida como canela-da-índia ou canela-do-ceilão (LORENZI, MATOS, 2000). Possui um alto valor econômico, sendo muito utilizada em diversas áreas como na indústria farmacêutica, de alimentos, de cosméticos e de bebidas. A partir das cascas, folhas, e flores são extraídos óleos essenciais, que possuem atividade antimicrobiana,

antioxidante, inseticida, fungicida, entre outras. (ANDRADE *et al.*, 2012; JOSHI, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020).

Seu estudo fitoquímico registra como principal componente do óleo essencial o cinamaldeído, seguido de ácido cinâmico, eugenol e linalol, além de taninos, diterpenos com atividade inseticida, proantocianinas e açúcares (LORENZI, MATOS, 2000). O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal) é um álcool terpeno cíclico, e o principal componente ativo do óleo essencial de canela (60-75%), que confere o aroma amadeirado a canela (PONCIANO *et al.*, 2020). Apresenta ação e degradação rápida, baixa a moderada toxicidade para mamíferos, maior seletividade biológica, e baixa fitotoxicidade, o que a torna um produto de baixo impacto ambiental (GOMES *et al.*, 2016).

8. Cravo

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) pertence à família das mirtáceas (Myrtaceae), é uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade, não só por seu sabor e qualidades culinárias, mas também por suas utilizações terapêuticas (AFFONSO *et al.* 2012). É uma árvore de ciclo perene, que cresce a uma altura que varia de 8 a 12 metros, possui folhas ovais grandes, flores de cor vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais e frutos em forma de drupa elipsoide com coloração avermelhada (LORENZI; MATOS, 2002)

É explorado principalmente para extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, frutos e outras partes. Seu fruto contém um óleo essencial de grande valor econômico no mercado, largamente usado nas indústrias químicas e farmacêuticas (ASCENSÃO; FILHO, 2013). O óleo é constituído, basicamente, por eugenol (70 a 80%), acetato de eugenol (15%) e beta-cariofileno (5 a 12%) (VANIN, 2014). O Eugenol é um líquido amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante, possui forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de micro-organismos patogênicos (COELHO *et al.*, 2017).

LITERATURA CITADA

AFFONSO, R.S., RENNO, M.N., SLANA, G.B.C.A., FRANÇA, T.C.C.. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Quimica**. v. 4. 2012.

AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). **Plant Pathology**. 2005.

ANDRADE, D. E. G. T. de; SOUZA, L. T.; ASSIS, T. C. Murcha-de-fusário: importante doença do tomateiro no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 6, 2009.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M. C.; BATISTA, L.R.; MALETTE, A.C.T.; MACHADO, S.M.S. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**. 2012.

ASCENÇÃO, V.L., FILHO, V.L.M.. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia). **Caderno de Pesquisa**. v.20. 2013.

BAIA, G. M. **Avaliação de diferentes sanitizantes em tomate**. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Alimento) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. 2019.

BENDER, S.F., HEIJDEN, M.G.A. Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses. **J. Appl. Ecol**. V.52. 2015

BIJU, V.C.; FOKKENS, L.; HOUTERMAN, P.M. Evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Environ. Microbiol**. v.86. 2016

BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M. ; AVANCINI, C. A. M.. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus*

aureus isolados em alimentos envolvidos em surtos de infecções alimentares . **Instituto Adolfo Lutz**, 2009.

BURRALI, R.J. **Efeitos à saúde por exposição ambiental e ocupacional aos pesticidas de uso agrícola**. Tese (Doutorado) -

Faculdade de Saúde Pública. 2020.

CAMPOS, E.V, PROENÇA, P.L, OLIVEIRA, J.L, BAKSHI, M., ABHILASH, P., FRACETO, L.F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. **Ecological Indicators**. 2018.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de Cinnamomum zeylanicum Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de Candida**. Tese Universidade Federal da Paraíba. 2010.

CARMELLO, C.R; CARDOSO, J.C.; Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. **Scientia horticulturae**. v.234. 2018.

CARRER FILHO, R.; DIAS, V. D.; DE OLIVEIRA, R. M.; DE CAMPOS DIANESE, É.; BOITEUX, L. S.; DA CUNHA, M. G. Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 51. 2016.

CEGLIE, F.G; AMODIO, M.L; COLELLI, G. Effect of Organic Production Systems on Quality and Postharvest Performance of Horticultural Produce. **Horticulturae**. 2016.

CHAUSSÊ, T. C. C. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9. 2011.

COSTA, A. M., COSTA, A. R., SILVA, W. M., SILVA, P. O.; COSTA, G. M., SILVA, F. F. Produção do tomate cereja em diferentes compostos orgânicos e sua aplicabilidade na agricultura familiar. **Global Science and Technology**. v.11. 2018

COHEN, Y., RUBIN, A.V., GALPERIN, M.. Oxathiapiprolin-based fungicides provide enhanced control of tomato late blight induced by mefenoxam-insensitive *Phytophthora infestans*. **PLoS ONE** 13. V.9. 2018

COELHO, C.C.S, FONSECA, M.J.O., SOARES, A.G., CAMPOS, R.S., SILVA, O.F.. Aplicação de revestimento filmogênico a base de amido de mandioca e de óleo de cravo-da-índia na conservação de goiaba Pedro Sato. **Revista Engenharia na Agricultura**. V.25. 2017.

DERBALAH, A. *et al.* Antifungal activity of fabricated mesoporous silica nanoparticles against early blight of tomato. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 5. 2018.

DIAS, V.V, SCHULTZ, G., SCHUSTER, M.S., TALAMINI, E, REVILLION, J.P.. The organic food market: a quantitative and qualitative overview of international publications. **Ambiente e Sociedade**. V. 18. 2015.

DINIZ, S. P. S. S. *et al.*. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v.10. 2008.

DOSSA, D.; FUCHS, F..Tomate: Análise técnico-econômica e os principais indicadores da produção nos mercados, mundial, brasileiro e paranaense. **Boletim Técnico 03**. CEASA. 2017.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, 2014.

FERREIRA, S.M.R., FREITAS, R.J.S., KARKLE, E.N.L., QUADROS, D.A., TULLIO, L.M.; LIMA, J.J.. Qualidade do tomate de mesa cultivado nos sistemas convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30. 2010.

FILHO, R.C. *et al.* Fontes de resistência múltipla à murcha de fusário em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 50. 2015.

FREITAS-SILVA, O.; OLIVEIRA, E.M.M.; FARIAS, A.X.; SOUZA, M.L.M.; **Alternaria spp**: Detecção e Avaliação do Potencial Toxigênico em Tomate Pós-Colheita. EMBRAPA. 2005.

GERGELI, J. P.. **Uso do óleos essenciais em substrato para controle de tombamento em plantas de tomateiro**. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL, 2018.

GUEIROS, M. A. F. *et al.* Qualidade físico-química do tomate submetido a diferentes tipos de armazenamento. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 9, 2019.

GLORIA, E.M *et al.* Evaluation of antifungal activity of essential oil from leaves of *Pimenta pseudo caryophyllus* against the fungus *Aspergillus flavus*. In: **International symposium on essential oils**. 45. 2014.

GOMES, E. M. C.; PENA, R. C. M.; ALMEIDA, S. S.M. S.. Composição fitoquímica e ação fungicida de extratos brutos de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Quambalaria eucalypti*. **Biota Amazônia**. v. 6. 2016.

GONÇALVES, A.M.. **Diversidade de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro**. Dissertação (Pós Graduação em Fitopatologia). Universidade de Brasília. 2015.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A.M.; BAKER, B.; JONES, D. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**. 2016.

HALLMANN, E.. The influence of organic and conventional cultivation systems on the nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92. 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on Humans and animals. **Toxicology, New York**. v. 167, 2001.

ITAKO, A. T *et al.* Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33. 2008.

JOSHI, R. K. Chemical disparity in the oil from leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34. 2019

KURAMAE, E.E; SOUZA, N.L. Variabilidade genética entre formaes speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici* através de RAPD e seqüências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**. 2008.

KUROZAWA C.; PAVAN; M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI H.; AMORIM L.; REZENDE J.A.M; FILHO A.B; CAMARGO L.E.A.. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, 2005.

KUHLKAMP, K. T.; MORAES, W. B.; JESUS JUNIOR, W. C. Qualidade pós-colheita de tomate com utilização de fungicidas e silicato de potássio empregados no controle da requeima. **Enciclopédia Biosfera**. v. 7. 2011.

LEAL, M.A.A. Produção de tomate orgânico. Sistema PESAGRO Rio. 2006.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.. **Doenças do Tomateiro**. Embrapa, 2005.

LOPEZ-FERNANDEZ, O., RIAL-OTERO, R., GONZALEZ-BARREIRO, C., SIMAL-GANDARA, J.. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry, Volume**. 2012

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORINI, A.. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa L.*). **Revista da FZVA**. v.14. 2007.

MAJEED, A., MUHAMMAD, Z., ULLAH, R., AHMAD, H.. Late Blight of Potato (*Phytophthora infestans*) I: Fungicides Application and Associated Challenges. **Turkish JAF Sci.Tech**. v.5. 2017.

MARTINS, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium spp.* E estudo da interação com planta hospedeira**. Tese (Doutorado Genética e melhoramento de plantas) Universidade de São Paulo, 2005.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**. v. 73. 2015.

MELO, P.C.T.; TAMISO, L.G.; AMBROSANO, E.J.; SCHAMMAAS, E.A.; INOMOTO, M.M.; SASAKI, M.E.M.; ROSSI, F.. Desempenho de cultivares de tomateiro em sistema orgânico sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**. V.27 2009.

MELO, Y.A., SILVA, E.C.A. **A viabilidade do cultivo de tomate orgânico em estufa: um estudo de caso**. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP. 2012

MELO, A. P. C., FERNANDES, P.M., SILVA-NETO, C.M., SELEGUINI, A.. Solanáceas em sistema orgânico no Brasil: tomate, batata e physalis. **Scientia Agropecuaria**, v. 8, 2017.

NASCIMENTO, A.R., SOARES JÚNIOR, M.S., CALIARI, M., FERNANDES, P.M., RODRIGUES, J.P.M., CARVALHO, W.T.. Qualidade de tomates de mesa cultivados em sistema orgânico e convencional no Estado de Goiás. **Horticultura brasileira**. v.31. 2013.

NASCIMENTO, L., MELNYK, A.. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**. 2016

NETO, J. S. *et al.* Qualidade de frutos de tomateiro cultivado em sistema de produção orgânico e tratados com subprodutos de capim limão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, 2016.

NETO, M. *et al.* Costs, viability and risks of organic tomato production in a protected environment. **Revista Ciência Agronômica**. v.49. 2018.

OLIVEIRA, S. D.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. **Patologia pós-colheita**: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

OLIVEIRA, C.M. **Murcha-de-Fusário do Tomateiro, Causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, em Nova Friburgo, RJ: Raças, Resistência Genética e Manejo**. Dissertação (Pós-Graduação em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2017.

ORGANIS – CONSELHO BRASILEIRO DA PRODUÇÃO ORGÂNICA E SUSTENTÁVEL. Produção e Consumo de Produtos Orgânicos no Mundo e no Brasil. **Consumo de produtos orgânicos no Brasil**. Curitiba: Organisa, 2017.

PALARETTI, V.V. **Pressões hiperbáricas no controle de mofo cinzento e de mancha de alternaria na pós colheita de tomate débora**. Tese (Produção Vegetal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2018.

PEIXOTO, C.C. **Caracterização molecular, morfológica e biológica do agente etiológico da pinta preta em solanáceas no Brasil**. Tese (Pós-Graduação em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2015.

PEREIRA, R.B; PINHEIRO, J.B. Murcha-de-fusario em tomateiro. **EMBRAPA- Comunicado técnico 105**. 2014

PIETROBELLI, S.R. **Eficiência de preparados vegetais no controle de doenças fúngicas e na indução de mecanismos de defesa em tomateiro**. Dissertação (Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável) Universidade Federal da Fronteira Sul. 2019.

PONCIANO, R. C. S.; MARTINS, G. R.; IULIANELLI, G. C. V; TAVARES, M. I. B. Estudo do extrato da canela por NMR em solução. **Brazilian Journal of development**. 2020.

POSE, G.; LUDEMANN, V.; SEGURA, J.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by blackmold in Argentina. **Mycotoxin Research, New York**, v. 20, 2004.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30. 2005.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro state, Brazil. **Horticultura Brasileira**. v. 25. 2007

ROLIM, P.R.R., TOFOLLI, J.G., DOMINGUES, R.J.. Preparados homeopáticos em pós colheita de tomate. **CESAHO**. 2011

ROSA, A. J. S., SALA, F. C., CARDOSO, J. C..Performance and selection of tomato cultivars for organic cultivation in greenhouse. **Revista Ceres**. v. 66. 2019

RONGA, D. Carbon footprint and energetic analysis of tomato production in the organic vs the conventional cropping systems in Southern Italy. **Journal of Cleaner Production**. v.220. 2019

SANTOS, G.G.. **Qualidade físico-química, microbiológica e ocorrência de micotoxinas de *Alternaria Alternata* em derivados de tomate**. Dissertação (Pós-Graduação em Nutrição Humana). Universidade de Brasília. 2014.

SIMON, J.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; JARDINETTI, L.S.C.O.; SILVA, J.B.; SCARABELI, I.G.R.. Atividade fungitóxica de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Diplocarpon rosae*. **Summa Phytopathologica**. v.42. 2016.

SCHAWN-ESTRADA, K.R.F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**. V.27. 2009

STALIN, S.I., KIRUBA, S., DAS, S.S.M. A Comparative Study on the Toxicity of a Synthetic Pyrethroid, Deltamethrin and a Neem Based Pesticide, Azadirachtin to *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 2008.

STANGARLIN, J.R; KUHN, O.J; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. v. 2. 2011.

SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. **Horticultura Brasileira**. v. 2. 2010.

SOUZA, J.L., GARCIA, R.D.C. Custos e rentabilidades na produção de hortaliças orgânicas e convencionais no Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária**. v. 3. 2013.

TALAMINI, V., NUNES, M.U.C.. Estratégias de controle das principais doenças do tomateiro orgânico na região central de Sergipe. **EMBRAPA-Comunicado técnico** 219. 2018

TAVARES, N.S. **Caracterização molecular e bioquímica da adaptação de uma variedade comercial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ao sistema de produção da agricultura natural**. Dissertação (PósGraduação em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo. 2017.

TOFOLI, J.G.; Domingues, R.J. **Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado**. *Biológico*, v.66, 2004.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R.J.. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. **Instituto Biológico**. 2005.

TOFOLI, J. G.; DE MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Controle da queima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 83, 2016.

VANIN, A. B. 2014. Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*). Tese de Doutorado (Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões 2014.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos Secundários encontrados em plantas e sua importância**. EMBRAPA- Documento 316. 2010.

WANG, Y.; YU, T.; XIA, J.; YU, D.; WANG, J.; ZHENG, X.D. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. **Biological Control**, v. 53, 2010.

ZAPATA J. Z; GUILLÉN F.; ROMERO D. M; CASTILHO S; VALERO D; SERRANO M. Use of alginate or zein as edible to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2008.

ZORAN, I.S., NIKOLAOS, K. LJUBOMIR, S. Tomato Fruit Quality from Organic and Conventional Production. **Organic Agriculture Towards Sustainability**. V.9. 2014.

CAPÍTULO 1. Extrato de canela e hipoclorito de sódio no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e *Alternaria alternata*

1. Resumo

Os fungicidas botânicos são uma alternativa interessante no controle de patógenos e proteção de plantas em sistemas sustentáveis de produção, podendo resultar na redução de perdas e na produção de alimentos mais saudáveis. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de extrato aquoso de canela e seu potencial para uso na inibição de patógenos da cultura do tomateiro, a hortaliça de fruto mais consumida mundialmente. Três principais raças de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e uma linhagem de *Alternaria alternata* foram cultivadas em condições *in vitro* e, posteriormente, usadas para os testes de efeito fungicida do extrato de canela. Para os testes de inibição de crescimento micelial dos fungos, incorporou-se o extrato aquoso de canela e uma solução de hipoclorito de sódio ao meio de cultura Batata-Dextrose-Agar, nas concentrações de até 5% (m/V). Foi avaliado o crescimento micelial diariamente durante 15 dias, por meio de medições do diâmetro das colônias (cm), obtendo assim a curva de crescimento micelial, porcentagem de inibição de crescimento, taxa de crescimento e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Como resultados, foram observados a inibição completa do crescimento das três raças de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e também de *Alternaria Alternata* somente quando utilizado o hipoclorito de sódio a partir da concentração de 3%, e uma inibição parcial com o uso do extrato de canela. Ambos, extrato de canela e solução de hipoclorito de sódio, em concentrações acima de 2%, reduziram os valores de IVCM. O extrato de canela demonstrou o potencial antifúngico, sendo possível seu uso no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos da cultura do tomateiro.

2. Introdução

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) está presente em diversos países e toma proporções cada vez maiores tanto em produção, quanto em

importância econômica e social, sendo a segunda hortaliça mais consumida no mundo ficando atrás apenas da batata (SILVA *et al.*, 2020, FILGUEIRAS *et al.*, 2017; ALVARENGA, COELHO, 2013). Em 2019, a cultura do tomateiro no Brasil ocupou a área de aproximadamente 58 mil ha, com produção total de aproximadamente 4 mil toneladas (IBGE/LSPA, 2020). A produtividade média mundial atualmente está em torno de 4,8 t ha⁻¹, sendo o maior produtor a China com uma área cultivada de mais de um milhão de hectares e uma produção anual de mais de 56 milhões de toneladas, seguido pela Índia com 24 milhões de toneladas, sendo que o Brasil ocupa o nono lugar nesse cenário (FAOSTAT, 2020).

A produção de tomate é considerada atividade de alto risco, devido à alta suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças e a exigência em insumos e serviços, que acarreta elevados investimentos financeiros por unidade de área (LOOS *et al.*, 2008). Com relação às doenças, um grande número é causado por fungos, algumas podendo causar perdas totais de produção, se não forem adotadas medidas integradas de controle (SAND, 2016).

Entre as doenças mais preocupantes, destacam-se a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, uma doença fúngica que é favorecida por altas temperaturas (LOPES, 2005). Ocasionalmente amarelecimento geral da planta, iniciando-se pelas folhas inferiores e progredindo para o terço superior, segue-se uma murcha generalizada, resultando em folhas secas. É uma das doenças mais importantes do tomateiro sendo disseminada na maioria dos países onde o tomate é cultivado (FILGUEIRA, 2013). As medidas de controles que vem sendo empregadas para essa doença são o emprego de variedades e híbridos resistentes e o uso de fungicidas sintéticos (CARVALHO, 2020). Outra doença de grande importância para a cultura do tomateiro é a pinta-preta, que apresenta alto potencial destrutivo, sendo que a sua incidência ocorre sobre as folhas, pecíolos, hastes e frutos. O agente etiológico, no Brasil, são fungos do gênero *Alternaria* (PEREIRA *et al.*, 2013). Similar ao que ocorre com *Fusarium*, as medidas de controle são feitas basicamente com fungicidas sintéticos para as variedades tradicionalmente cultivadas, que são em sua maioria suscetíveis ao patógeno (BALBI- PEÑA *et al.*, 2006).

Apesar do uso convencional do controle químico, o controle de doenças deve ser entendido como uma prática permanente de medidas integradas visando não somente o controle, mas também medidas de prevenção da doença especialmente

em intensidades que possam resultar em prejuízos (LOPES, 2005). Dessa forma, a exploração da atividade biológica de compostos secundários, presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais, pode constituir-se, como uma forma potencial de controle alternativo (SCHWAN-ESTRADA, 2009; CARMELLO & CARDOSO, 2018). As plantas apresentam um metabolismo capaz de produzir inúmeras substâncias químicas (SANTOS, 2015) de defesa vegetal, o que gera a possibilidade de descobertas de novas substâncias com potencial antifúngico (CELOTO *et al.*, 2008), produtos esses também chamados de fungicidas botânicos.

Muitos extratos vegetais tem demonstrado a capacidade de controle de fitopatógenos, seja pela sua ação fungicida direta, como também pela inibição do crescimento micelial e germinação dos esporos em condições *in vitro* (FERREIRA, 2014; BRUM *et al.*, 2014; VENTUROSOSO, 2011).

Dentre os muitos fungicidas botânicos, a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) se destaca. Pertencente à família Lauraceae é uma espécie com grande potencial de uso como fungicida botânico, demonstrando sua aplicabilidade para uma alta diversidade de fungos fitopatogênicos. Trata-se de uma planta aromática que apresenta como principais constituintes o cinamaldeído e o eugenol, compostos que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (CASEMIRO *et al.*, 2019; CARMELLO, CARDOSO, 2018; GOMES *et al.*, 2018; VENTUROSOSO *et al.*, 2011).

A utilização de fungicidas botânicos, como é o caso do extrato de casca de canela, poderia resultar em uma ferramenta de controle de patógenos, especialmente considerando os sistemas sustentáveis de produção, como na agricultura orgânica (SANTRA, BANERJEE, 2020). Ainda, considerando o cultivo orgânico do tomateiro, um dos maiores limitantes do cultivo e que resultam na redução significativa da produtividade de frutos tem sido a ocorrência de pragas e doenças, especialmente devido à impossibilidade de uso de pesticidas (BENDER, HEIJDEN, 2015; CARMELLO, CARDOSO, 2018). Esse fator especialmente coloca a cultura do tomateiro orgânico em grande desvantagem em relação ao sistema convencional, limitando a produção, rentabilidade econômica e sustentabilidade do sistema, sendo necessária maior área de cultivo para produção da mesma quantidade de frutos (RONGA *et al.* 2019).

Dessa forma, a necessidade de prospecção, do estabelecimento de métodos de aplicação e de concentrações efetivas de extratos vegetais utilizados como

fungicidas botânicos, é condição básica para que a sua aplicação possa ser tornar de fato uma solução na proteção de plantas.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o de identificar os efeitos de extratos aquosos de canela sobre o crescimento micelial *in vitro* de dois fungos fitopatogênicos de grande importância na cultura do tomateiro, *Fusarium* e *Alternaria*.

3. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, localizado no município de Araras SP.

Foram utilizadas colônias purificadas de *Alternaria alternata* obtidas a partir do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM-CCA/UFSCar), e das raças 1 (FOL 27), 2 (FOL 1114) e 3 (FOL 1124) de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* obtidas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal de Goiás.

O preparo do extrato aquoso de canela foi realizado utilizando-se 50 g da casca da canela da china (Kitano®, Cambara-PR) para 200 mL (25% m/V) de água destilada e deixado por 5 min após o ponto de ebulição da água do banho maria, portanto da água externa ao Erlenmeyer® de 250 mL utilizado para acondicionar o extrato aquoso. Na sequência, os extratos foram filtrados utilizando-se filtro de celulose para manutenção somente da fase líquida para uso no experimento. Para fins de comparação e considerando produtos efetivos e permitidos de uso na agricultura orgânica, foi também utilizado o hipoclorito de sódio, utilizando-se a concentração de 25% (V/V) preparada a partir de água sanitária contendo de 2,0-2,5% de cloro ativo (Candura®, Piracicaba-SP). (CARMELLO, CARDOSO, 2018)

Para os testes de inibição de crescimento micelial do fungo, em câmara de fluxo laminar o extrato aquoso de canela e o hipoclorito de sódio foram incorporados e homogeneizados ao meio de cultura BDA previamente autoclavado, sendo esses adicionados logo após esse processo, no momento da solidificação, de modo a se obter as concentrações finais de 1, 2, 3, 4 e 5% no meio de cultura, sendo esses posteriormente vertidos em placa de petri. Os extratos não foram esterilizados antes de sua adição.

Para o controle foram utilizadas placas somente com o meio de cultura BDA previamente autoclavado a 121°C por 25 minutos. Após a solidificação do meio, fragmentos de BDA contendo micélios purificados de *A. alternata* (AA) e das 3 raças do *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) coletados das margens das colônias foram transferidos para o centro da placa. As placas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento, com temperatura de 25±3°C.

Para os testes com o FOL foi utilizado o fatorial 3 (raças) x 2 (canela e hipoclorito de sódio) x 6 (concentrações) e para a *Alternaria* foi utilizado o fatorial 2 (canela e hipoclorito de sódio) x 6 (concentrações). O delineamento experimental utilizado nos dois experimentos foram o inteiramente casualizados, com três repetições (placas de petri) cada, em duplicata (experimentos repetidos por duas vezes).

Foi avaliado o crescimento micelial diariamente durante 15 dias, por meio de medições do diâmetro das colônias (cm), obtendo assim a curva de crescimento micelial. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos fitopatógenos foi obtida por meio da fórmula utilizada por Venturoso (2009), onde: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha. A taxa de crescimento dos fitopatógenos foi obtida através de equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) os dias de incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial e (b) a taxa de crescimento micelial, obtida pelo coeficiente de regressão (VENTUROSOSO, 2009).

O cálculo do IVCM foi realizado conforme fórmula descrita por Oliveira (1991) onde: $IVCM = \sum (D - D_a) / N$. Sendo:

- IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial
- D= diâmetro médio atual da colônia
- D_a= diâmetro médio da colônia do dia anterior
- N= número de dias após a inoculação.

Os dados foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA), e quando com distribuição normal, as comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do Software estatístico Agroestat (BARBOSA, MALDONADO, 2015). A correlação entre a inibição do crescimento micelial e concentração dos tratamentos foi realizada através de gráfico de dispersão

4. Resultados e Discussão

Tanto o extrato aquoso de canela como o hipoclorito de sódio, demonstraram efeitos sobre o crescimento micelial das três raças do *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (*FOL*) demonstrando correlação positiva significativa entre a porcentagem de inibição de crescimento micelial em condições *in vitro*, com o aumento das concentrações desses produtos no meio de cultura BDA (Figuras 1, 2). O hipoclorito de sódio demonstrou 100% de inibição das raças 1 e 2 quando utilizado a partir da concentração de 3% e da raça 3 somente quando utilizada a maior concentração, de 5%, constituindo-se o produto com maior potencial de controle das diferentes raças desse patógeno (Figuras 1, 2).

Também foi observado o efeito de fungicida botânico do extrato de canela, contra o *FOL*. No entanto, a inibição total de crescimento com esse fungicida botânico somente foi observada para a Raça 2 do patógeno e somente quando utilizado a maior concentração, de 5% (Figuras 1, 2). A inibição parcial do crescimento micelial das três raças de *FOL* ocorreu a partir da concentração de 2%, sendo a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial *in vitro* de 30,4% para a Raça 1 e de 36,1% para a raça 3 desse fungo patogênico a cultura do tomateiro.

Através de análise do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – Figura 7) e da curva de crescimento (Figuras 3, 4, 5), observou-se um menor IVCM e menor taxa de crescimento diária quando utilizado o extrato de canela a partir da concentração de 3%, e solução de hipoclorito de sódio a partir da concentração de 2%.

Este potencial de inibição de crescimento pode ser explicado pela presença de compostos secundários biologicamente ativos com a capacidade de exercer ação antifúngica sobre o patógeno, sendo que na canela os compostos de maior representatividade e com atividade antifúngica conhecida, são o cinamaldeído e o eugenol (CARMELLO, CARDOSO, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2018; BITU, 2014; BARROS, 2013).

A toxicidade da canela sobre patógenos tem sido estudada por diversos pesquisadores. Faria *et al.* (2010) em seu trabalho sobre a atividade antifúngica de canela sobre *Fusarium oxysporum*, observou que apesar do extrato da casca de canela não impedir o crescimento do *F. oxysporum*, esse reduziu em 75% a

esporulação deste patógeno quando utilizada na concentração de 80%. De forma diferente, VENTUROSU *et al.* (2011) relatou redução do crescimento micelial de *F. solani*, quando utilizou o extrato de canela na concentração de 20%.

Essa concentração utilizada por esses autores é muito acima que aquela utilizada em nosso trabalho, no qual pode-se verificar o controle do crescimento micelial *in vitro* de *FOL*, nas concentrações a partir de 3%. No entanto, mesmo com atividade antifúngica conhecida, de acordo com os resultados obtidos, o potencial antifúngico do extrato parece ser seletivo de acordo com a espécie ou raça do patógeno.

Kowalska *et al.* (2020) também observou o efeito inibitório do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de tomateiro, utilizando solução aquosa obtida de pó orgânico de casca de canela e utilizada nas concentrações de 0,5% (54,4% de inibição) e 1% (81,4% de inibição). Apesar de a inibição ter sido parcial, esses autores identificaram que a aplicação da solução de canela promoveu efeitos em plantas *in vivo*, demonstrando efeito estimulante positivo sobre as plantas de tomate e reduzindo os efeitos da doença sobre as plantas de tomateiro (KOWALSKA *et al.* 2020).

Diferente do que ocorreu com o *Fusarium*, não houve efeito do extrato aquoso de canela sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Alternaria alternata* (AA) até a concentração de 5%. No entanto, foi observada redução no IVCM do fungo com o aumento das concentrações de extrato de canela no meio de cultura de cultivo dos micélios (Figuras 1, 6, 8).

A atividade antifúngica da canela tem sido frequentemente relacionada ao cinamaldeído, que apresenta poderosa atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos (FIGUEIREDO, 2017). Lucas (2012), observou 100% de inibição de crescimento micelial de *Alternaria solani* quando utilizado o óleo essencial de canela na concentração de 0,1%. Gonzales *et al.* (2016), relataram 100% de inibição de crescimento de *Alternaria solani* quando utilizado o extrato de canela na concentração de 30%. Apesar de não ter se observado a inibição total do crescimento da *A. alternata* no presente trabalho, ocorreu uma diminuição progressiva na velocidade de crescimento micelial com o aumento da concentração do extrato de canela (Figura 8).

Essas diferenças observadas entre o resultado atual e aquele obtido por outros autores com o gênero *Alternaria* podem estar relacionados às diferenças no

tipo de extrato utilizado, no caso óleo essencial (Lucas, 2012) e a concentração dos extratos (GONZALES *et al.*, 2016) comparado ao utilizado no atual experimento na forma de extrato aquoso, e concentrações de 1-5%. Carmello e Cardoso (2018) observaram que os efeitos antifúngicos atribuídos à canela foram efetivos na concentração de 5% inibindo o crescimento micelial *in vitro* de *Cercospora longíssima* isolado da cultura da alface. O controle, porém, somente foi observado quando utilizados segmentos de cascas da planta, sendo que o pó de casca de canela não resultou em efeito fungicida sobre o mesmo fungo nas mesmas concentrações e métodos de preparo do extrato.

De forma diferente, o hipoclorito de sódio, a partir da concentração de 4%, foi efetivo e resultou na inibição completa do crescimento micelial (Figura 6) e do IVCM (Figura 8) de *A. alternata*, de forma similar ao que ocorreu com todas as raças de *FOL*.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem boa eficiência como desinfetante na contaminação fúngica, proporcionando redução nas taxas de contaminação (PICOLO *et al.*, 2007), reage com a água produzindo ácido hipocloroso (HOCl) e mantendo em solução o íon hipoclorito (OCI-), que são as formas ativas que atuam sobre os microrganismos (RESENDE, 2009).

Tavares e Souza (2005) relataram que o hipoclorito de sódio inibiu 100 % a germinação conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração de 100 ppm (0,01%). Olivera *et al.* (2016), utilizando solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, relataram 100% de inibição do crescimento de *Colletotrichum musae in vitro*, apresentando também uma inibição de 54% de crescimento do patógeno quando testado *in vivo*, utilizando a mesma concentração. Araujo *et al.* (2004) também demonstraram que o uso de hipoclorito de sódio, a 5 e 10%, em sementes de amendoim, resultaram na menor ocorrência de fungos produtores de micotoxinas do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* spp.

O hipoclorito de sódio tem sido uma das fontes de cloro mais utilizadas para assepsia, devido ao seu amplo espectro de atividade biocida contra microrganismos, além do fato de ser um produto de baixo custo (RIBEIRO *et al.*, 2008). Isso foi comprovado no atual experimento, visto que foi possível a inibição completa do crescimento micelial das três principais raças de *FOL* e de *AA* em cultivo de tomatesiros.

É importante destacar que o hipoclorito de sódio tem sido autorizado para uso na água de irrigação e soluções de sanitização de alimentos orgânicos em diferentes países do mundo, com regras de resíduos máximos similares ao encontrado na água potável tratada (EU, 2016; USDA, 2021). Ao mesmo tempo, os testes realizados com uso de hipoclorito de sódio em sementes de alface visando o tratamento das sementes, previamente ao plantio, não demonstraram efeitos fitotóxicos para a germinação ou desenvolvimento inicial das plântulas na concentração de até 5% (V/V) (CARMELLO, CARDOSO, 2018), demonstrando a segurança e efetividade de seu uso como alternativa no controle de fitopatógenos associados a diferentes culturas agrícolas.

Carmello e Cardoso (2018) observaram a inibição completa do crescimento micelial *in vitro* do fungo *Cercospora longíssima*, isolado de plantas de alface (*Lactuca sativa*), com o uso de extrato aquoso de canela ou hipoclorito de sódio, demonstrando que o controle de alguns microrganismos fitopatogênicos com extratos botânicos, a exemplo da canela, pode ser tão eficiente quanto soluções sanitizantes já utilizadas comercialmente, como é o caso do hipoclorito de sódio. No entanto, os resultados apresentados no atual trabalho demonstram certa seletividade no uso do extrato de canela aplicado ao controle de fitopatógenos, havendo raças e espécies com tolerância ao mecanismo de ação, ainda pouco esclarecido, e associado aos princípios ativos do extrato aquoso de canela (*Cinnamomum sp.*).

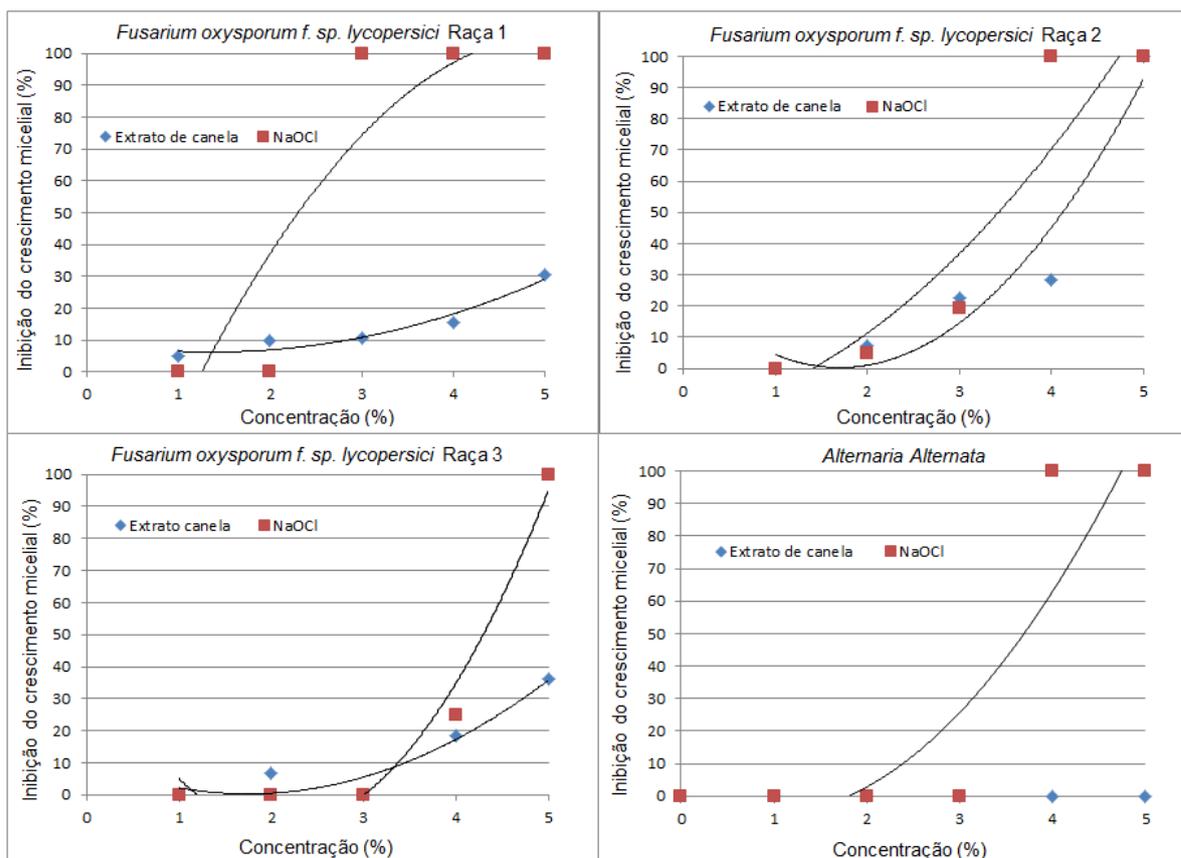


Fig. 1 – Porcentagem de inibição crescimento micelial ($y = ax + b$) da raça 1 (FOL 27) de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* submetida a tratamento com NaOCl $R^2 = 0,949$ e extrato de canela $R^2 = 0,8095$, nas concentrações de 0 a 5%, raça 2 (FOL 1114) de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* submetida a tratamento com NaOCl $R^2 = 0,8643$ e extrato de canela $R^2 = 0,928$ nas concentrações de 0 a 5%, raça 3 (FOL 1124) de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* submetida a tratamento com NaOCl $R^2 = 0,9662$ e extrato de canela $R^2 = 0,9202$ nas concentrações de 0 a 5%, e *Alternaria alternata* submetida a tratamento com NaOCl $R^2 = 0,8286$ e extrato aquoso de canela $R^2 = \#N/A$ nas concentrações de 0 a 5%.

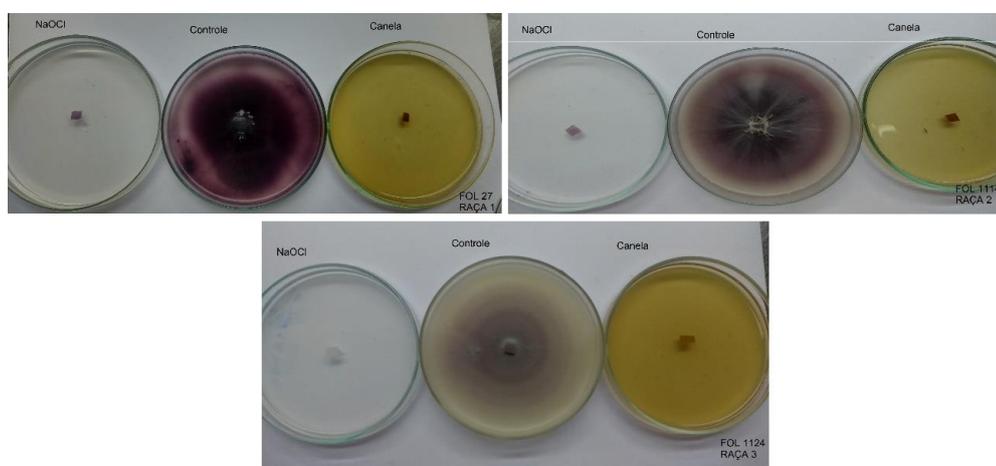


Figura 2 - Inibição *in vitro* do crescimento micelial da raça 1 (FOL 27), 2 (FOL 1114) e 3 (FOL 1124) de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* submetidas a tratamentos com NaOCl e extrato aquoso de canela, na concentração de 5%.

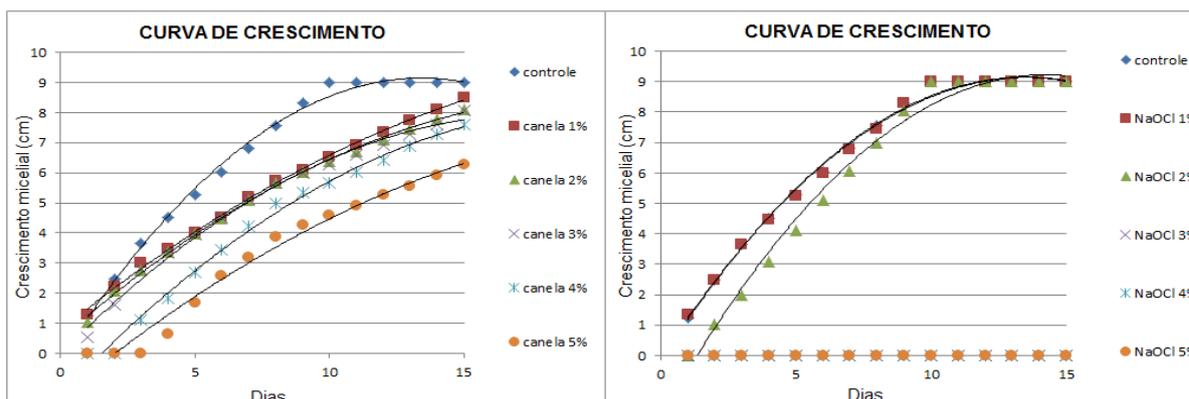


Figura 3 - Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial da raça 1 (FOL 27) do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,995$; Canela 1% $R^2 = 0,9983$; Canela 2% $R^2 = 0,9980$; Canela 3% $R^2 = 0,9934$; Canela 4% $R^2 = 0,9950$; Canela 5% $R^2 = 0,9779$; NaOCl 1% $R^2 = 0,9940$; NaOCl 2% $R^2 = 0,9884$; NaOCl 3% $R^2 = \#N/A$; NaOCl 4% $R^2 = \#N/A$; NaOCl 5% $R^2 = \#N/A$.

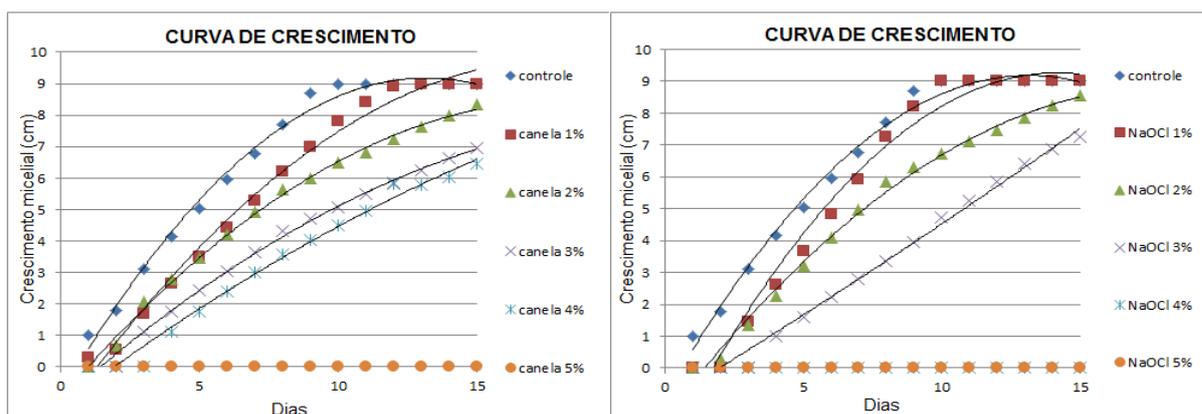


Figura 4- Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial da raça 2 (FOL 1114) do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,9923$; Canela 1% $R^2 = 0,9898$; Canela 2% $R^2 = 0,9977$; Canela 3% $R^2 = 0,9957$; Canela 4% $R^2 = 0,9853$; Canela 5% $R^2 = \#N/A$; NaOCl 1% $R^2 = 0,9793$; NaOCl 2% $R^2 = 0,9954$; NaOCl 3% $R^2 = 0,9917$; NaOCl 4% $R^2 = \#N/A$; NaOCl 5% $R^2 = \#N/A$.

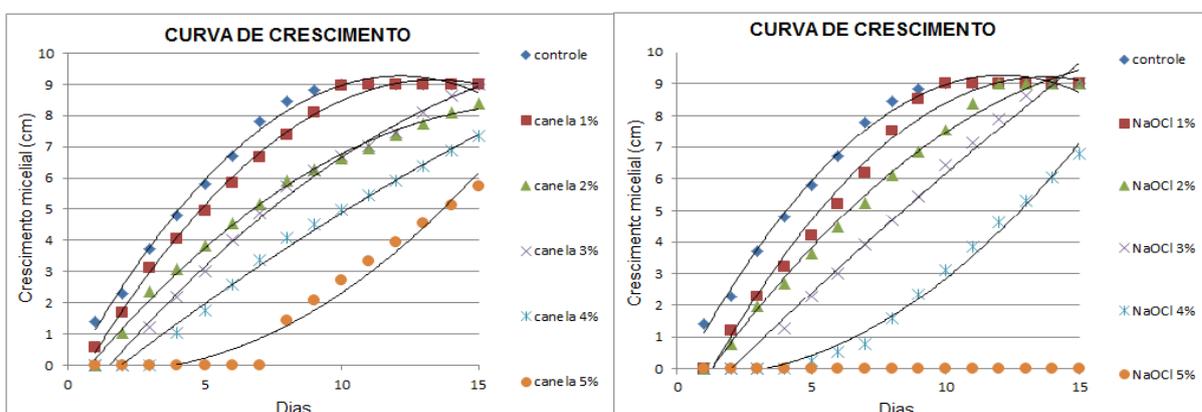


Figura 5 - Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial da raça 3 (FOL 1124) do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,99238$; Canela 1% $R^2 = 0,9962$; Canela 2% $R^2 = 0,9968$; Canela 3% $R^2 =$

0,9933; Canela 4% $R^2 = 0,9870$; Canela 5% $R^2 = 0,9715$; NaOCl 1% $R^2 = 0,9870$; NaOCl 2% $R^2 = 0,9929$; NaOCl 3% $R^2 = 0,9859$; NaOCl 4% $R^2 = 0,9912$; NaOCl 5% $R^2 = \#N/A$.

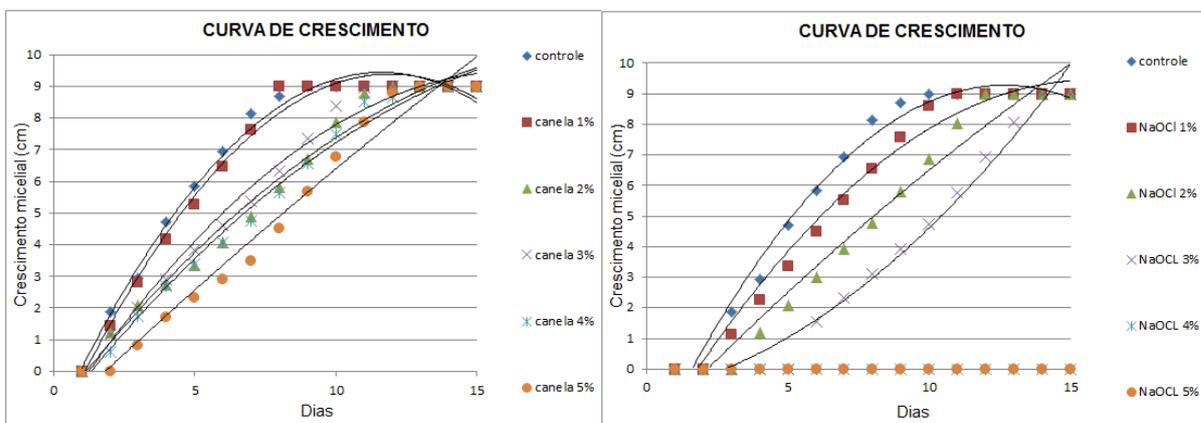


Figura 6 - Curvas de crescimento micelial ($y = ax + b$) *in vitro* de *A. alternata*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,9908$; Canela 1% $R^2 = 0,9891$; Canela 2% $R^2 = 0,9815$; Canela 3% $R^2 = 0,9871$; Canela 4% $R^2 = 0,9889$; Canela 5% $R^2 = 0,9754$; NaOCl 1% $R^2 = 0,9790$; NaOCl 2% $R^2 = 0,9700$; NaOCl 3% $R^2 = 0,9807$; NaOCl 4% $R^2 = \#N/A$; NaOCl 5% $R^2 = \#N/A$.

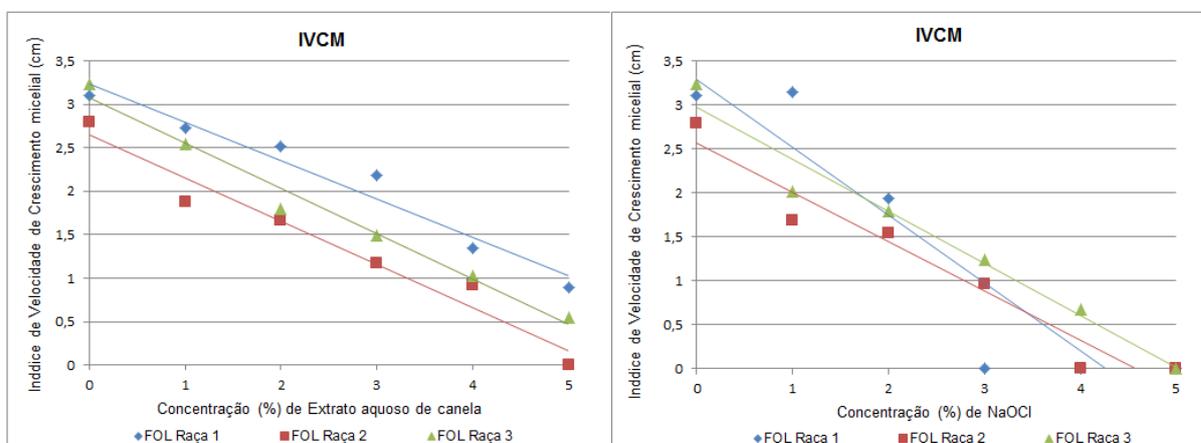


Figura 7 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) ($y = ax + b$) de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 1 $R^2 = 0,9578$, *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 2 $R^2 = 0,9812$, *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 3 $R^2 = 0,9571$ sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela e *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 1 $R^2 = 0,8531$, *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 2 $R^2 = 0,9433$, *F. oxysporum f. sp. lycopersici* Raça 3 $R^2 = 0,9675$ sob diferentes concentrações (1 a 5%) de solução de hipoclorito de sódio.

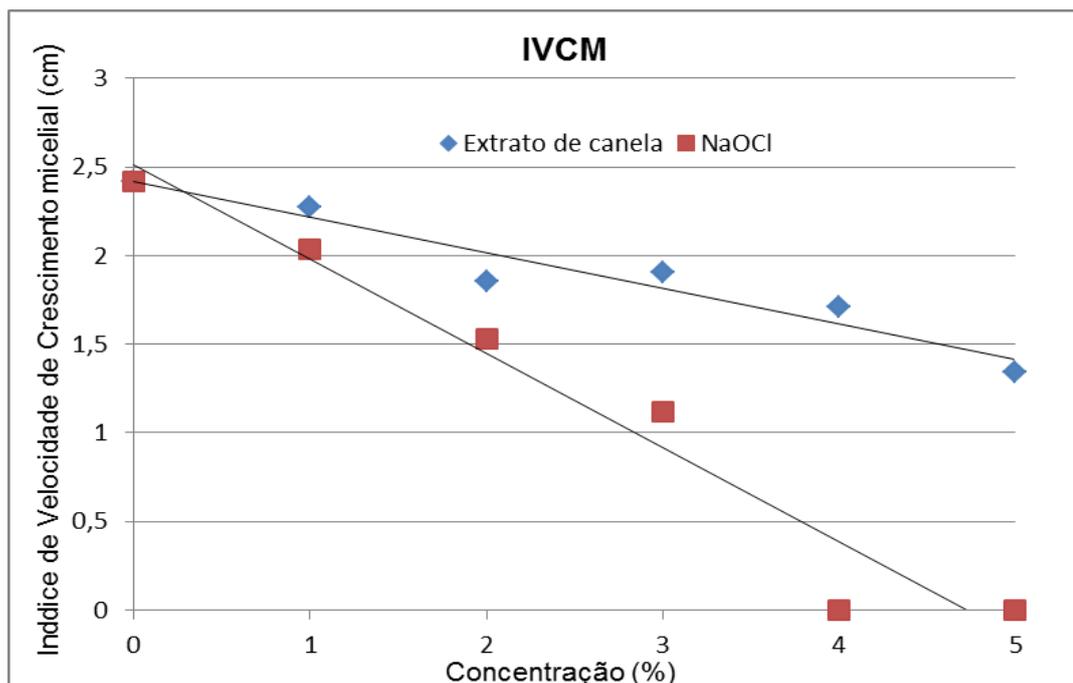


Figura 8- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) ($y = ax + b$) de *Alternaria alternata* sob diferentes concentrações (1 a 5%) de extratos aquosos de canela $R^2 = 0,933$ e de solução de hipoclorito de sódio $R^2 = 0,9557$

5. Conclusões

O hipoclorito de sódio inibiu completamente o crescimento micelial *in vitro* das três raças de *FOL* e de *AA*, quando utilizado a partir da concentração de 3%, sendo uma alternativa eficiente no controle deste fitopatógeno. O extrato aquoso de canela demonstrou efeito antifúngico para ambos, *FOL* e *AA*, porém a inibição completa do crescimento micelial ocorreu somente para *FOL* Raça 2. O maior efeito do extrato aquoso de canela sobre os fungos ocorreu pela redução gradativa do índice de velocidade de crescimento micelial dos fitopatógenos *FOL* e *AA*.

6. Literatura citada

ALVARENGA, M.A.R., COELHO, F.S.. Valor Nutricional. In: ALVARENGA, M.A.R. (Ed.). **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2. ed. 2013.

ARAUJO, A.E.S.; CASTRO, A.P.G.; ROSSETTO, C.A.V. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**. 2004.

BALBI-PEÑA, M.I., BECKER, A., STANGARLIN, J.R., FRANZENER, G.; LOPES M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**. v.31. 2006.

BARROS, L. S.; ADORIAM, A. I.; KOBAYASTI, L.. **Uso de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial in vitro de *Acremonium sp* e *Fusarium verticillioides*** . 2013.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. AgroEstat – Sistema de análises estatísticas de ensaios agrônômicos, Versão 1.0, Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2010.

BENDER, S.F., HEIJDEN, M.G.A.. Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses **J. Appl. Ecol**. v. 52. 2015.

BITU, P. I. M. **Bioatividade do óleo essencial de canela da indica (*Cinnamoun Zeylanicum Blume*) no controle da mancha alvo do mamoeiro**. Dissertação (Agroecologia), Universidade Estadual do Maranhão. 2014.

BRUM, R. B. C. S.. **Efeito De Óleos Essenciais No Controle De Fungos Fitopatogenicos**. Dissertação (Produção Vegetal) Universidade Federal do Tocantins. 2012.

CARMELLO, C.R; CARDOSO, J.C.; Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. **Scientia horticulturae**. 2018.

CARVALHO, R.R.. **Uso de bioagentes no controle da murcha de fusarium na cultura do tomateiro**. Tese (Fitopatologia). Centro Universitario de Anapolis. 2020.

CASEMIRO, J.L.C., BACCHI, L.M.A., REIS, H.F., GAVASSONI, W.L.. Quitosana associada com extratos vegetais no controle pós-colheita de antracnose em mamão 'formosa'. **Summa Phytopathol**. v. 45. 2019.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, M. J.. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.30. 2008.

CORREA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N.. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**. 2011.

FAOSTAT. Roma: FAO, 2020.

EU. Expert Group for Technical Advice on Organic Production: Final Report on Cleaning and Disinfection. 2016.

FARIAS, C. M. D. R.; CAVALLIN, I. C.; MARCONDES, M. M.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V.. Atividade antifúngica de canela sobre *Fusarium oxysporum*,

agente causal de podridão de raízes em diversas culturas olerícolas. **Horticultura Brasileira**. 2010.

FERREIRA, E. F.; SÃO JOSÉ, A. F.; BOMFIM, M. P.; PORTO, J. S.; JESUS, J. S.. Uso de extratos vegetais no controle in vitro do *Colletotrichum gloeosporioides* penz. Coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Rev. Brasileira de Fruticultura**. 2014.

FIGUEIREDO, C. S. S.; OLIVEIRA, P. V.; SAMINEZ, W. F. S.; DINIZ, R. M.; RODRIGUES, F. S.. Óleo essencial da Canela (*Cinamaldeído*) e suas aplicações biológicas. **Revista de Investigação Biomédica**. 2018.

FILGUEIRAS, R.M.C., PASTORI, P.L., PEREIRA, F.F., COUTINHO, C.R., KASSAB, S.O., BEZERRA, L.C.M. Agronomical indicators and incidence of insect borers of tomato fruits protected with non-woven fabric bags. **Ciência Rural**. v. 47. 2017

FILGUEIRA, F.A.R., Novo manual de olericultura Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Universidade Federal de Viçosa**. 2013.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A.. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biosci. J.** 2012

GIVIZIEZ, C. R.. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Piper aduncum, Piper hispidinervum e Syzygium aromaticum e desenvolvimento de um antisséptico com princípio ativo natural**. Dissertação (Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras. 2010.

GOMES, E. M. C; FIRMINO, A. V.; PENA, R. C. M.; ALMEIDA, S. S. M. S.. EFEITO INIBITÓRIO in vitro DE EXTRATOS DE *Cinnamomum zeylanicum* BLUME NO CONTROLE DE *Cylindrocladium candelabrum*. **Ciência Florestal**. 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. Produção Agrícola Municipal. Tabela 6588. 2020

LOOS, R.A., SILVA, D.D., FONTES, P.C.R., PICANÇO, M.C., GONTIJO, L.M., SILVA, E., SEMEÃO, A.A.. Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**. v. 26. 2008

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.. **Doenças do Tomateiro**. Embrapa, 2005.
MORAIS, L. A. S., GONÇALVES, G. G., & BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 2009.

OLIVEIRA, E. S.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V.. Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana. **Summa Phytopathologica**. 2016.

PICOLOTTO, L. et al Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.19-23, 2007.

PEREIRA, R.B., CARVALHO, A.D.F., PINHEIRO, J.B.. Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. **EMBRAPA-Comunicado 95**. 2013.

RIBEIRO, J. M.; CANUTO, K. M.; VESCHI, J. L. A.. **Compostos Clorados: Aspectos Gerais e sua Utilização como Agente Sanitizante na Agricultura, Micropropagação e Pecuária**. EMBRAPA. 2008.

RONGA, D.. Carbon footprint and energetic analysis of tomato production in the organic vs the conventional cropping systems in Southern Italy. **Journal of Cleaner Production**. v.220.2019.

SANTOS, G.G., MATTOS, L.M., MORETTI, C.L. Qualidade microbiológica e presença de resíduos microscópicos em derivados de tomate. In: **SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR – Alimentação e Saúde**, 5. 2015.

SANTRA, H.K., BANEEJEE, D.. Natural Products as Fungicide and Their Role in Crop Protection. **Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture**. 2020

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**. 2009.

SILVA, P.C. *et al.* Características agrônomicas e produtivas de tomate cereja sob níveis de potássio fornecidos via vinhaça e adubação mineral. **Research Society and Development**. v. 9.2020

USDA 5026: The use of Chlorine materials in Organic Production and Cleaning. 2021.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A.; SOUZA, F. R.. Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extrato de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**. 2011.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A.; SOUZA, F. R. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**. 2011.

VENTUROSO, L. R.. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogenicos a soja**. Dissertação (Agronomia) Universidade Federal da Grande Dourados. 2009.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETO, C. A. V.. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**. 2005

CAPÍTULO 2. Uso de extrato de canela e extrato de cravo no controle de *Alternaria alternata* *in vitro* e na pós-colheita de tomate

1) Resumo

As doenças fúngicas de ocorrência na pós-colheita de hortaliças são um fator de grande impacto para a perda de alimentos. Na cultura do tomateiro, uma das hortaliças mais consumidas no mundo, destaca-se a ocorrência da mancha de alternaria, causadas por diferentes espécies do gênero *Alternaria*, com impactos na pré e pós colheita. Nesse contexto, óleos essenciais e extratos de plantas com atividade antifúngica tem sido uma alternativa de controle de doenças associadas a pós-colheita de frutas e hortaliças, como uma forma de aumentar a segurança no consumo de alimentos frescos pela redução de produtos nocivos à saúde. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade dos extratos aquosos de canela e de cravo, no controle *in vitro* de *Alternaria alternata* e também na pós-colheita de tomate. Os extratos foram avaliados quanto a capacidade de inibição do crescimento micelial e germinação de esporos *in vitro*, bem como sua incidência em frutos de tomate. A inibição total do crescimento micelial de *A. alternata* em condições *in vitro* foi obtida com o uso do extrato de cravo a 5%. A combinação canela e cravo, tanto a 2,5 quanto a 5% também possibilitou a inibição completa do crescimento micelial. Além do efeito no crescimento micelial também foi possível verificar a inibição da germinação dos esporos e controle do fungo na pós colheita de frutos de tomate.

2) Introdução

O tomate é um produto altamente perecível após a colheita dada à fragilidade dos seus tecidos e pela manutenção de sua atividade metabólica, o que demanda métodos para a sua adequada conservação (FERRAZ *et al.*, 2012). Cerca de 60% da produção de tomate no país é destinada ao mercado consumidor in natura, sendo o aspecto externo e a qualidade do fruto fatores que influenciam diretamente na

decisão de compra pelo consumidor. O restante desta produção é utilizado como matéria-prima para processamento (BOTEON *et al*, 2020)

Nesse sentido, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a manutenção da qualidade dos frutos por mais tempo após a colheita, aumentando o tempo de prateleira (MENEZES, 2017).

As principais perdas na qualidade dos tomates na pós-colheita estão associadas a danos físicos, transporte, armazenamento inadequados e ação de agentes microbianos (CHITARRA, 2005). Tais perdas podem ser quantitativas, onde grande parte dos tecidos são deteriorados, ou qualitativas, onde o aspecto visual do produto fica comprometido, reduzindo o seu valor econômico (MACHADO *et al*, 2017), reduzindo o tempo de prateleira ou mesmo dificultando a sua comercialização, o que em geral resulta em descarte como resíduo.

O tomate é susceptível a vários patógenos na pós-colheita, destacando-se a mancha de alternaria, que apresenta alto potencial destrutivo, sendo responsável mundialmente por perdas econômicas consideráveis na pós-colheita de tomates (AHMED *et al.*, 2016; ARAH *et al.*, 2015). O agente etiológico, no Brasil, são fungos do gênero *Alternaria* (PEREIRA, PINHEIRO 2013). As medidas de controle são feitas basicamente com fungicidas sintéticos para as variedades tradicionalmente cultivadas, que são suscetíveis ao patógeno (BABI-PEÑA, 2006).

A redução da incidência de doenças na pós-colheita é um dos grandes desafios para minimizar as perdas de alimentos. Atualmente, este controle tem sido feito com uso de tratamentos térmicos, controle da umidade e modificação de atmosfera, do uso de controle alternativo com produtos biológicos, além do uso de fungicidas específicos de origem sintética (MACHADO *et al*, 2017). No entanto, com o avanço dos sistemas sustentáveis de produção de hortaliças devido ao aumento da demanda por produtos mais naturais, a exemplo dos orgânicos, e no qual não há permissão para uso de fungicidas sintéticos, tem ampliado a necessidade de prospecção de produtos alternativos que visem o controle de pragas e doenças nesses sistemas de cultivo, visando aumentar a produção de frutos de alta qualidade do ponto de vista sanitário e sem resíduos de produtos tóxicos (JUNIOR, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PERON *et al*, 2018).

Nesse contexto atual, diversos trabalhos têm relatado o potencial de óleos essenciais e extratos de plantas como alternativa para o tratamento na pós-colheita de frutas e hortaliças, principalmente pela sua eficiência no controle de fitopatógenos

(FONTANA *et al*, 2017; PERES *et al*, 2017; MOURA *et al.*, 2016; CRUZ *et al*, 2010).

Os óleos essenciais bem como os extratos aquosos apresentam atividade antimicrobiana e tem sido estudado no controle de doenças em tomate bem como na indução de resistência de plantas a patógenos (NETO *et al*, 2016). A atividade antifúngica de um mesmo extrato pode ser observada em diversos patógenos, sendo de grande relevância a determinação das concentrações a serem utilizadas e que sejam eficientes na inibição dos mesmos (ARAUJO *et al*, 2018).

Desta forma, nota-se a importância dos metabólitos secundários presentes nas plantas, que atuam nas interações entre a espécie vegetal e os fitopatógenos, ativando o sistema de defesa da planta hospedeira contra determinados patógenos, ou mesmo sendo extraídos e utilizados diretamente como forma de controle dos fitopatógenos. Nesse contexto, o uso de extratos ou metabólitos isolados provenientes de plantas já consumidas como alimentos, podem apresentar como principal vantagem serem muito pouco ou não tóxicos para os seres humanos animais e meio ambiente, quando aplicados nas concentrações efetivas de controle, apresentando ação fungicida, e constantemente associado a menor fitotoxicidade e riscos de contaminação quando comparados com os fungicidas sintéticos (CARMELLO, CARDOSO, 2018; STANGARLIN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, dentre as plantas que apresentam potencial fungicida ou antimicrobiano natural encontra-se a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), e o cravo (*Syzygium aromaticum*) que são plantas aromáticas que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (GOMES *et al.*, 2018). Carmello e Cardoso (2018) reportaram o controle do crescimento micelial *in vitro* de *Cercospora longissima*, fitopatógeno causador de manchas foliares na cultura da alface, pela adição de extratos aquosos de canela e do cravo, ambos utilizados na concentração de 5%, sendo o controle comparado ao uso do hipoclorito de sódio, um sanitizante a base de cloro e de ampla ação fungicida, demonstrando o seu potencial antifúngico, sendo esses extratos também chamados de fungicidas botânicos (YOON *et al.* 2013).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar o potencial dos extratos de canela e de cravo, aplicados de forma isolada ou combinada, no controle do fitopatógeno *Alternaria alternata*, em condições *in vitro* e também na pós-colheita frutos de tomate, o que poderia resultar numa técnica efetiva de controle de

fitopatógenos e redução de perdas pós-colheita causada por esse tipo de fungo. Além disso, foram estudados os principais princípios ativos contidos nesses extratos, bem como o tipo de ação antifúngica associado a esses fungicidas botânicos.

3) Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar), localizado no município de Araras SP.

Foram utilizadas colônias purificadas de *Alternaria alternata* obtidas a partir do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) (CCA/UFSCar).

3.1) Extrato de cravo e de canela no crescimento micelial *in vitro*

O preparo do extrato aquoso de canela e do cravo foi realizado utilizando-se 50 g da casca da canela da china (Kitano®, Cambara-PR) e 50 g de botões florais de cravo (Especialidades da roça®, Araras SP) para 200 ml de água destilada, sendo esses mantidos por 5 min após o ponto de ebulição da água do banho maria, ou seja, do exterior ao Erlenmeyer de 250 mL®.

Para os testes de inibição de crescimento micelial do fungo, em câmara de fluxo laminar os extratos aquosos de canela e cravo foram incorporados ao meio de cultura BDA, de forma isolada nas concentrações de 2,5 e 5,0 % e combinada, nas concentrações de 2,5 + 2,5% ou 5 + 5% de cada espécie, adicionados ao meio de cultura previamente autoclavado à 120°C por 25 minutos, no momento de redução da temperatura e solidificação do meio BDA, sendo posteriormente vertidos em placa de petri plásticas descartáveis e estéreis com medidas de 90 x 15 mm. O controle foi constituído de placas de petri contendo somente o meio de cultura BDA, sem a adição dos extratos.

Em seguida, fragmentos de BDA contendo micélios purificados de *A. alternata* coletados das margens de colônias previamente cultivadas em meio BDA sem tratamentos, foram transferidos para o centro da placa de petri contendo cada tratamento. As placas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25±3°C.

Foi utilizado o delineamento experimental totalmente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições (placas de petri contendo uma colônia) cada, realizados em duplicata (experimentos repetidos por duas vezes).

Foi avaliado o crescimento micelial diariamente durante 15 dias, por meio de medições do diâmetro das colônias (cm), obtendo assim a curva de crescimento micelial. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos fitopatógenos foi obtida por meio da fórmula utilizada por Venturoso (2009), onde: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha. A taxa de crescimento dos fitopatógenos foi obtida através de equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) os dias de incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial e (b) a taxa de crescimento micelial, obtida pelo coeficiente de regressão (VENTUROSO, 2009). O cálculo do IVCM deve ser realizado conforme fórmula descrita por Oliveira (1991) onde: $IVCM = \sum (D - D_a) / N$. Sendo:

- IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial
- D= diâmetro médio atual da colônia
- D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior
- N= número de dias após a inoculação.

Os dados foram avaliados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com auxílio do Software estatístico Agroestat. E as comparações de médias realizadas pelo teste de Tukey a 5%

3.2) Influência do eugenol e cinamaldeído no crescimento micelial

Para os testes de inibição de crescimento micelial do fungo, em câmara de fluxo laminar o eugenol (Sigma Aldrich, USA) e o cinamaldeído (Sigma Aldrich, USA) foram incorporados ao meio de cultura BDA de forma similar ao descrito para os extratos aquosos, de modo a se obter a concentração final de 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,1% no meio de cultura, e vertidos em placas de petri previamente esterilizadas.

A escolha dessas concentrações foi baseada na média encontrada do princípio ativo, baseado no cálculo de porcentagem do componente no óleo essencial e na porcentagem de óleo essencial contido na casca da canela e botões florais do cravo. Para o controle foram utilizadas placas somente com o meio de

cultura BDA. Após a solidificação do meio, fragmentos de BDA contendo micélios purificados de *A. alternata* coletados das margens das colônias foram transferidos para o centro da placa. As placas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento, com temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Foi utilizado o fatorial 2 (princípios ativos) x 7 (concentrações) e delineamento experimental totalmente casualizado, com quatro repetições cada sendo cada uma constituída de uma placa de petri, em duplicata (experimentos repetidos por duas vezes).

Avaliações realizadas da mesma forma do item 3.1.

3.3) Avaliação do tipo de efeito antifúngico dos extratos e princípios ativos do cravo e da canela

O objetivo desse experimento foi avaliar se o tipo de ação dos extratos do cravo e da canela, bem como de seus princípios ativos, sobre o crescimento *in vitro* dos micélios, são do tipo fungistático ou fungicida. Para tanto, após os 15 dias dos experimentos anteriores (3.1 e 3.2), fragmentos do meio com micélio de *A. alternata* foram retiradas de cada tratamento e transferidas para meio de cultura BDA fresco, sem os produtos utilizados como antifúngicos, para avaliação do crescimento micelial. As medições e avaliações do crescimento micelial do fungo ocorreram de forma similar ao descrito nos experimentos anteriores.

O efeito dos extratos na germinação de esporos foi testado em caldo de dextrose e batata (BD) previamente autoclavado. Os extratos foram adicionados ao BD de forma a se obter as concentrações finais de 0, 2,5% e 5% de canela ou cravo, e combinando a canela e o cravo a 2,5% e 2,5% e a 5% e 5%. As parcelas experimentais consistiram de 10 ml de meio BD acondicionados em tubos de ensaio. Para avaliação da germinação dos esporos, foram adicionados 100 μl de suspensões de esporos (1×10^7 esporos / ml) de *A. alternata* em cada tubo.

Foi utilizado o delineamento experimental totalmente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições cada, realizados em duplicata (experimentos repetidos por duas vezes). Após 24 h de incubação a 28°C em um agitador rotativo (200 rpm) foi determinada a porcentagem de germinação através da contagem de 100 esporos por repetição em microscópio óptico, sendo considerados germinados os esporos que emitiram tubos germinativos maiores ou iguais ao menor diâmetro do esporo.

3.4) Efeitos dos extratos de canela e cravo sobre frutos de tomates inoculados com *A. alternata* na pós-colheita.

Os extratos foram preparados da mesma forma e concentrações utilizadas nos testes *in vitro*, sendo os frutos controle tratados com água destilada previamente esterilizada. Foram utilizados tomates do tipo sweet grape produzidos de forma orgânica e livres de lesões e podridões. Antes da aplicação dos tratamentos e do patógeno, os mesmos foram submetidos a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 10% por 5 minutos, sendo posteriormente lavados com água destilada estéril e secos a temperatura ambiente antes da aplicação do fermento e inoculação de *A. alternata*.

Após a assepsia, foram realizados quatro ferimentos (2 mm de profundidade) equidistantes em cada área, com o auxílio de uma agulha esterilizada, sendo pipetados 10 µl de suspensão de conídios de *A. Alternata* (5×10^6 esporos / ml) sobre os frutos. Uma hora após a inoculação os frutos foram imersos nos tratamentos e mantidos sobre os efeitos dos extratos por 30 minutos.

Após a inoculação os frutos foram colocados em recipientes plásticos (300 ml), adicionando-se um algodão embebido em 20 ml de água destilada para a manutenção da umidade no ambiente interno do recipiente. Em seguida, os recipientes foram levados para a BOD durante 7 dias a 28°C.

Foi utilizado o delineamento experimental totalmente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições cada, sendo utilizados quatro frutos por repetição, em duplicata (experimentos repetidos por duas vezes).

As avaliações foram realizadas a cada dois dias durante 7 dias, considerando a incidência do patógeno e calculando-se a porcentagem de frutos com sintomas e sinais (AMORIM, 1995), a partir do número de frutos infectados pelo patógeno em cada tratamento, pela fórmula: % Incidência = (Nº de frutos infectados/Nº total de frutos) x 100.

Após o término da coleta dos dados de incidência foi construída a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a equação proposta por Campebell & Madden (1990):

$\Sigma [((y_1 + y_2)/2) \cdot (t_2 - t_1)]$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

Os dados foram avaliados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com auxílio do Software estatístico Agroestat. E as comparações de médias realizadas pelo teste de Tukey a 5%

4) Resultados e Discussão

4.1) Extrato de cravo e de canela no crescimento micelial *in vitro*

Foi observada a inibição total do crescimento micelial de *A. alternata* (AA) quando utilizado o extrato de cravo na concentração de 5% e quando utilizados a combinação dos extratos de cravo e canela, em ambas as concentrações (Figura 1)

Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (Tabela 1) e as curvas de crescimento do fitopatógeno em diferentes extratos botânicos (Figura 2), foram observados reduções significativas tanto na taxa de crescimento quanto nos valores de IVCM, independente do tipo e concentrações dos extratos botânicos, demonstrando os efeitos antifúngicos, tanto da canela como do cravo. No entanto, a maior efetividade de controle ocorreu com o uso do extrato de cravo a 5% e da aplicação conjunta do extrato de cravo e canela, independente da concentração utilizada (2,5 + 2,5 ou 5 + 5%) resultando em inibição total do crescimento micelial de AA, com valor de IVCM igual a zero.

De forma similar a este trabalho, Almeida *et al.* (2017) relataram a inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani* com o uso de extratos de alho, gengibre, cravo-da-índia, sendo reportado que somente o extrato de cravo inibiu completamente o crescimento micelial, mesmo na menor concentração utilizada (1%). Os resultados obtidos no atual experimento demonstraram que essa mesma efetividade com o cravo foi alcançada somente na concentração de 5%, sendo que o uso do extrato aquoso de cravo em concentrações menores (2,5%) reduziu significativamente o IVCM (1,00) comparado ao controle (2,42), porém não inibindo completamente o crescimento micelial do fungo. Essas diferenças podem ser atribuídas pela metodologia associada ao preparo dos extratos, sendo que no atual trabalho foi utilizado o extrato filtrado e não autoclavado do cravo, ao invés do extrato bruto autoclavado em conjunto ao meio BDA, como descrito por Almeida *et al.* (2017). Esses resultados demonstram que os componentes ativos antifúngicos associados ao cravo parecem ser estáveis termicamente, seja pelo preparo em

banho maria seja pela autoclavagem realizada, um fator importante para sua viabilidade de aplicação como pesticida.

De acordo com Alves e Perina (2014) o extrato de cravo da Índia vem se destacando no controle de doenças. O trabalho de Affonso *et al.* (2012), mostra que o extrato do cravo possui o eugenol, β -cariofileno e α -humuleno como os princípios ativos que atuam como fungicidas. No entanto, uma grande parte dos estudos tem demonstrado que a atividade antifúngica contra *Alternaria sp.* poderia ser principalmente atribuída ao eugenol e acetato de eugenol (JINGA *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2017), sendo esses constituintes primários e majoritários (50 a 90% da composição do óleo) em diferentes amostras do cravo (SILVESTRI *et al.* 2010; GOMES *et al.* 2018).

Tomazoni *et al.* (2013) também reportou a inibição de 98,47% no crescimento micelial de *Alternaria solani* quando utilizado o óleo essencial de canela na concentração de 2,0 μ L/mL. No atual trabalho com extrato aquoso, apesar do extrato de canela reduzir o IVCM de 2,42 (controle) para 1,90 (2,5%) e 1,39 (5%) resultando em menor taxa de crescimento quando comparado ao controle, demonstrando efeito antifúngico, isso ocorreu somente de forma parcial e com valores acima daqueles obtidos com o cravo, mesmo na menor concentração utilizada desse extrato botânico.

Essas diferenças podem ser associadas à maior concentração de princípios ativos no óleo essencial que aqueles obtidos no extrato (TORRES E SIMÕES, 2021). No caso da casca de canela, o cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), um álcool terpeno cíclico, é o principal componente ativo do óleo essencial da casca de canela (55-80%), sendo frequentemente e amplamente associado pelas suas diferentes atividades biológicas e farmacológicas, tendo sido relatado atividade antimicrobiana e antifúngica (KOKETSU *et al.* 1997; PONCIANO *et al.*, 2020; RAO, GAN, 2014; SILVA FIGUEIREDO *et al.*, 2017). O segundo componente em maior teor na casca de canela é o Eugenol (12 a 15%), no entanto, esse princípio ativo é preponderante nas folhas podendo atingir até 70-95% da composição do óleo essencial extraído dessa parte da planta (KOKETSU *et al.* 1997; RAO, GAN, 2014).

Tabela 1. Índice de velocidade de crescimento micelial de *Alternaria Alternata* submetida a diferentes tratamentos com extrato aquoso de canela e extrato aquoso de cravo

TRATAMENTOS	IVCM
Controle	2,42 a
Canela 2,5%	1,90 b
Canela 5%	1,34 c
Cravo 2,5%	1,00 d
Cravo 5%	0,00 e
Canela 2,5% x Cravo 2,5%	0,00 e
Canela 5% x Cravo 5%	0,00 e

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de probabilidade.

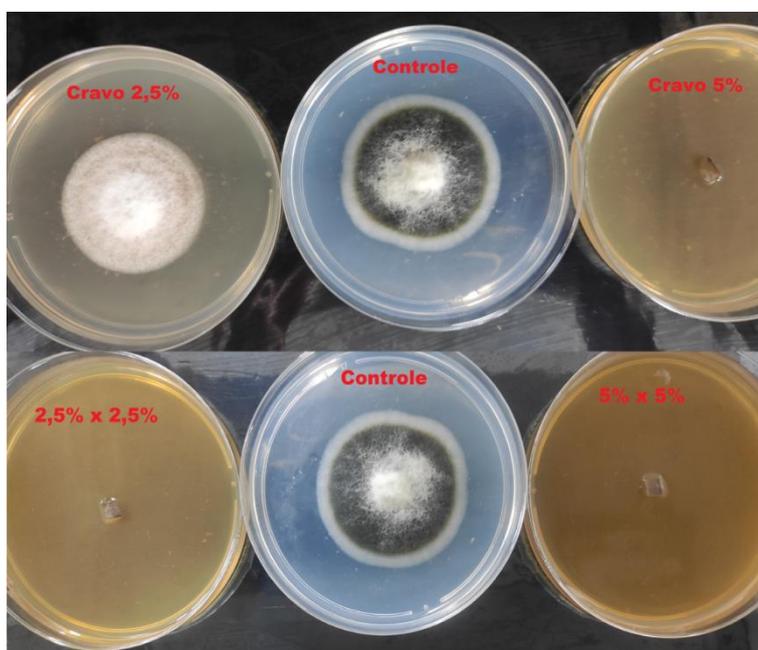


Figura 1 - Porcentagem de inibição crescimento micelial de *Alternaria alternata* submetida a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.

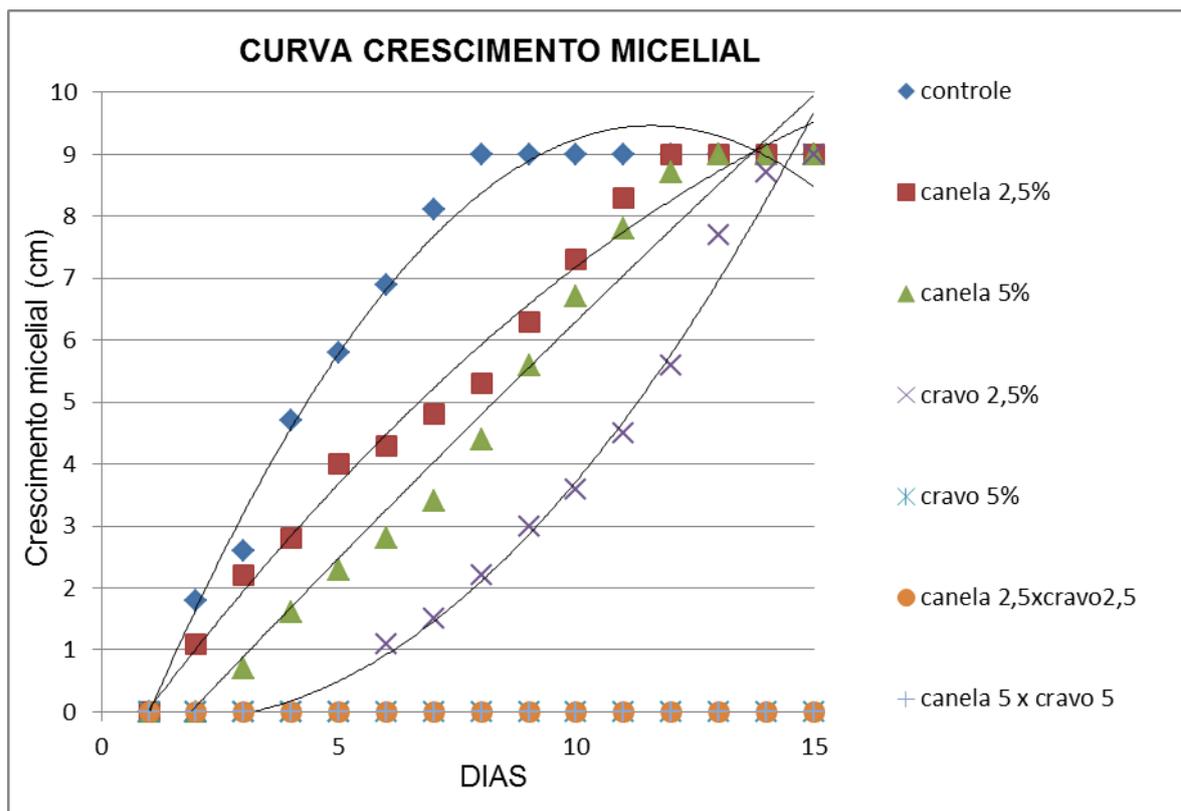


Figura 2- Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial de *Alternaria alternata*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,9866$; Canela 2,5% $R^2 = 0,9892$, Canela 5% $R^2 = 0,9843$, Cravo 2,5% $R^2 = 0,9753$, Cravo 5% $R^2 = \#N/A$, Canela 2,5% X Cravo 2,5% $R^2 = \#N/A$, Canela 5% x Cravo 5% $R^2 = \#N/A$.

4.2) Influência do eugenol e cinamaldeído no crescimento micelial de *A. alternata*

Foi observada a inibição total do crescimento micelial de *A. alternata*, quando utilizado o eugenol ou o cinamaldeído, a partir da menor concentração utilizada no experimento (0,03%) (Figura 3), confirmando que grande parte dos resultados obtidos como antifúngicos, pelo uso dos extratos botânicos, são em grande parte, resultado da presença desses princípios ativos na sua composição.

Os resultados obtidos são similares ao reportado por Faria et al. (2006) que observaram a inibição do crescimento micelial de dois tipos de *Alternaria* com o uso do eugenol na concentração de 0,02%. Da mesma forma Abbaszadeh et al. (2014) relataram a inibição do crescimento micelial de *A. alternata*, *Cladosporium* spp e *Aspergillus* spp a partir da concentração de 0,03% eugenol, levando a redução progressiva e significativa do crescimento de todos os fungos com o aumento gradativo da concentração desse princípio ativo da canela e do cravo-da-índia. Esses estudos estão em acordo com os obtidos no experimento atual, tanto para os princípios ativos isolados quanto para os extratos botânicos com potencial

antifúngico. Segundo Davison (1997) a atividade antifúngica do eugenol pode ser atribuída à capacidade do composto a causar um distúrbio na membrana citoplasmática, interrompendo o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular. Outros efeitos associados como antifúngico do eugenol, analisados em *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans*, estão associados a redução do diâmetro celular e do tamanho da cápsula, aumento da peroxidação lipídica, despolarização de membrana e redução da integridade dos lisossomos nesses fungos (ALVES *et al.* 2017).

Da mesma forma que o eugenol, também o cinamaldeído possui propriedades antifúngicas e antimicrobianas (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; GILL, HOLLEY, 2004; SANLA-EAD *et al.*, 2012). Xie *et al.* (2017), relataram que o tratamento de *Aspergillus flavus* com cinamaldeído mostrou inibição do crescimento micelial, segundo os autores, as características estruturais dos compostos presentes nos óleos essenciais pode ter relação com a atividade, podendo a atividade antifúngica do cinamaldeído estar relacionada à ligação dupla conjugada e ao comprimento da cadeia CH ligada ao anel, outro fator que pode ter influência é a lipofilicidade do composto.

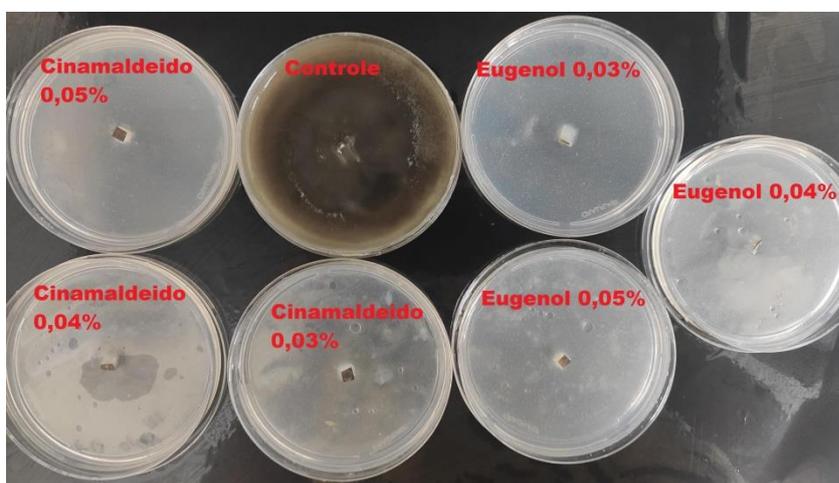


Figura 3 - Porcentagem de inibição crescimento micelial de *Alternaria alternata* submetida a tratamento com eugenol e cinamaldeído

4.3 Tipos de efeitos associados aos extratos e princípios ativos da canela e do cravo

Nesse experimento foi possível observar o crescimento micelial em meio BDA livre dos tratamentos com os extratos botânicos ou de seus princípios ativos, após o subcultivo, por 15 dias, de inóculos de *A. alternata* previamente tratados com esses compostos. Foi observada a inibição do crescimento micelial somente quando se utilizou o extrato de cravo em conjunto com o extrato da canela na concentração de 5%, o que mostra que os extratos apresentam um efeito fungistático até uma determinada concentração e se torna fungicida em concentrações maiores. Também foi possível observar a inibição do crescimento micelial com o uso do eugenol e cinamaldeído em todas as concentrações, mostrando um efeito fungicida desses tratamentos. Segundo Ferreira *et al* (2020), o sinergismo dos compostos presentes nos extratos pode proporcionar maior efeito fungicida e fungistáticos sobre fitopatógenos.

Em relação ao IVCM e a curva de crescimento micelial (Figura 4), foi observado uma menor taxa de crescimento quando utilizado o extrato de cravo na concentração de 5%, e quando utilizado em conjunto com a canela na concentração de 2,5%.

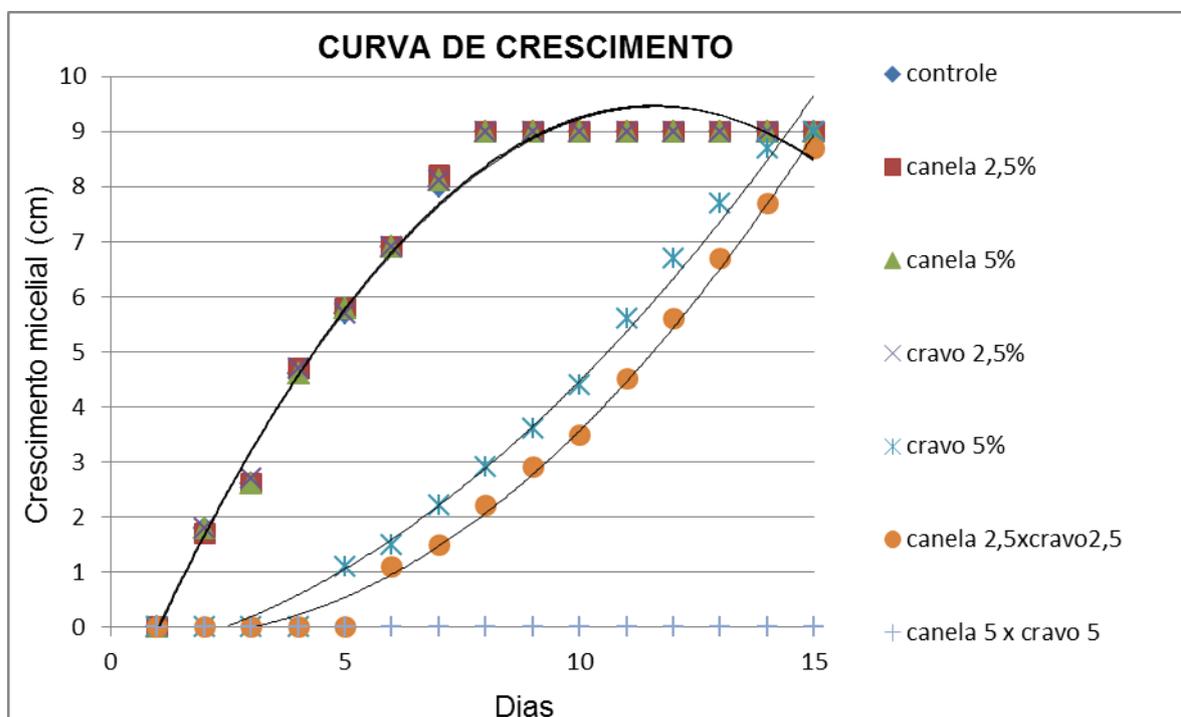


Figura 4 - Curva de crescimento ($y = ax + b$) micelial de *Alternaria alternata*, submetidos a diferentes tratamentos. Controle $R^2 = 0,973$; Canela 2,5% $R^2 = 0,9861$, Canela 5% $R^2 = 0,9567$, Cravo 2,5% $R^2 = 0,9873$, Cravo 5% $R^2 = 0,9910$, Canela 2,5% X Cravo 2,5% $R^2 = 0,9955$, Canela 5% x Cravo 5% $R^2 = \#N/A$.

Em relação aos esporos de *A. alternata*, foi observada a diminuição na porcentagem de germinação de esporos (Figura 5) com o uso dos extratos, ocorrendo à inibição de 100% na taxa de germinação quando utilizado o extrato de cravo na concentração de 5%, e quando utilizado os extratos em conjunto nas duas concentrações. O extrato de canela também resultou em uma redução significativa da taxa de germinação dos esporos, que ficou em 51% e 42% nas concentrações de 2,5 e 5%, respectivamente, quando comparado ao controle.

Almeida *et al* (2017) relataram a inibição de 100% na germinação de *Alternaria sp* quando utilizado o extrato de cravo a partir da concentração de 1%, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Resultados semelhantes a este trabalho foram obtidos com outros extratos botânicos, obtidos por Itako *et al.* (2008), que verificaram que o extrato aquoso, obtido de folhas frescas de alecrim, inibiram em 79% a esporulação de *Alternaria solani* a partir da concentração de 10%, e em 60% a germinação de conídios para a concentração de 20%, e a *Artemisia camphorata* a partir da concentração de 1% também resultou em inibição de 79% na taxa de germinação dos conídios.

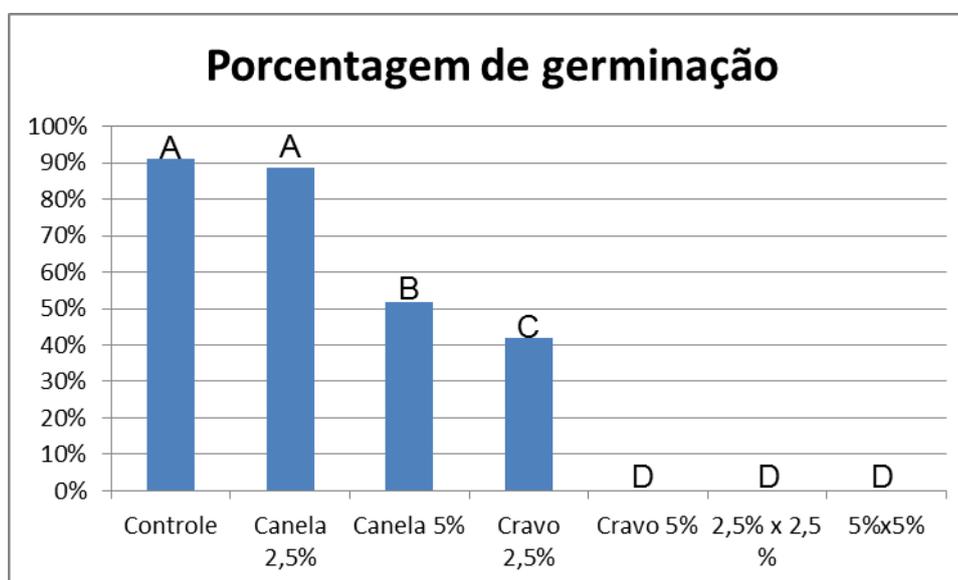


Figura 5 - Porcentagem de inibição de germinação de *Alternaria alternata* submetida a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela. Médias seguidas pela mesma não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4 Efeitos dos extratos aquosos de cravo e canela sobre a ocorrência de *A. alternata* na pós-colheita de frutos de tomateiro

O extrato de cravo na concentração de 5% e os tratamentos que combinaram o extrato de canela e cravo, controlaram totalmente o fungo em frutos de tomate, por até 7 dias, período em que o experimento foi avaliado (Figuras 6,7).

Em relação à área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 7) se observou uma redução significativa em relação ao controle (16,25) quando utilizado os extratos de canela, na concentração de 5% (8). O fungo foi totalmente controlado quando utilizado o extrato de cravo na concentração de 5% e quando utilizado o extrato de cravo em conjunto com o extrato da canela.

Segundo Nurnberger e Brunner (2002), a utilização de extratos naturais de plantas como pré-tratamentos para o controle de doenças pós-colheita está baseada na premissa de que estes representam a mistura de várias substâncias solúveis, capazes de agir sobre o fitopatógeno. Diferindo do que observamos nesse trabalho, Ranieri *et al* (2015) relatou que o óleo essencial de cravo na concentração de 1% não controlou a *Alternaria sp* em frutos de tomate, apresentando AACD similar a testemunha. Machado *et al* (2017) observaram que o óleo de canela, na concentração de 1%, não foi eficiente no controle da *Alternaria* em frutos de tomate.

Estudos demonstram que grande parte dos extratos de plantas apresentam propriedades antifúngicas. Porém, essas propriedades podem sofrer interferência de fatores inerentes às plantas, como parte utilizada, idade, época de colheita. A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de patógeno a ser controlado e dos processos de obtenção e manipulação do extrato (SILVA, 2005; GOUSSOUS *et al*, 2010).

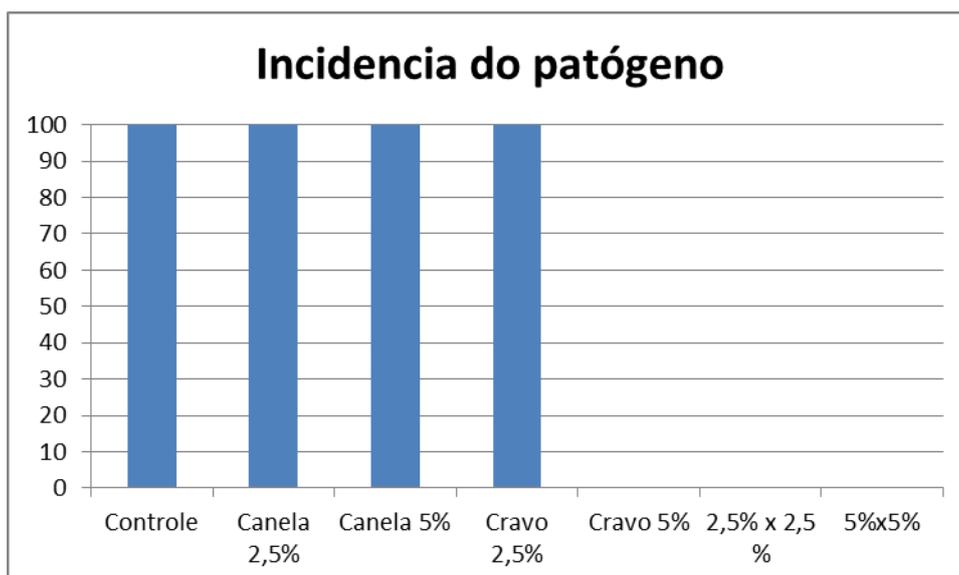


Figura 6 - Porcentagem de incidência de *Alternaria alternata* em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.

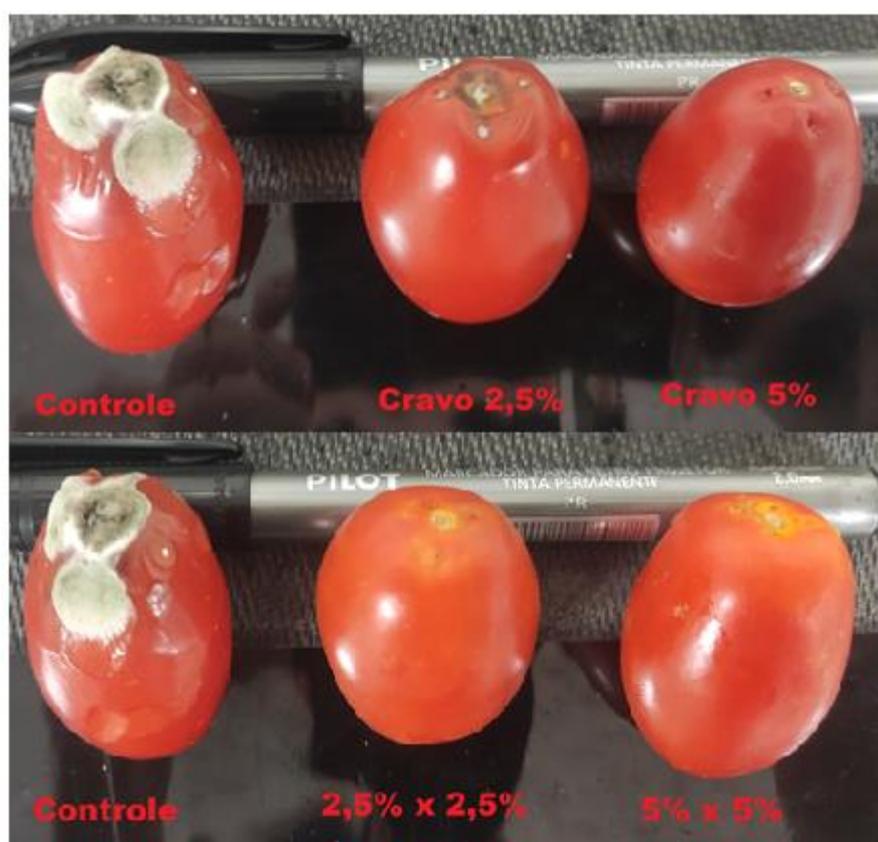


Figura 7 - Porcentagem de inibição crescimento micelial de *Alternaria alternata* em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela.

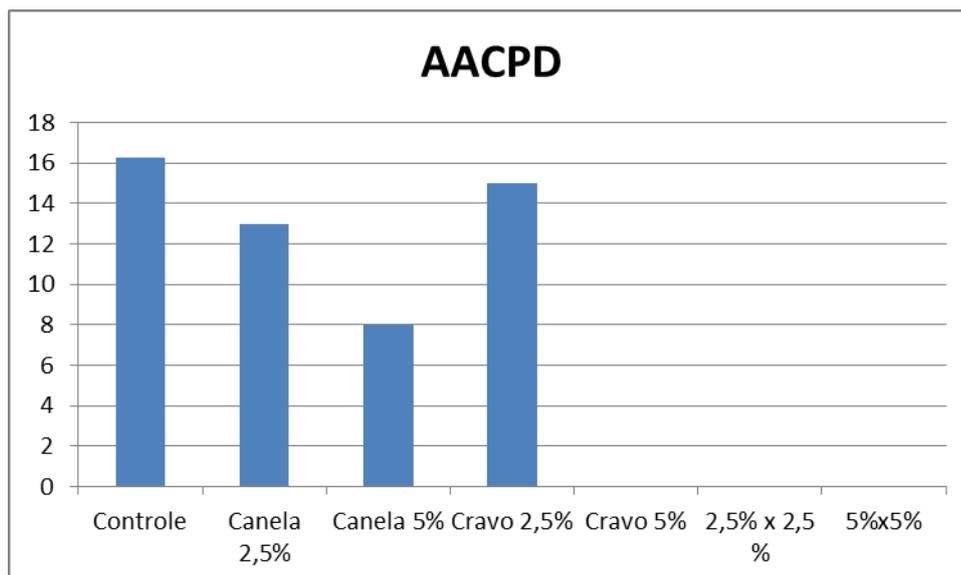


Figura 8 - Área abaixo da curva de progresso da doença de *Alternaria alternata* em frutos de tomate submetidos a tratamento com extrato aquoso de cravo e extrato aquoso de cravo em conjunto com extrato aquoso de canela. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de probabilidade.

5) Conclusões

Os extratos botânicos de cravo e canela demonstraram diferentes efeitos antifúngicos associados a *A. alternata*, um fitopatógeno de grande relevância para a pré e pós-colheita de frutos de tomateiros. O extrato aquoso de cravo a 5% ou as misturas de cravo e canela, a 2,5 ou 5%, demonstraram serem capazes de inibir totalmente o crescimento micelial e a germinação dos esporos, atuando ora como fungistáticos, ora como fungicidas. Os principais efeitos da associação dos princípios ativos cinamaldeído e eugenol sugerem uma maior contribuição do eugenol nesses processos. Esses extratos também foram efetivos no controle do patógeno na pós-colheita de frutos de tomateiro, demonstrando sua efetividade como antifúngico, visando o uso de substâncias orgânicas com menor impacto a saúde e ao meio ambiente, sendo possível seu uso como antifúngico na agricultura orgânica.

6) Literatura citada

ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A.R., ABBASZADEH, A.. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**. v.24. 2014.

AFFONSO, R.S., RENNO, M.N., SLANA, G.B.C.A., FRANÇA, T.C.C.. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**. v. 4. 2012.

ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleo essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. In: **INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS**. Maringá: UEM, 2014.

ALVES, J.C.O.. Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus*. **Front. Microbiol.** 2017.

ALMEIDA, E.N., MOURA, G.S., FRANZENER, G.. Potenciais alternativas com extratos vegetais no controle da pinta preta do tomateiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 12. 2017.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**.. v. 1. 1995.

AHMED, F. A.; SIPES, B. S.; ALVAREZ, A. M. Natural products to control postharvest gray mold of tomato fruit-possible mechanisms. **Journal Plant Pathology. Microbiology**. 2016.

ARAH, I. K.; AMAGLO, H.; KUMAH, E. K.; OFORI, H. Preharvest and postharvest factors affecting the quality and shelf life of harvested tomatoes: a mini review. **International Journal of Agronomy**. 2015.

ARAUJO, A. C.; TOLEDO, E. D.; SOARES, W. R. O.. Produtos Alternativos No Controle DE *Colletotrichum* spp. Isolados De Manga E Banana. **Científica Multidisciplinary Journal**. 2018.

BALBI-PEÑA, M.I., BECKER, A., STANGARLIN, J.R.,FRANZENER, G.; LOPES M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**. v.31. 2006.

BOTEON, M., DELEO, J.P.B., MOREIRA, M.M.. Tomaticultura em números. **Hortifruti Brasil**. 2020.

CARMELLO, C.R; CARDOSO, J.C.; Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. **Scientia horticulturae**. v.234. 2018.

CASA J; EVANGELISTA RM. Influência das épocas de colheita na qualidade de tomate cultivado em sistemas alternativos. **Semina: Ciências Agrárias**. 2009.
CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. **New York: John Wiley & Sons**. 1990.

COELHO, C. C. D. E. S. *et al.* Ozônio em morangos minimamente processados, uma alternativa ao uso do cloro na segurança de alimentos. **Visa em Debate**, v. 3, 2015.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: UFLA. 2005.

CRUZ, M.J.S.; CLEMENTE, E.; CRUZ, M.E.S.; MORA, F.; COSSARO, L.; PELISSON, N. Efeito dos compostos naturais bioativos na conservação pós-colheita de frutos de mangueira cv. Tommy Atkins. **Ciência e Agrotecnologia**. 2010.

DAVIDSON, P.M. . Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Food microbiology: **fundamentals and frontiers**. 1997.

FARIA, T.J. et al. Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.49. 2006.

FIGUEIREDO, C. S. S. S. et al., Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista de Investigação Biomédica**. v. 9. 2017.

FERRAZ, E. O.; EVANGELISTA, R. M.; CLÁUDIO, M. T. R.; SOARES, L. P. R.; SILVA, B. L.; CARDOSO, A. I. I. Características físico-químicas em tomates cereja tipo SweetGrape envolvidos por diferentes películas protetoras. **Horticultura Brasileira**. 2012.

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

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde 52 against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70. 2004.

GOUSSOUS, S. J.; EL-SAMENA, F. M.;TAHHAN, R. A. Antifungal activity of several medicinal plants extracts against the early blight pathogen (*Alternaria solani*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. v. 43. 2010.

GOMES, P.R.B.. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm**. v. 47. 2018.

ITAKO, A. T *et al.* Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33. 2008.

JINGA, C.; ZHAOB, J.; HANB, X.; HUANGA, R.; CAIC, D.; ZHANGA, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104. 2018.

JUNIOR, J.M.A. **Uso indiscriminado de defensivos químicos na cultura do tomateiro**. Tese (Fitotecnia). Centro Universitario de Anapolis. 2020.

KOKETSU, M., GONÇALVES, S.L., GODOY, R.L.O, LOPES, D., MORSBACH, N.. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Food Sci. Technol.** v. 17. 1997.

LINS, S. R. O. et al. Controle alternativo da podridão peduncular em manga. **Summa Phytopathologica.** v. 37., 2011

MACHADO, R.F.C., BONALDO, S.M., WOBETO, C., BARROS, C.F.C.P.P.. Controle alternativo de podridões pós-colheita em tomate. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais.** v.8. 2017.

MARI, M.; DI FRANCESCO, A.; BERTOLINI, P. Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. **Stewart Postharvest Review.** 2014.

MELO, C. N.; SOUZA, C. L.; SILVA, A. F. V.; GOMES, F. R.; NETO, O. F. C.; COSTA, P. L. D. Cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) hidropônico sob diferentes níveis de fósforo e potássio em solução nutritiva. **Revista Agroecossistemas.** 2014.

MENEZES, K. R. P.; SANTOS, G. C. S.; OLIVEIRA, O. M.; SANCHES, A. G.; CORDEIRO, C. A. M.; OLIVEIRA, A. R. G. Influência dos revestimentos comestíveis na preservação da qualidade pós-colheita de tomate de mesa. **Colloquium Agrariae.** 2017.

MOURA, G. S.; JASKI, J. M.; FRANZENER, G.. Potencial de extratos etanólicos de propólis e extratos aquosos de plantas espontâneas no controle de doenças pós-colheita do morango. **Revista Verde.** 2016.

NETO, J. S. *et al.* Qualidade de frutos de tomateiro cultivado em sistema de produção orgânico e tratados com subprodutos de capim limão. **Revista Ciência Agronômica,** v. 47, 2016.

NURNBERGER, T., BRUNNER, F. Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology.** 2002.

OLIVEIRA, I.C.M. *et al.* Produção de sementes: um desafio para a agricultura orgânica. **XICBA.** 2020

PALOU, L.; SMILANICK, J.L.; DROBY, S. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds. **Stewart Postharvest Review.**, 2008.

PEREIRA, R.B., CARVALHO, A.D.F., PINHEIRO, J.B.. Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. **EMBRAPA-Comunicado 95.** 2013

PERON, C.C., OLMEDO, J.P., DELL'ACQUA, M.M., SCALCO, F.L.G., CINTRÃO, J.F.F. Produção orgânica: uma estratégia sustentável e competitiva para a agricultura familiar. **Retratos de Assentamento.** V. 21. 2018

PONCIANO, R. C. S.; MARTINS, G. R.; IULIANELLI, G. C. V; TAVARES, M. I. B. Estudo do extrato da canela por NMR em solução. **Brazilian Journal of development**. 2020.

RAO, P.V., GAN, S.H.. "Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **Review Article**. vol. 2014. 2014.

RANIERI, E., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., OLIVIEIRA, J.S.B., MESQUINI, R.M., CLEMENTE, E., CRUZ, M.E.S. Utilização de compostos bioativos de plantas medicinais na pós-colheita de tomate. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**. v. 14. 2015.

ROMANAZZI, G.; SANZANI, S. M.; BI, Y.; TIAN, S.; MARTÍNEZ, P. G.; ALKAN, N. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122. 2016.

SANLA-EAD, N.; JANGCHUD, A.; CHONCHENCHOB, V.; SUPPAKUL, P. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. **Packaging Technology and Science**. v. 25. 2012.

SCHWARZ K.; RESENDE J. T. V.; PRECZENHAK A. P.; PAULA J. T.; FARIA M. V.; DIAS D. M. Desempenho agrônomo e qualidade físico-química de híbridos de tomateiro em cultivo rasteiro. **Horticultura Brasileira**. 2013.

SHARMA, A.; RAJENDRAN, S.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123. 2017.

SILVESTRI, J.D.F., TREICHEL, H.. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. v. 57. 2010.

STANGARLIN, J.R; KUHN, O.J; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. v. 2. 2011

TOMAZONI, E. Z. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: **VIII Congresso Brasileiro De Agroecologia**, 2013.

TZORTZAKIS, N.; SINGLETON, I.; BARNES, J. Impact of low-level atmospheric ozone-enrichment on black spot and anthracnose rot of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, 2008.

XIE, Y.; HUANG, Q.; WANG, Z.; CAO, H.; ZHANG, D.. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**. V. 97. 2017

YOON, W.Y., CHA, B., KIM, J.C.. Recent Trends in Studies on Botanical Fungicides in Agriculture. **Plant Pathol J.** v. 29. 2013

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os compostos foram capazes de inibir o desenvolvimento do fungo em alguma concentração, demonstrando efetividade como antifúngico visando o uso de substâncias orgânicas com menor impacto a saúde e ao meio ambiente, sendo possível seu uso como antifúngico na agricultura orgânica.

O hipoclorito de sódio inibiu completamente o crescimento micelial *in vitro* das três raças de *FOL* e de *AA*, quando utilizado a partir da concentração de 3%, sendo uma alternativa eficiente no controle deste fitopatógeno. O extrato aquoso de canela demonstrou efeito antifúngico para ambos, apresentando redução gradativa do índice de velocidade de crescimento micelial dos fitopatógenos *FOL* e *AA*.

Os extratos botânicos de cravo e canela demonstraram diferentes efeitos antifúngicos associados a *A. alternata*. O extrato aquoso de cravo a 5% ou as misturas de cravo e canela, a 2,5 ou 5%, demonstraram ser capazes de inibir totalmente o crescimento micelial e a germinação dos esporos, atuando ora como fungistáticos, ora como fungicidas, sendo os principais efeitos o da associação dos princípios ativos cinamaldeído e eugenol. Esses extratos também foram efetivos no controle do patógeno na pós-colheita de frutos de tomateiro, demonstrando seu potencial como antifúngico.

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Rodrigues Carmello, realizada em 28/07/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)
Prof. Dr. Carlos Armênio Khatounian (USP)
Prof. Dr. Guilherme Henrique Martins Rodrigues Ribeiro
(UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.