ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM FASE DE VAPOR DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS COMBINAÇÕES CONTRA *Botrytis cinerea*

J. G. Oliveira Filho[1,*], C. C. O. Nobre[2], G. C. Silva[2], H. M. C. Azeredo[3,4], M. D. Ferreira[4]

[1] *Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara - Jaú Km 01 - Campus Ville, 14800-903, Araraquara, São Paulo*
[2] *Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz, s/n, 13565-905, São Carlos, São Paulo*
[3] *Embrapa Agroindústria Tropical - Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, 60511-750 Fortaleza, Ceará*
[4] *Embrapa Instrumentação, Rua 15 de Novembro, 1452 - Centro, 13560-970, São Carlos, São Paulo.*
[*] *Autor correspondente, e-mail: josemar.gooliver@gmail.com.*

Resumo: *Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico que afeta várias espécies de plantas, provocando a podridão cinzenta. A atividade antifúngica dos óleos essenciais (OEs) de *Cymbopogon martinii*, *Cinnamomum camphora*, *Mentha spicata* e *Mentha piperita* e suas misturas binárias M1 (*M. piperita* e *C. martinii*), M2 (*M. piperita* e *C. camphora*), M3 (*M. piperita* e *M. spicata*), M4 (*C. martinii* e *C. camphora*), M5 (*C. martinii* e *M. spicata*), M6 (*C. camphora* e *M. spicata*) foi avaliada contra o crescimento de *B. cinerea* pelo método de contato de vapor. A maior atividade antifúngica foi promovida pelos OE de *M. spicata* e *C. martinii* com inibição total do crescimento micelial no volume de 5 µL. Neste estudo nenhuma das misturas apresentou melhor desenvolvimento antifúngico, ou seja, a inibição total do crescimento do fungo em menor concentração quando comparada aos OEs individuais, indicando ausência de sinergia. Portanto, os OEs de *M. spicata* e *C. martinii* podem ser uma alternativa potencialmente eficiente e segura para uso como potenciais fumigantes para o controle de *B. cinerea* em produtos frescos armazenados que são sensíveis a tratamentos de imersão.

Palavras-chave: *Mentha piperita; Cymbopogon martinii; Cinnamomum camphora; Botrytis cinerea*

VAPOR PHASE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR COMBINATIONS AGAINST Botrytis cinerea

Abstract: *Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus that affects various plant species, causing gray rot. The antifungal activity of the *Cymbopogon martinii*, *Cinnamomum camphora*, *Mentha spicata* and *Mentha piperita* essential oils (EOs) and their binary mixtures M1 (*M. piperita* and *C. martinii*), M2 (*M. piperita* and *C. camphora*), M3 (*M. piperita* and *M. spicata*), M4 (*C. martinii* and *C. camphora*), M5 (*C. martinii* and *M. spicata*), M6 (*C. camphora* and *M. spicata*) were evaluated against *Botrytis cinerea* growth by the vapour contact method. The highest antifungal activity was promoted by *M. spicata* and *C. martinii* EOs with total inhibition of mycelial growth at a volum of 5 µL. In this study none of the mixtures showed better antifungal development, that is, the total inhibition of fungal growth in lower concentration when compared to individual EOs, indicating absence of synergy. Therefore, *M. spicata* and *C. martinii* OEs may be a potentially efficient and safe alternative for use as potential fumigants for the control of *B. cinerea* in stored fresh products that are sensitive to dipping treatments.

Keywords: *Mentha piperita; Cymbopogon martinii; Cinnamomum camphora; Botrytis cinerea.*

1. Introdução

O mofo cinza, causado pelo importante fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, resulta em grandes perdas de rendimento em mais de 200 espécies de culturas em todo o mundo, especialmente em culturas econômicas como frutas e hortaliças. O controle efetivo de *B. cinerea* é difícil devido à seus amplos mecanismos de ataque e complexidade da interação hospedeiro-patógeno (WANG at al., 2019).

Tradicionalmente, o controle de fitopatógenos é alcançado pelo uso de fungicidas químicos sintéticos; entretanto, são necessárias alternativas para o controle desses patógenos devido a preocupações crescentes relacionadas ao meio ambiente, a saúde humana e ao uso generalizado e continuado dessas substâncias (PALOU et al., 2016).

Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs), um tipo de óleo volátil extraído de plantas aromáticas, receberam atenção especial por serem geralmente reconhecidos como seguros para consumo humano pelo FDA (BURT, 2004). Os óleos essenciais (OEs) exercem fortes atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, estimulando sua aplicação como antimicrobianos naturais contra patógenos pós-colheita (ASBAHANI et al., 2015).

Considerando que, em alguns casos, são necessárias aplicações em altas concentrações para que o OE tenha um efeito antimicrobiano, seu uso pode ter um impacto negativo nas propriedades sensoriais do alimento. Para evitar esse efeito adverso, vários OEs podem ser misturados para aumentar sua ação antimicrobiana e reduzir as concentrações individuais necessárias para aplicação (RENTSENKHAND et al., 2010). O possível efeito sinérgico produzido pela combinação de óleos essenciais de plantas foi relatado como uma estratégia eficiente para combater a deterioração por fungos durante a pós-colheita de frutas (AGUILAR-GONZÁLEZ, PALOU; LÓPEZ-MALO, 2015).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos OEs de *Cymbopogon martinii, Cinnamomum camphora, Mentha spicata* e *Mentha piperita* e suas misturas binárias contra o crescimento de *B. cinerea* pelo método de contato de vapor.

2. Materiais e Métodos

2.2. Material

Os óleos essenciais (OEs) de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e ho wood (*Cinnamomum camphora*) foram adquiridos da Laszlo Aromaterapia (Belo Horizonte, Brasil). O OE de hortelã verde (*Mentha spicata*) foi adquirido na Ferquima Ind. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil).

2.2.2. Método por exposição aos voláteis

Atividade antifúngica *in vitro* de OEs *M. piperita, C. martinii, C. camphora* e *M. spicata*, individualmente ou em combinações M1 (*M. piperita* e *C. martinii*), M2 (*M. piperita* e *C. camphora*), M3 (*M. piperita* e *M. spicata*), M4 (*C. martinii* e *C. camphora*), M5 (*C. martinii* e *M. spicata*), M6 (*C. camphora* e *M. spicata*) foram testados para avaliar se a combinação de OEs podem apresentar maior atividade no controle de *B. cinerea* pela metodologia de exposição a voláteis.

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de exposição a voláteis, segundo Yun et al. (2013). A inibição do crescimento fúngico foi verificada para diferentes quantidades de OEs individuais e suas misturas (0; 5; 10; 20 e 30 µL), que foram aplicadas em um círculo de papel filtro (20 mm^2), fixado no centro da parte interna da tampa da placa de Petri (90×15 mm), que continha PDA solidificado. O inóculo de *B. cinerea* foi transferido para o centro da placa, a partir de um disco (5 mm de diâmetro) contendo micélio (inóculo). As placas foram mantidas em fotoperíodo de 12h a 25 ° C, com medições do crescimento micelial de cada colônia realizadas a cada 8h, em duas direções perpendiculares (diâmetro em cm). A inibição do crescimento fúngico nas diferentes concentrações de OEs individuais e misturas foi medida pela equação PI (%) = (Controle do Crescimento - Crescimento do Tratamento / Crescimento do Controle) × 100 (Plaza et al., 2004). A Concentração Inibitória Mínima (CIM), quando presente, foi considerada a menor concentração do

tratamento, dentre as concentrações avaliadas, capaz de inibir completamente o desenvolvimento de *B. cinerea*.

2.2.3. Análise estatística

O delineamento experimental foi o de fatorial randomizado, em esquema fatorial 10×6, com dez tratamentos (Controle; *M. piperita; M. spicata; C. martinii, C. camphora* e as misturas binárias) e seis concentrações. O desvio padrão das médias foi calculado e a diferença estatística das médias, no nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foi determinada pelo teste de *Tukey*.

3. Resultados e Discussão

O potencial antifúngico de OEs em fase de vapor, é um propiedade importante que os torna potenciais agentes fumigantes para a preservação de produtos frescos armazenados que são sensíveis a tratamentos de imersão (TZORTZAKIS, 2009), além de minimizar o resíduo de OEs nos alimentos após o tratamento. A Tabela 1 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* e a concentração inibitória mínima dos OEs na fase de vapor. Os OEs de *C. martinii* e *M. spicata* apresentaram a maior eficácia contra *B. cinerea*, com uma taxa de inibição de 100% no volume de 5 µL. Os OEs de *C. camphora* e *M. piperita* apresentaram a menor atividade antifúngica na fase vapor quando comparado aos demais óleos individualmente, com capacidade total de inibição do crescimento micelial no volume de 10 µL. Neste método, a combinação dos OEs também não resultou em aumento da atividade antifúngica e todas as misturas avaliadas apresentaram inibição total do crescimento micelial no volume de 10 µL. O mesmo foi observado por Hossain et al. (2016), em um ensaio de fase de vapor usando OEs de tangerina e eucalipto combinados com OEs de tomilho e orégano, respectivamente, não produziram interação e não resultaram em uma melhora na atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium chrysogenum*.

A eficácia da fase de vapor de OEs contra patógenos de frutos pós-colheita tem sido evidenciada em estudos. As combinações EO de mostarda e cravo-da-índia na fase de vapor inibiram sinergicamente *B. cinerea* em morangos (AGUILAR-GONZÁLEZ, PALOU; LÓPEZ-MALO, 2015). A fase de vapor de *Lippia scaberrima* EO controlou *Colletotrichum gloesporioides* e *Botryosphaeria parma*, patógenos de deterioração pós-colheita em manga (REGNIER ET AL., 2008).

A aplicação dos OEs em combinação, explora a possibilidade de ocorrer efeito sinérgico entre os componentes dos OEs potencializando sua atividade, reduzindo os volumes necessárias de OE para inibir o crescimento total do fungo alvo. No entanto, neste estudo nenhuma das misturas apresentou melhor desenvolvimento antifúngico, ou seja, a inibição total do crescimento do fungo em menor concentração quando comparada aos OEs individuais, indicando ausência de sinergia. Comportamento semelhante foi relatado por Hossain et al. (2016), em um ensaio de fase de vapor usando EO de tangerina e eucalipto, que quando combinados com EO de tomilho e orégano, respectivamente, não produziram interação e não resultaram em uma melhora na atividade antifúngica.

A sinergia é influenciada pelos principais compostos dos óleos essenciais, uma vez que componentes menores podem ter um papel mais crítico nesse efeito, com a atividade dos componentes principais sendo modulada por outras moléculas menores (SAHAF; MOHARRAMIPOUR, 2008). A maior parte da atividade antimicrobiana dos OE parece ser derivada de terpenóides oxigenados, particularmente terpenos fenólicos, fenilpropanóides e álcoois. Outros constituintes, como hidrocarbonetos, que normalmente mostram atividades baixas, podem ser usados em combinações para aumentar suas bioatividades (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Tabela 1. Percentual de inibição do crescimento micelial (PI) de *Botrytis cinerea* após exposição a substâncias voláteis em diferentes volumes (µL) de óleos essenciais (valores médios ± DP, n = 3).

Volume (µL)	OEs PI[1] (%)									
	M. piperita	*C. martinii*	*C. camphora*	*M. spicata*	M1	M2	M3	M4	M5	M6
0	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0^{a}	0,0±0,0a	0,0±0,0^{a}
2,5	26,8±8,9^{b}	51,2±8,3^{b}	41,4±14,4^{b}	57,9±2,9^{b}	29,7±5,5^{b}	36,04±0,0^{b}	24,6±7,9^{b}	7,1±3,2^{b}	17,9±2,3^{b}	5,5±1,4^{b}
5	79,0±7,8^{c}	100,0±0,0^{c}	67,0±4,7^{c}	100,0±0,0^{c}	46,5±3,0^{c}	64,8±2,0^{c}	82,6±12,4^{c}	33,2±1,4^{c}	59,6±2,1^{c}	32,4±5,4^{c}
10	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}
20	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{e}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0d	100,0±0,0^{d}
30	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{c}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{e}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0^{d}	100,0±0,0d	100,0±0,0^{d}
MIC[2]	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10	5< MIC ≤ 10

Nota: [1]PI=porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao tratamento controle. [2]MIC = Intervalo entre concentrações nas quais podem ser encontrados valores de 100% da inibição do crescimento micelial. M1 = mistura binária do OE de *M. piperita* e *C. martinii*, M2 = mistura binária do OE de *M. piperita* e *C. camphora*, M3 = mistura binária 0 do OE de *C. martini* e *C. camphora*, M4 = mistura binária do OE de *M. piperita* e *M. spicata*, M5 = mistura binária do OE de *C. martinii* e *M. spicata*, M6 = mistura binária do OE de *C. camphora* e *M. spicata*. DP = desvio padrão, n = número de repetições utilizadas no experimento. Letras distintas representam uma diferença significativa entre as concentrações de tratamentos pelo teste de Tukey (p <0,05).

4. Conclusões

Foram estudados os efeitos antifúngicos em fase de vapor de quatro óleos essenciais isolados e em combinação contra *B. cinerea*. Com base nos resultados, *C. martinii* e *M. spicata* exibiram a maior atividade antifúngica pelo ensaio de fase de vapor. As combinações dos óleos essenciais não mostraram sinergia significativa na inibição do crescimento de *B. cinerea*. Portanto, esses óleos podem ser uma alternativa potencialmente eficiente e segura para uso como agentes fumigantes no controle de *B. cinerea* na pós-colheita de frutos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (processo 2018/24612-9) e à CAPES pelo apoio financeiro. Os autores Azeredo e Ferreira agradecem ao CNPq por suas bolsas de produtividade em pesquisa (302381/2016-3 e 309043/2016-6, respectivamente).

Referências

AGUILAR-GONZÁLEZ, A. Elena; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. Innovative food science & emerging technologies, v. 32, p. 181-185, 2015.

PALOU, L.; ALI, A.; FALLIK, E.; ROMANAZZI, G. GRAS, plant-and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. Postharvest Biology and Technology, v. 122, p. 41-52, 2016.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. International journal of pharmaceutics, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.

RENTSENKHAND, T. Effect of essential oils and their combinations on food-spoilage microorganisms. 2010. Tese de Doutorado. Thesis]. Szeged: Univ. of Szeged.

YUN, J.; FAN, X.; LI, X.. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and quality maintenance of cherry tomatoes treated with gaseous essential oils. Journal of food science, v. 78, n. 3, p. M458-M464, 2013.

HOSSAIN, F.; FOLLETT, P.; VU, K. D.; HARICH, M.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. Food microbiology, v. 53, p. 24-30, 2016.

REGNIER, T.; DU PLOOY, W.; COMBRINCK, S.; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. Postharvest Biology and Technology, v. 48, n. 2, p. 254-258, 2008.

WANG, M.; DU, Y.; LIU, C.; YANG, X.; QIN, P.; QI, Z.; LI, X. Development of novel 2-substituted acylaminoethylsulfonamide derivatives as fungicides against *Botrytis cinerea*. Bioorganic chemistry, v. 87, p. 56-69, 2019.

SAHAF, B. Z.; MOHARRAMIPOUR, S. Fumigant toxicity of *Carum copticum* and Vitex pseudo-negundo essential oils against eggs, larvae and adults of *Callosobruchus maculatus*. Journal of Pest Science, v. 81, n. 4, p. 213-220, 2008.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R.. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.