Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

Daniele Cristina Fontana

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Daniele Cristina Fontana Engenheira Agrônoma

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

Orientador:

Prof. Dr. DURVAL DOURADO NETO

Co-Orientador:

Prof. Dr. BRAULIO OTOMAR CARON

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Fontana, Daniele Cristina

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais / Daniele Cristina Fontana. - - Piracicaba, 2021.

111 p.

Tese (Doutorado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Pinta preta do tomateiro 2. Biofungicidas 3. Sustentabilidade 4. Tomate 5. Formulação I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por tudo!

E graças a Ele, muitas pessoas boas fizeram parte desta caminhada.

À minha família, aos meus pais, Dirceu e Nires, ao meu irmão Daniel Fontana pelo amor incondicional, e por estarem presentes mesmo a muitos quilômetros de distância.

Ao professor Dr. Durval Dourado Neto pela orientação, direcionamento e suporte necessário para que o período de doutoramento fosse realizado de forma tranquila, leve e de grande crescimento pessoal e profissional. Em seu nome, agradeço as secretárias da diretoria por todo apoio e agilidade em resolver minhas inquietações e desafios, especial agradecimento à Sandra de Marchi Vello.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Esalq/USP, em nome do professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati, que abriu as portas do laboratório para que todas as análises fossem desenvolvidas. Além disso, gratidão por me acolher no seu grupo de pesquisa, colaborar imensamente com cada detalhe das análises, pela amizade e grandes ensinamentos de vida. Aos colegas do laboratório, gratidão pela paciência, amizade e ensinamentos, em especial aos amigos Abel Torres, Mariana Colli e Samuel de Paula.

Às grandes inspirações: professores Dr. Braulio Otomar Caron e Dra. Denise Schmidt por todo apoio, amizade, carinho, cumplicidade e incentivo durante toda caminhada. Agradeço ainda ao Laboratório de Extrativos Aromáticos da UFSM, campus de Frederico Westphalen, por ceder os óleos essenciais utilizados, em especial ao Matheus Pretto Milani por toda ajuda na realização deste trabalho. Ao professor Marcio Mazuti que sempre esteve disponível para auxílio nos experimentos. Aos amigos Tiago Olivoto, Maria Inês Diel e Eduardo Engel, por todo auxílio estatístico.

Ao Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal da Esalq/USP por todo suporte, em especial ao professor Dr. Paulo Mazaffera e ao Técnico Edson de Moraes, pelo auxílio nas análises enzimáticas e pelos ensinamentos adquiridos. Aos colegas de laboratório que sempre foram tão especiais, amigáveis, tornando esse período de doutoramento leve e divertido.

À Maria Heloisa Duarte de Moraes por permitir o uso de seu laboratório para a produção de esporos que utilizamos no projeto de pesquisa. Ao professor Tiago Osorio Ferreira (Laboratório de Geoquímica do Solo) por permitir uso de seu laboratório e equipamentos para formulação dos fungicidas. À professora Lilian Amorim, que além de ser inspiração, colaborou com ideias e discussões pertinentes.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp de Sorocaba, em especial ao professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Dr. Jhones de Oliveira, pela grande parceria na determinação da estabilidade físico-química das formulações, e por estarem prontamente disponíveis para contribuir com nosso trabalho.

Às amigas de prédio por se tornarem minha família. Agradeço todas as pessoas especiais que conheci em Piracicaba (SP), e que tornaram meus dias mais leves, felizes e únicos. A todos, que de uma forma ou outra contribuíram para que a tese fosse concluída: muito obrigada!

EPÍGRAFE

"Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica:

a vontade"

Albert Einstein

e a Fé.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS	12

RESUMO

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

A cultura de tomate está entre as principais commodities agrícolas brasileiras, e figura entre as principais hortaliças cultivadas do mundo. Embora com elevada importância econômica, a cultura apresenta suscetibilidade a um amplo espectro de pragas e doenças. Doenças como a pinta preta de tomateiro, ocasionada pelo fungo Alternaria spp. podem reduzir a produtividade da cultura, e gerar perdas substanciais quando não controlada. Existem no mercado grande número de produtos recomendados para seu controle, e aproximadamente 35% do número total de produtos para a cultura são recomendados para controle da Alternaria. Problemas ambientais, contaminação alimentar, resistência microbiana aos ingredientes ativos já existentes são alguns dos motivos que impulsionam pesquisas com novas estratégias de manejo. Neste sentido, formulações com óleos essenciais oriundos de plantas aromáticas poderiam contribuir para uma agricultura eficiente e sustentável, caso atrelada a técnicas de agricultura "nano". Diante disso, o objetivo deste trabalho foi utilizar a nanotecnologia para desenvolver formulações de fungicidas a partir de óleos essenciais, para controle da pinta preta de tomateiro. Os experimentos foram desenvolvidos na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" durante os anos de 2019 a 2021. Primeiramente os óleos essenciais foram avaliados quanto ao seu efeito direto na inibição do crescimento micelial de isolados de Alternaria spp., e caracterizados quimicamente quanto à sua composição. Os óleos essenciais promissores foram testados para o controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa de vegetação. Após seleção do óleo essencial promissor desenvolveram-se as nanoformulações, gerando 37 produtos, e estes foram testados quanto a sua eficiência no controle de Alternaria linariae in vitro, e da doença em tomateiro. Os resultados de eficiência das nanoformulações foram analisadas estatisticamente e selecionadas para as análises de caracterização e estabilidade físico-química e atividade bioquímica. Os óleos essenciais A, B, C e E apresentaram controle do crescimento micelial de isolados de Alternaria spp. em baixas doses. Os óleos essenciais possuem satisfatório controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa-de-vegetação na dose de 2,5 µL mL⁻¹. As nanoformulações a partir do óleo essencial E controlaram eficientemente a Alternaria spp. em condições in vitro, e a doença na planta. As formulações 1, 5, 9, 10 e 18 apresentaram tamanho médio inferior a 300 nm, sem que ocorressem grandes alterações na sua composição físico-química até 150 dias de armazenamento, demonstrando estabilidade de prateleira. A formulação 9 se destacou devido às suas características de tamanho, polidispersão, potencial zeta e concentração de partículas. As formulações 1, 9, 10 e 23 induziram resistência em tomateiro, auxiliando na ativação inerente da planta contra a pinta preta de tomateiro, através das enzimas guaiacol peroxidase e β, 1-3 glucanase. As nanoformulações desenvolvidas recebem destaque, pois os produtos desenvolvidos são altamente eficazes no controle da pinta preta de tomateiro atuando através do controle direto e indução de resistência. Além disso, fungicidas desenvolvidos a partir óleos essenciais garantem a sustentabilidade do sistema de manejo de plantas, contribuindo substancialmente na oferta de alimento seguro para futuras gerações.

Palavras-chave: Sustentabilidade, Formulação, Biofungicidas, Compostos naturais, Pinta preta de tomateiro, *Alternaria* spp.

ABSTRACT

Nanoformulation of fungicides from essential oils

The tomato crop is among the main Brazilian agricultural commodities, and is among the main cultivated vegetables in the world. Although of high economic importance, the crop is susceptible to a wide spectrum of pests and diseases. Diseases such as the black spot of tomato, caused by the fungus Alternaria spp. they can reduce the productivity of the crop, and generate substantial losses when not controlled. There are a large number of products recommended for your control on the market, and approximately 35% of the total number of products for culture are recommended for control of Alternaria. Environmental problems, food contamination, microbial resistance to existing active ingredients are some of the reasons that drive research with new management strategies. In this sense, formulations with essential oils from aromatic plants could contribute to an efficient and sustainable agriculture, if linked to "nano" farming techniques. Therefore, the objective of this work was to use nanotechnology to develop fungicide formulations from essential oils, to control the black spot of tomato. The experiments were carried out at the "Luiz de Queiroz" College of Agriculture during the years 2019 to 2021. Firstly, essential oils were evaluated for their direct effect on inhibiting the mycelial growth of Alternaria spp. its composition. The promising essential oils were tested to control the black spot of tomato in greenhouse conditions. After selecting the promising essential oil, nanoformulations were developed, generating 37 products, and these were tested for their efficiency in controlling Alternaria linariae in vitro, and the disease in tomato plants. The efficiency results of the nanoformulations were analyzed statistically and selected for the analysis of characterization and physical-chemical stability and biochemical activity. Essential oils A, B, C and E showed mycelial growth control of Alternaria spp. in low doses. The essential oils have satisfactory control of the black spot of the tomato under greenhouse conditions at a dose of 2.5 µL mL⁻¹. Nanoformulations from essential oil E efficiently controlled Alternaria spp. in vitro conditions, and the disease in the plant. Formulations 1, 5, 9, 10 and 18 showed an average size of less than 300 nm, without major changes in their physical-chemical composition until 150 days of storage, demonstrating shelf stability. Formulation 9 stood out due to its characteristics of size, polydispersity, zeta potential and particle concentration. Formulations 1, 9, 10 and 23 induced resistance in tomato plants, assisting in the plant's inherent activation against tomato black spot, through the enzymes guaiacol peroxidase and β , 1-3 glucanase. The developed nanoformulations are highlighted, since the products developed are highly effective in controlling the black spot of tomato, acting through direct control and resistance induction. In addition, fungicides developed from essential oils ensure the sustainability of the plant management system, contributing substantially to the provision of safe food for future generations.

Keywords: Sustainability, Formulation, Biofungicides, Natural compounds, Black spot of tomato, *Alternaria* spp.

1 INTRODUÇÃO

A produção de tomate alcançou uma área total de 55,6 mil ha no Brasil no ano de 2020, e aproximadamente 65% desta área é destinada para cultivo de tomate de mesa. Neste mesmo ano, a produção foi de 3,9 milhões de toneladas e embora apresente redução da área plantada e da produção, o rendimento por área tem aumentado nos últimos anos (IBGE, 2021).

A cultura de tomate é afetada por diversas doenças, dentre elas está a pinta preta ocasionada por fungos do gênero *Alternaria*, sendo uma das mais comuns e que vem ocasionando redução no rendimento e na qualidade da produção agrícola. A *Alternaria solani*, como é amplamente conhecida, foi reclassificada para *Alternaria linariae*, espécie predominante na cultura de tomate (WOUDENBERG et al., 2014).

O controle de doenças de plantas ocorre principalmente através do controle químico, no entanto, sua utilização de forma indiscriminada pode resultar em poluição ambiental, seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos utilizados (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018), além de colocar em risco a saúde do agricultor e também do consumidor final (GAUR; SHARMA, 2010). Dessa forma, buscamos na natureza produtos menos tóxicos e eficientes no controle de doenças de plantas.

Uma alternativa é o uso de óleos essenciais. Os óleos essenciais (EO) são naturais produzidos pelo metabolismo secundário em plantas aromáticas, contendo compostos aromáticos voláteis (ABD EL-GAWAD, 2016), altamente antimicrobianos e biologicamente ativos. Além disso, os óleos essenciais vem ganhando destaque na agricultura, pois possuem características importantes como atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida.

Para fungos do gênero *Alternaria*, os óleos essenciais podem reduzir/inibir o crescimento micelial, produção e germinação de esporos, prejudicando a morfologia e integridade das membranas (WAN et al., 2019), além de promover ativação de mecanismos de defesa da planta contra os patógenos (STANGARLIN et al., 2011). A ativação destes mecanismos envolve principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), metabolismo oxidativo e alterações estruturais (MURPHY, 2013).

A aplicação de óleos essenciais em plantas pode ser prejudicada devido a sua alta volatilidade, baixa estabilidade e solubilidade em água, rápida degradação e dificuldade de atravessar membranas, o que prejudica sua performance em aplicações (BONIFÁCIO et al., 2014). Para melhorar a eficiência de formulações com óleos essenciais, têm sido utilizadas abordagens novas como a nanotecnologia. Exemplo positivo pode ser observado no trabalho

de Mossa et al. (2021), que verificaram eficiência de controle de uma doença do pepino causada pelo fungo *Alternaria*, utilizando nanoemulsões dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Nigella sativa*.

Devido ao fato da cultura de tomate ser economicamente importante para o mundo, e pela busca por ferramentas mais sustentáveis no controle de doenças comuns, como a pinta preta de tomateiro estar aumentando, nossa linha de pesquisa recebe impulso inovador. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi responder as seguintes perguntas:

- (i) Os óleos essenciais inibem o crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp.?
- (ii) Os óleos essenciais são eficientes no controle da pinta preta em plantas de tomate?
- (iii) Nanoformulações de fungicidas com óleo essencial são eficientes no controle de *Alternaria* spp. *in vitro* e da pinta preta em plantas de tomateiro?
- (iv) As nanoformulações desenvolvidas a partir de óleo essencial apresentam estabilidade físico-química?
- (v) As nanoformulações promovem indução de resistência contra a pinta preta de tomateiro?

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais A, B, C e E apresentam controle do crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. em baixas doses. Os óleos essenciais possuem satisfatório controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa-de-vegetação na dose de 2,5 µL mL⁻¹.

As nanoformulações a partir do óleo essencial E controlam eficientemente o isolado III de *Alternaria* spp. em condições *in vitro*, e a doença na planta. As formulações 1, 5, 9, 10 e 18 apresentam tamanho médio inferior a 300 nm, sem que ocorram grandes alterações na sua composição físico-química até 150 dias de armazenamento, demonstrando estabilidade de prateleira. A formulação 9 se destaca devido às suas características de tamanho, polidispersão, potencial zeta e concentração de partículas. As formulações 1, 9, 10 e 23 induzem resistência em plantas de tomateiro, auxiliando na ativação inerente da planta contra a pinta preta de tomateiro.

As formulações desenvolvidas a partir dos óleos essenciais recebem destaque, pois os óleos são considerados como fonte de origem natural para o desenvolvimento de biofungicidas, atuando tanto na defesa direta do hospedeiro quanto na indução de resistência. Diante do exposto, todas as hipóteses foram aceitas e acredita-se fielmente na prospecção destas tecnologias, colaborando para a sustentabilidade do sistema de produção.

REFERÊNCIAS

ABD EL-GAWAD, A. M. Chemical constituents, antioxidant and potential allelopathic effect of the essential oil from the aerial parts of *Cullen plicata*. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 36-41, 2016.

BONIFÁCIO, B. V. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

GAUR, R. B.; SHARMA, R. N. Biocontrol of root rot in cotton and compatibility of potential bioagents with fungicides. **Indian Journal of plant protection**, v. 38, n. 2, p. 176-182, 2010.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>. Acesso em: 10 jan. 2021.

MOSSA, A. T. H. *et al.* Development of eco-friendly nanoemulsions of some natural oils and evaluating of its efficiency against postharvest fruit rot fungi of cucumber. **Industrial Crops and Products**, v. 159, p. 113049, 2021.

MURPHY, M. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum Cell Metabolism. **Cell Press**, v. 18, 2013.

SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Volume 1. Princípios e conceitos.** Editora Ceres LTDA: Piracicaba, 2018.

STANGARLIN, J. R. *et al.* Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex**, v. 2, p. 1033-1042, 2011.

WAN, J. *et al.* Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, p. 199-206, 2019.

WOUDENBERG, J. H. C. *et al.* Large-spored Alternaria pathogens in section Porri disentangled. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 1-47, 1 set. 2014.