

POTENCIAL DOS FUNGICIDAS DO GRUPO DOS DITIOCARBIMATOS NO CONTROLE DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Lucas F. Silva¹, Laércio Zambolim², Antonio E. C. Vidigal³, Mayura M. M. Rubinger².

Trabalho financiado pelo CBPD do Café, Cnpq, Fapemig, Capes.

¹Estudante de doutorado, Depart. de Fitopatologia, UFV, Viçosa, MG, 36570 900.

²Professor, PhD, BIOAGRO/BIOCAFÉ, UFV, Viçosa, MG, 36570 900.

²Professor, PhD, Depart. de Química, UFV, 36570 900.

³Pesquisador Depart. de Química, UFV, Viçosa, MG, 36570 900.

RESUMO: A ferrugem-do-cafeieiro causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. é uma doença altamente destrutiva e de difícil controle. Como as variedades cultivadas são suscetíveis, há a necessidade de se encontrar moléculas químicas eficientes, para a redução dos danos causados por essa doença. A prioridade é encontrar principalmente moléculas que atuam como fungicidas protetores ou residuais, visando não só o manejo eficiente das doenças, mas também na prevenção do surgimento de mutantes resistentes, na população do patógeno. Diante desses fatos esse trabalho teve por objetivo, avaliar o comportamento de moléculas do grupo ditiocarbimato no controle da ferrugem-do-cafeieiro. As moléculas 1A, 2A, 1B e 2B ("1" = 4-clorofenila, "2" = grupo metila); ("A" = cátion tetrafenilfôsfônio, "B" = cátion tetrabutilamônio), representantes dos ditiocarbimatos foram sintetizadas e submetidas a testes de sensibilidade para obtenção da concentração inibitória de 90% da germinação dos uredosporos (IC₉₀). Os valores de IC₉₀ similares obtidos pela análise de regressão logística entre os ditiocarbimatos e o controle positivo mancozebe, possibilitaram o desdobramento para realização de experimentos em casa-de-vegetação. Os componentes epidemiológicos sob condições controladas foram estimados e as médias submetidas ao teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa para as variáveis respostas número de lesão/cm², AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) e produção de esporos nas pústulas entre os compostos 1A, 2A, 1B e o controle padrão mancozeb. A molécula 2A e mancozebe apresentaram desempenho similar não havendo diferença significativa para as variáveis número de pústulas/cm², AACPD e eficiência de controle. Conclui-se que, dentro do grupo do ditiocarbimato, há moléculas com eficiência de controle similar ao produto padrão (mancozebe), para a ferrugem-do-cafeieiro. As moléculas 1A, 2A e 1B foram mais eficientes para o controle da doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Hemileia vastatrix*, Controle químico, Tetrafenilfôsfônio, Tetrabutilamônio.

Potential of ditiocarbimate fungicide group to control of coffee leaf rust

ABSTRACT: Coffee rust caused by *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. is a highly destructive and difficult to control. As cultivated varieties are susceptible, there is a need to find efficient chemical molecules, to reduce the damage caused by the disease. The priority is to find molecules that act as protective or residual fungicides, aiming to manage the disease but also to prevent the emergence of resistant mutants in the pathogen population. In view of these facts, this work aimed to evaluate the behavior of molecules of the dithiocarbimate group in the control of coffee rust. Molecules 1A, 2A, 1B and 2B ("1" = 4-chlorophenyl, "2" = methyl group); ("A" = tetraphenylphosphonium cation, "B" = tetrabutylammonium cation), dithiocarbimate representatives were synthesized and subjected to sensitivity tests to obtain the 90% inhibitory concentration of uredospores (IC 90) germination. The similar IC90 values obtained by the logistic regression analysis between the dithiocarbimates and the positive control mancozeb, enabled the unfoldment to perform experiments in greenhouse. Epidemiological components under controlled conditions were estimated and means were submitted to the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). There was no significant difference in the number of lesions / cm² responses, AACPD (area below the disease progress curve) and spore production in the pustules between compounds 1A, 2A, 1B and the standard mancozeb control. The molecule 2A and mancozeb presented similar performance, with no significant difference for the number of pustules / cm², AACPD and control efficiency. It is concluded that, within the dithiocarbimate group, there are molecules with control efficiency similar to the standard product (mancozeb) for coffee rust. The molecules 1A, 2A and 1B were more efficient for the control of the disease.

KEY WORDS: *Hemileia vastatrix*; Chemical control; Tetrafenilfôsfônio; Tetrabutilamônio.

INTRODUÇÃO

Os defensivos visam manter o potencial de produtividade das culturas agrícolas. A ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) causa danos na produção em cerca de 50% (Zambolim, 2016). Para o controle da ferrugem-do-cafeieiro as estratégias são baseadas no uso de fungicidas triazóis formulados com estrobilurinas combinadas com fungicidas multi-sítios cúpricos. A utilização de fungicidas multi-sítios tornou-se indispensável para reduzir a pressão de seleção dentro

da população do patógeno. Inúmeros relatos de resistência múltipla aos grupos triazóis, estrobilurinas e dicarboximidas constam na literatura (Twizeyimana *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018). Atualmente, as empresas estão recorrendo a fungicidas multi-sítios desenvolvidos na década de 1950-60 (Zambolim, 2016). Diversos trabalhos de pesquisas têm evidenciado *in vitro*, o fato de novas moléculas pertencentes ao grupo dos ditiocarbimatos inibirem o crescimento micelial de fungos das espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea* (Oliveira *et al.*, 2015). O grupo ditiocarbimato é análogo aos ditiocarbamatos, porém não possui formulação comercial. Já os ditiocarbamatos são amplamente utilizados na agricultura e o principal representante é o mancozebe (Zambolim *et al.* 2008). Tais grupos diferem quimicamente apenas pela existência de uma ligação dupla entre os átomos de carbono e nitrogênio. Os ditiocarbimatos são compostos promissores, devido ao fato de apresentar modo de ação multi-sítio que se destinam ao controle de doenças isoladamente ou para compor formulações com fungicidas sistêmicos para o controle de doenças em plantas. O primeiro trabalho, envolvendo esse grupo de compostos químicos, no controle de doenças foi feito por Vidigal *et al.* (2019). Os autores relataram pela primeira vez o efeito de ditiocarbimatos inéditos, sobre a germinação de uredosporos de *H. vastatrix*; entretanto os experimentos foram restritos a ensaios *in vitro* e não é conhecido a eficiência de controle desse grupo de fungicida *in vivo* em condições controladas. Esse trabalho se justifica, devido ao fato da ferrugem-do-cafeeiro apresentar grande potencial em causar dano. Além disso, há grande necessidade de se encontrar novas moléculas de fungicidas protetores, para serem empregados em mistura com sistêmicos e mesostêmicos, visando reduzir as chances do surgimento de mutantes resistentes, aos fungicidas como mecanismo de ação específicos empregados no controle da ferrugem. Diante desses fatos, este trabalho teve por objetivo, avaliar a sensibilidade e o efeito de fungicidas ditiocarbimatos sobre os componentes epidemiológicos do patossistema café x *H. vastatrix*.

MATERIAL E MÉTODOS

A síntese dos 4 ditiocarbimatos foi constituída por duas etapas seguindo os procedimentos descritos por Amin (2011). A primeira etapa consistiu da produção dos precursores dos ditiocarbimatos de potássio. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10000 µmol de metanossulfonamida ou de 4-clorobenzenossulfonamida, 20 mL de *N,N*-dimetilformamida, 0,60 mL de dissulfeto de carbono (10000 µmol) e 1,32 g de KOH (20000 µmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação até o consumo de KOH, indicando o fim da reação. Em seguida, foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e o balão foi colocado em banho de gelo. Os precipitados amarelos resultantes da reação foram filtrados, posteriormente lavados com etanol, acetato de etila e éter dietílico. Logo após, os precipitados foram deixados em um dessecador por 24 horas. Ao final desta reação foram obtidos como produtos o metilsulfonilditiocarbimato de potássio e o 4-clorofenilsulfonilditiocarbimato de potássio. A segunda etapa consistiu na estabilização dos ditiocarbimatos a partir da formação de complexos de zinco. Para realizar a síntese dos complexos de zinco foram adicionados em um balão de fundo redondo 1000 µmol do ditiocarbimato de potássio, 20 mL de solução MeOH/H₂O (1:1 v/v) 500 µmol de sulfato de zinco dissolvido em 4 mL de H₂O. A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 1 hora. Em seguida foi adicionado 1000 µmol do cloreto de tetrafenilfôsfônio ou brometo de tetrabutilamônio dissolvido em água, gota a gota. O precipitado formado foi filtrado em um funil de placa porosa de porcelana, lavado 5 vezes e posteriormente foi seco sob pressão reduzida por 24hs. Os uredosporos de *H. vastatrix* foram produzidos em café da variedade Caturra e foram mantidos em dessecador à 5°C e 50% de umidade e a outra parte em ultra-freezer a – 80°C. Para o estudo da sensibilidade de *H. vastatrix* aos ditiocarbimatos foram realizados dois experimentos *in vitro* num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições sendo os tratamentos constituídos por mancozebe (Sigma Aldrich®) e quatro ditiocarbimatos Figuras 1A, 2A, 1B e 2B) nas concentrações de 0,5, 5,0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹, respectivamente além dos controles com meio ágar-água, DMSO a 0,5% (v/v) e Tween 80 a 0,5% (v/v). As moléculas dos ditiocarbimatos (0,01 g) foram preparadas e dissolvidas em 10 mL de diclorometano e, o volume correspondente a cada concentração foi transferido para balões de 50 mL. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A cada balão foram adicionados DMSO e Tween 80, na concentração de 0,5% (v/v), respectivamente. Essas soluções foram homogeneizadas em meio ágar-água a 2% e as misturas foram distribuídas em placas de Petri 60 x 15 mm. Uma alíquota de 0,1 mL de 10⁵ uredosporos.mL⁻¹ de *H. vastatrix* foi espalhada em cada placa com auxílio de uma alça de drigalsk. As placas foram mantidas a 25°C, sob escuro contínuo em câmara tipo BOD por 24 horas. Após esse período, aleatoriamente foi avaliada a germinação de 100 uredosporos por placa, empregando-se microscópio óptico no aumento de 400 vezes. Os valores médios, referentes ao experimento de sensibilidade *in vitro* foram coletados para o cálculo da percentagem de inibição da germinação dos uredosporos, por meio da equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{G_c - G_i}{G_c} \right) * 100, \text{ onde:}$$

G_c = Esporos germinados no tratamento controle com DMSO e Tween 80.

G_i = Germinação total de cada observação.

Para estudar o efeito dos ditiocarbimatos nos componentes epidemiológicos da ferrugem-do-cafeeiro realizaram-se testes envolvendo a ferrugem-do-cafeeiro utilizou-se mudas de café da variedade Caturra com 4 meses de idade, após a semeadura. Foram realizados dois experimentos *in vivo* em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, tendo cada uma três vasos de 3 dm³ com três plantas. Os tratamentos foram constituídos pelas moléculas das Figuras 1A, 2A, 1B, 2B dos ditiocarbimatos e do fungicida mancozebe. Para a avaliação das moléculas sobre *H.*

vastatrix a concentração do mancozebe foi de 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Empregou-se dois controles negativos sendo um com água e o outro o adjuvante Haiten (Arysta®) na dose de 0,1 mL.L^{-1} . Portanto em ambos os experimentos empregaram-se sete tratamentos e três repetições. No experimento as moléculas químicas foram aplicadas na face abaxial de plantas de café, até antes do ponto de escorrimento no 3º e 4º par de folhas, com auxílio de uma atomizador manual de 100 mL de capacidade. Após 24 horas, as plantas foram inoculadas por aspersão, utilizando-se De vilbiss n. 15, com uma suspensão na concentração de 10^5 uredosporos. mL^{-1} sendo mantidas por 48 horas no escuro, em câmara úmida a 22°C. Após esse período as plantas foram incubadas em câmara a 22°C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias, 18 dias após a inoculação. As variáveis respostas avaliadas foram: Período de Incubação (PI), Período Latente (PL), Produção de Esporos (PE), Número de lesões sem esporulação (LSE), Número de lesões (LE) e Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados obtidos para o experimento de sensibilidade foram transformados em $\log(x)$ e em seguida submetidos a análise de regressão logística para obtenção da concentração inibitória de 90% (IC_{90}) dos uredosporos de *H. vastatrix*. Os dados para a obtenção dos componentes epidemiológicos da ferrugem-do-cafeiro foram submetidos a análise de variância. Em seguida, realizou-se o agrupamento das médias através do teste de Scott-Knott. Todas as análises foram feitas no software R (R Core Team 2013) usando os pacotes: readr, readxl, plyr, dplyr, drc, stats e easyanova.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na síntese dos ditiocarbimatos o ponto de fusão e espectros vibracionais de infravermelho das moléculas dos ditiocarbimatos estão de acordo com os encontrados por Amin (2011), sendo portanto confirmada a obtenção das moléculas de ditiocarbimatos. Para o estudo da sensibilidade de *H. vastatrix* aos ditiocarbimatos as curvas do modelo Logístico foram ajustadas e em seguida foram obtidos os valores de IC_{90} para cada composto (Figura 1A, 2B, 1B, 2B). Todas as moléculas dos ditiocarbimatos propostos neste trabalho apresentaram efeitos inibitórios a *H. vastatrix*. Os menores valores de IC_{90} foram obtidos para o tratamento controle positivo mancozeb (11.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Dentre as moléculas do grupo “B” o menor valor de IC_{90} foi do tratamento 1B (15.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e para as moléculas do grupo “A” o menor IC_{90} foi obtido para o tratamento 1A (80.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Para a variável $\text{IC}_{90\text{comb}}$ (média do IC_{90} dos dois experimentos) não houve diferença significativa entre os tratamentos das moléculas do grupo B (1B e 2B) com o controle mancozeb. Entretanto, os tratamentos do grupo B (1B, 2B) e mancozeb diferiram das moléculas do grupo “A”. Houve diferença significativa entre as moléculas 1A e 2A (Tabela 1). Na Figura 2 encontram-se o resultado dos componentes epidemiológicos quando plantas de café da variedade Caturra foram inoculadas com uredosporos de *H. vastatrix*. O período de incubação (PI) para o tratamento controle com água foi o menor com 16 dias. Enquanto, os maiores valores foram para os compostos mancozeb, 2A e 2B, que expressaram sintomas com 24 dias. Todos tratamentos diferiram do controle com água. O PI das moléculas dos ditiocarbimatos não diferiram significativamente do controle padrão mancozeb (Figura 2). Para o período latente (PL) o menor valor, 19 dias foi obtido no tratamento controle com água diferindo significativamente dos demais tratamentos. Não houve diferenças dos valores obtidos do PL entre as moléculas dos ditiocarbimatos e o controle com mancozeb (Figura 2). Para a variável lesão esporulada (LE), o tratamento controle com água apresentou média de 149 lesões/folha, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A média para a molécula 2B foi estimada em 25,0 lesões/folha, diferindo significativamente dos tratamentos 1A, 1B, 2B e o mancozeb. Os tratamentos 1A, 1B, 2B e o mancozeb não diferiram significativamente entre si. Em relação à variável lesão sem esporulação (LSE), o tratamento controle com água apresentou valor médio de 247,0 lesões/folha, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A média para o tratamento 2B foi estimada em 27,3 lesões/folha, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os menores valores médios foram obtidos pelo tratamento mancozeb (1,3) e a molécula 1B (1,0). As estimativas para AACPD demonstraram que o tratamento controle com água diferiu significativamente dos demais, obtendo um valor médio de 1843,5. O tratamento 2B obteve média de 175,33 e diferiu significativamente dos demais compostos. Os compostos 1A, 1B, 2A e mancozeb não diferiram significativamente entre si (Figura 6). Os resultados referentes a variável produção de esporos (PE), apresentou diferença significativa do controle com água (média = 3770 uredosporos. mL^{-1}), para os demais tratamentos. O tratamento 2B obteve média estimada de 145,60 uredosporos. mL^{-1} , respectivamente e diferiu significativamente dos demais compostos. Os tratamentos 1A, 1B, 2A e mancozeb não diferiram significativamente entre si (Figura 2).

Figura 1. Curvas de da inibição da germinação dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* e IC_{90} .

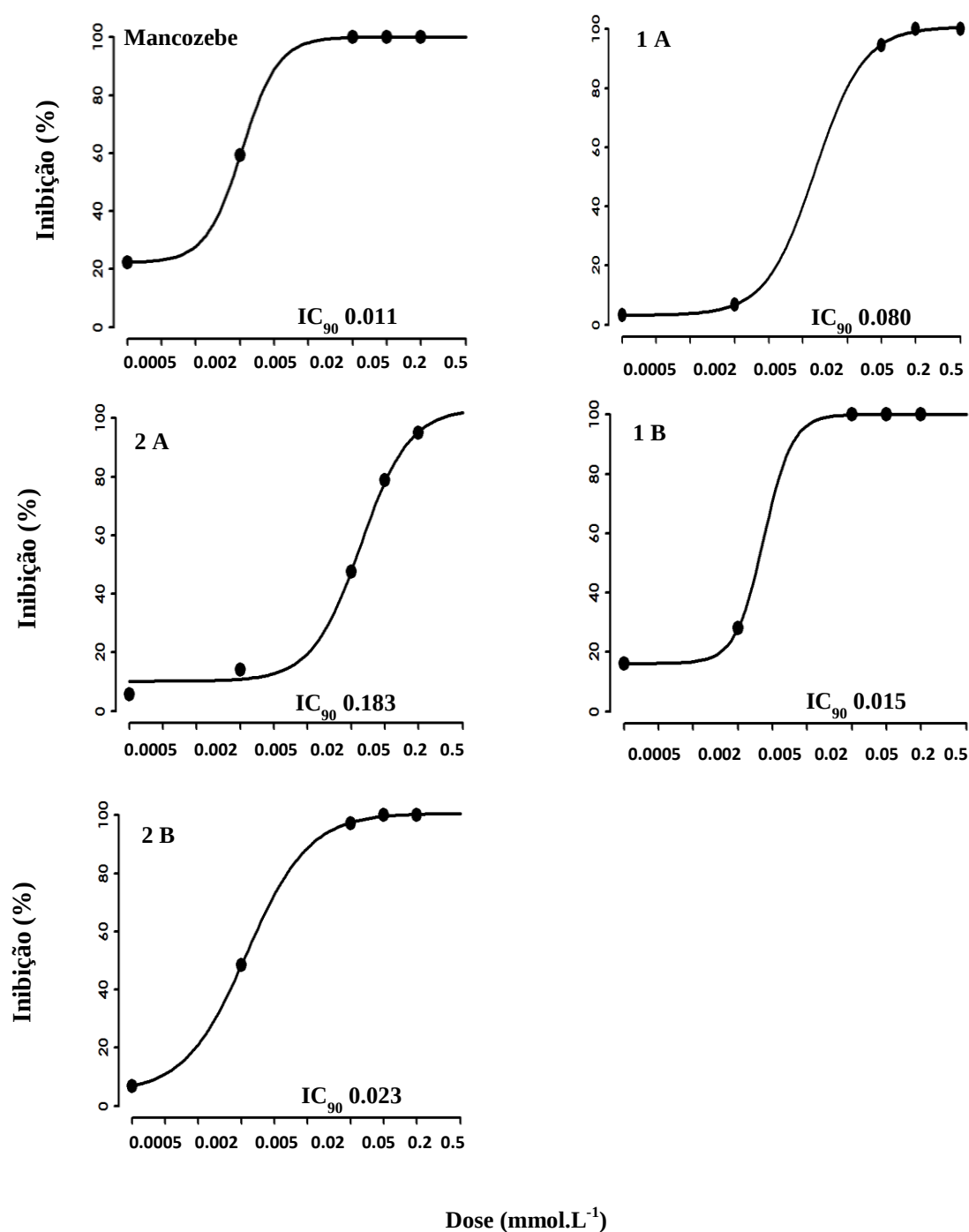
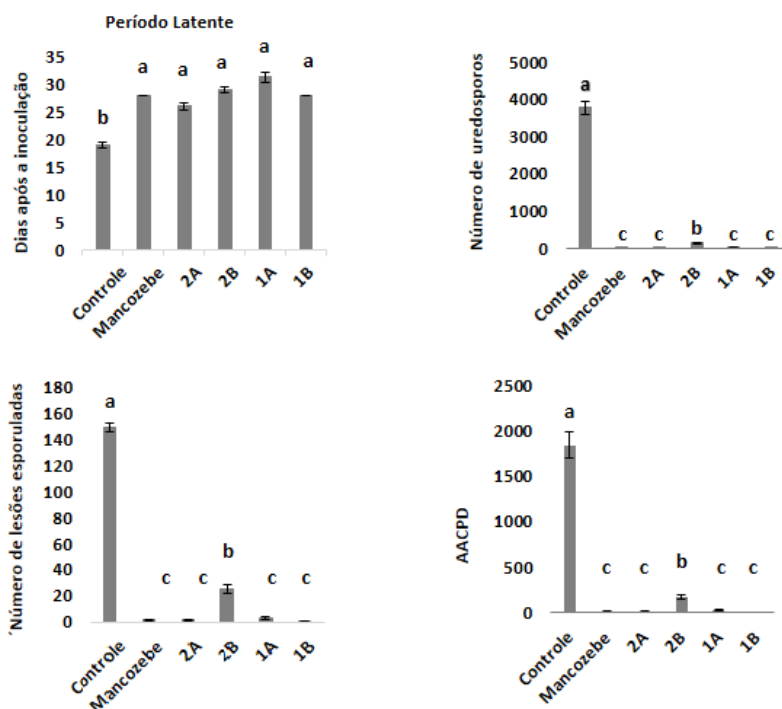


Tabela 1. Valores de IC_{90} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para *H. vastatrix* e modelo Logístico $f(y) = c \cdot \{1 - \exp(b(\log(x) - \log(e)))\}$.

Molécula	Parâmetros	R ²	IC ₉₀
Mancozebe	b=-2.7; c= 2.2; d=100.0; e=0.005	0.983	0.011
1 A	b=-2.0; c= 3.1; d=100.0; e=0.026	0.997	0.080
1 B	b=-3.5; c= 24.6; d=100.0; e=0.008	0.965	0.015
2 A	b=-1.9; c= 10.1; d=100.0; e=0.060	0.975	0.183
2 B	b=-1.5; c= 04.4; d=100.0; e=0.005	0.952	0.023

IC₉₀: Concentração inibitória capaz de inibir a germinação de 90% dos uredosporos de *H.vastatrix* mmol.L^{-1} ; R²: Coeficiente de determinação ajustado; (*): Parâmetros diferentes de 0 pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 2. Efeitos dos ditiocarbimatos a $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sobre as variáveis epidemiológicas da FC. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



CONCLUSÕES

- 1 - Os compostos do grupo ditiocarbimato constituem mais uma opção para o controle da ferrugem-do-cafeeiro;
- 2 - Os ditiocarbimatos apresentam eficiência comparável ao produto padrão mancozeb;
3. As moléculas 1A, 2A e 1B foram as mais eficientes para o controle da ferrugem-do-cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amim RS, Oliveira MRL, Janczak J, Rubinger MMM, Vieira LMM, Alves LC, Zambolim L. (2011) Syntheses, characterization, crystal structure and antifungal activity of four tetraphenylphosphonium bis (N-R-sulfonyldithiocarbimato zincate(II) salts. *Polyhedron* 30:683–689. DOI: 10.1016/j.poly.2010.12.003.
- Oliveira AA, Oliveira MRL, Rubinger MMM, Pilóla EL, Meneses DC and Zambolim L. (2015). Bis(4-fluorophenylsulfonyldithiocarbimato) zincate(ii) salts: new antifungals for the control of Botrytis blight *Quimica Nova* 757-761 DOI/10.5935/0100-4042.20150075.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F and Stammeler G (2018). First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis Prot* 125:21–26. DOI: 10.1007/s41348-017-0117-5.
- Twizeyimana M, Hartman GL (2017). Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates to fungicides and reduction of fungal infection based on fungicide and timing of application. *Plant Disease* 101:121–128. DOI: 10.1094/PDIS-04-16-0552-RE.
- Vidigal, AEC, Rubinger, MMM, Queiroz, LF, Silva. LF, Zambolim, L, Guilardi, S, Souza, RAC, Ellena, J, Wetlera, EB, Oliveira, MRL (2019). Nickel complexes with phosphines and N-R-sulfonyldithiocarbimato ligands: New antifungals for the control of *Hemileia vastatrix* and *Phakopsora pachyrhizi*. *Inorganica Chimica Acta*, 486:724-732. DOI//10.1016/j.ica.2018.11.037.
- Zambolim, L, Picanço, MC, Silva, AA, Ferreira, L, Ferreira, FA, Jesus Junior, WC. Produtos fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2008. 652 p.
- Zambolim L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop Plant Pathol.* 41:1–8. DOI: 10.1007/s40858-016-0065-9.