

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CAMPUS DE FREDERICO WESTPHALEN**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS E AMBIENTAIS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Eduardo Michelotti Balem**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DE ÓLEOS ESSENCIAIS E  
PRODUTOS QUÍMICOS SOBRE *Alternaria alternata***

**Frederico Westphalen, RS**

**2021**

**Eduardo Michelotti Balem**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DE ÓLEOS ESSENCIAIS E PRODUTOS  
QUÍMICOS SOBRE *Alternaria alternata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *campus* de Frederico Westphalen, RS, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Engenheiro Agrônomo.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Kulczynski

Frederico Westphalen, RS  
2021

**Eduardo Michelotti Balem**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DE ÓLEOS ESSENCIAIS E PRODUTOS  
QUÍMICOS SOBRE *Alternaria alternata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *campus* de Frederico Westphalen, RS, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Engenheiro Agrônomo**.

**Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021:**

---

**Stela Maris Kuczynski, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Gizelli Moiano de Paula, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Axel Bruno Mariotto, Eng<sup>o</sup> (UFSM)**

Frederico Westphalen, RS  
2021

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e por tudo que ele me proporciona. A toda minha família que sempre me apoiou em todas as decisões. A universidade e aos professores pela oportunidade de um ensino superior de qualidade e a todo o pessoal que participou e participa do laboratório de Fitopatologia da UFSM campus Frederico Westphalen do qual eu fui voluntário durante os anos de graduação.

## RESUMO

### ATIVIDADE ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DE ÓLEOS ESSENCIAIS E PRODUTOS QUÍMICOS SOBRE *Alternaria alternata*

AUTOR: Eduardo Michelotti Balem  
ORIENTADOR: Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Kulczynski

A mancha de alternaria é causada pelo fungo *Alternaria alternata* (PERES et al., 2003) e já foi relatada em várias espécies de plantas, ocasionando lesões necróticas escuras que ocorrem principalmente nas folhas, hastes e frutos das plantas. Entre as medidas de controle da doença, a principal é o uso de fungicidas no tratamento de sementes ou proteção de plantas. Entretanto, agricultura moderna visando à obtenção de produtos vegetais de qualidade, livres de contaminação por microrganismos e resíduos químicos, exige métodos alternativos aos agrotóxicos, como o uso de óleos essenciais. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antifúngico *in vitro* de produtos químicos recomendados para tratamento de sementes e óleos essenciais em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*. O experimento constou de dois ensaios *in vitro*, os quais foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Curso de Agronomia *Campus* da Universidade Federal de Santa Maria em Frederico Westphalen. O fungo *A. alternata* foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia, sendo o mesmo isolado de sementes feijão (*Phaseolus vulgaris*). No ensaio 1 foi avaliada a sensibilidade do fungo *A. alternata* aos produtos químicos CARBENDAZIM NOROX® (CARBENDAZIM 500g/l) e DEROSAL PLUS® (CARBENDAZIM 150g/l + Tiram 350g/l), nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm. E no ensaio 2 determinou-se o efeito fungitóxico dos óleos essenciais de EUCALIPTO e CITRONELA, obtidos no comércio, nas concentrações de 0, 100, 250, 500 e 1000 ppm sobre *A. alternata*. Os parâmetros de avaliação da atividade antifúngica dos produtos químicos e dos óleos essenciais, para os dois ensaios, foram diâmetro final da colônia (DFC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento da colônia (PIC). Para os fungicidas testados, o DEROSAL PLUS® foi o que apresentou melhor controle *in vitro* sobre o fungo *A. alternata*. Os óleos essenciais testados demonstraram atividade antifúngica sobre *A. alternata*, entretanto as maiores inibições foram proporcionadas pelo óleo de CITRONELA com 67%, nas maiores concentrações. Embora em ensaios individuais é possível constatar que os óleos essenciais testados proporcionaram porcentagem de inibição do crescimento micelial superior aos produtos químicos testados, demonstrando uma opção viável no controle alternativo deste patógeno.

Palavras-chave: Alternariose, fungicidas e controle alternativo.

## ABSTRACT

### **"IN VITRO" ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND CHEMICALS ON *Alternaria alternata***

AUTHOR: Eduardo Michelotti Balem  
SUPERVISOR: Dr. Stela Maris Kulczynski

*Alternaria* spot is caused by the fungus *Alternaria alternata* (PERES et al., 2003) and has been reported in several plant species, causing dark necrotic lesions that occur mainly on the leaves, stems and fruits of plants. Among the disease control measures, the main one is the use of fungicides in seed treatment or plant protection. However, modern agriculture aimed at obtaining quality plant products, free from contamination by microorganisms and chemical residues, requires alternative methods to pesticides, such as the use of essential oils. Therefore, this work aimed to evaluate the *in vitro* antifungal effect of chemicals recommended for the treatment of seeds and essential oils at different concentrations on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. The experiment consisted of two *in vitro* assays, which were carried out at the Phytopathology Laboratory of the Agronomy Course Campus at the Federal University of Santa Maria in Frederico Westphalen. The fungus *A. alternata* was obtained from the fungus collection of the Laboratory of Phytopathology, being the same isolated from bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). In test 1, the sensitivity of the fungus *A. alternata* to the chemical products CARBENDAZIM NORTOX® (CARBENDAZIM 500g/l) and DEROSAL PLUS® (CARBENDAZIM 150g/l + Tiram 350g/l), at concentrations of 0, 1, 10, 100 and 1000 ppm. And in test 2, the fungitoxic effect of the essential oils of EUCALYPTUS and CITRONELA, obtained commercially, at concentrations of 0, 100, 250, 500 and 1000 ppm on *A. alternata* was determined. The parameters for evaluating the antifungal activity of chemicals and essential oils, for the two assays, were final colony diameter (DFC), mycelial growth rate index (IVCM) and percentage of inhibition of colony growth (PIC). For the fungicides tested, DEROSAL PLUS® showed the best *in vitro* control over the fungus *A. alternata*. The essential oils tested showed antifungal activity against *A. alternata*, however the greatest inhibitions were provided by CITRONELA oil with 67%, at the highest concentrations. Although in individual tests it is possible to verify that the tested essential oils provided a percentage of inhibition of mycelial growth superior to the tested chemical products, demonstrating a viable option in the alternative control of this pathogen.

Keywords: Alternariasis, fungicides, alternative control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Diâmetro final da colônia (DFC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	17
Figura 2- Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	20
Figura 3- Diâmetro final da colônia (DFC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	24
Figura 4- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	26
Figura 5- Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de variância das variáveis, diâmetro final da colônia (DFC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de <i>Alternaria alternata</i> .....	16
Tabela 2 - Valores médios do diâmetro final da colônia (DFC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	18
Tabela 3 - Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	21
Tabela 4 - Análise de variância das variáveis, diâmetro final da colônia (DFC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de <i>Alternaria alternata</i> .....	23
Tabela 5 - Valores médios do diâmetro final da colônia (DFC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	24
Tabela 6 - Valores médios do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	27
Tabela 7 - Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo <i>Alternaria alternata</i> .....	30



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
2.1 GÊNERO <i>ALTERNARIA SPP</i> .....	10
2.2 MANEJO DA DOENÇA .....	11
<b>2.2.1 Tratamento químico: fungicidas .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2 Óleos essenciais .....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE INÓCULO.....	13
3.2 CONDUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS.....	13
<b>3.2.1 Ensaio 1: Sensibilidade <i>in vitro</i> do fungo <i>Alternaria alternata</i> a diferentes concentrações de fungicidas.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2 Ensaio 2: Avaliação do efeito fungitóxico de diferentes doses de óleos essenciais à <i>Alternaria alternata</i>, <i>in vitro</i> .....</b>	<b>14</b>
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
4.1 ENSAIO 1: SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DO FUNGO <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FUNGICIDAS.....	16
4.2 ENSAIO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO FUNGITÓXICO DE DIFERENTES DOSES DE ÓLEOS ESSENCIAIS À <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> , <i>IN VITRO</i> .....	22
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A alternariose ou mancha de alternaria é causada por várias espécies do gênero *Alternaria*, com a espécie *Alternaria alternata* (PERES et al., 2003) já foram relatadas doenças em várias culturas como Algodão, Arroz, Aveia, Batata yacon, Cevada, Feijão, Kiwi, Maçã, Mamão, Milho, Romã, Sorgo, Trigo.

O fungo pode atacar desde o estado de plântula, e provocar desfolhação e redução dos rendimentos. A doença se caracteriza pela produção de manchas e necroses foliares, e está presente em todas as regiões produtoras do país já que possui uma considerável faixa de temperatura e um amplo círculo de hospedeiros (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015)

Os sintomas típicos da doença nas plantas são manchas foliares pequenas, circulares, de coloração marrom clara, rodeadas por um halo marrom escuro. Em caso de ataques severos, toda a folha é atacada e termina caindo. Os frutos, grãos e sementes também são atacados pelo fungo, sofrendo deterioração e apodrecimento (MASSOLA JUNIOR, 2018; AGRIOS 2005).

A adoção conjunta de diferentes práticas é fundamental para o efetivo controle das Alternarioses. O estabelecimento de um programa de manejo para a doença deve incluir medidas como: plantio de sementes saudáveis, plantio de cultivares e híbridos tolerantes, rotação de cultura, redução do estresse das plantas pela correta adubação e irrigação, bem como a aplicação de fungicidas. A aplicação de fungicidas, tanto de parte aérea quanto no tratamento de sementes é muito utilizada fazendo com que o patógeno seja controlado, contribuindo para um melhor estabelecimento e desenvolvimento da cultura (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Atualmente, os métodos de controle de doenças mais utilizados, possuem efeitos indesejáveis ao ser humano, podendo ocasionar riscos a sua saúde, além de impacto negativo ao meio ambiente e juntamente o aparecimento de raças resistentes, visto que esse último faz com que se aumente ainda mais o uso de químicos. Nesse sentido, estão sendo estudados e constituem o controle alternativo, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas, estas, por sua vez, apresentam compostos químicos que causam algum tipo de toxicidade direta, ou geram indução de resistência na planta, dificultando ou impedindo a penetração dos micélios dos fungos (STANGARLIN et al. ,1999; HILLEN et al. 2012).

Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antifúngico *in vitro* de produtos químicos recomendados para tratamento de sementes e de óleos essenciais em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *ALTERNARIA* SPP.

O gênero *Alternaria* é composto por várias espécies saprófitas ou patogênicas. São fungos mitospóricos pertencentes à família Pleosporaceae (Filo Ascomycota; subfilo Pezizomycotina; classe Dothideomycetes, subclasse: Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales) (MASSOLA JUNIOR, 2018).

*Alternaria alternata* Fries Keissler (1912) é uma das espécies que causa as doenças denominadas de Alternariose ou Mancha de *Alternaria*, e se diferencia das demais espécies de *Alternaria* spp. principalmente pelos conídios. Os conídios podem ser oriundos de cadeias simples ou ramificadas, ovóides e obclavados, de coloração que varia desde verde oliva a marrom escuro, com septos transversais oblíquos ou longitudinais (BARNETT; HUNTER, 1998; ELLIS; HOLLIDAY, 1970).

Segundo Rotem (1994) a espécie *A. alternata* já foi relatada em pelo menos 115 plantas hospedeiras de 43 famílias dentre as quais estão as plantas de maior interesse econômico como grandes culturas, hortaliças e frutas. Causam sintomas em toda a parte aérea da planta. A doença se expressa por meio de manchas foliares necróticas, circulares, elípticas ou angulares, pardo-escuras, isoladas ou em grupos, com a presença de anéis concêntricos e bordos bem definidos. Em frutos e tubérculos, as lesões são escuras, de formato circular a irregular, deprimidas, provocando podridão seca (TÖFOLI et al. 2013).

A mancha de *alternaria* ocasionada por *A. alternata*, mesmo considerada com uma espécie saprófita, pode apresentar um elevado poder destrutivo em condições de elevada umidade e temperatura, comprometendo a área fotossinteticamente ativa. As ocorrências mais severas surgem com temperatura diária de 25 a 32 °C. A literatura cita que temperaturas mínimas, ótimas, e máximas necessárias para a germinação dos conídios são as de 5 a 7, 25 a 27 e 30 a 32 °C, respectivamente (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015) e, temperaturas entre 20 a 27 °C e períodos de molhamento superiores a 12 horas para que ocorra infecção e a disseminação dos seus esporos em maior parte pelo vento e pela chuva (TIMMER et al., 2000).

Este fungo sobrevive entre um cultivo e outro em restos de cultura infectados, e hospedeiros intermediários, matéria orgânica no solo podendo sobreviver ainda em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas ou mesmo nas sementes. Além destas formas de sobrevivência, existe a possibilidade de o patógeno permanecer viável no solo na forma de

micélio, esporos ou clamidósporos. Os conídios de *A. alternata* são altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até um ano nestas condições. (BEDENDO, 2018; TÖFOLI et al. 2013).

## 2.2 MANEJO DA DOENÇA

A adoção de medidas integradas de controle é fundamental para garantir o manejo das alternarioses e a sustentabilidade da produção. Entre as práticas destacam-se: Plantio de sementes e mudas saudáveis, cultivares e híbridos tolerantes/resistentes, adubação equilibrada, práticas culturais (eliminação de plantas voluntárias, hospedeiros alternativos, restos culturais, bem como evitar novos plantios próximos a áreas em final de ciclo, rotação de culturas por 2 a 3 anos com gramíneas, leguminosas ou pastagem) e fungicidas (BEDENDO, 2018).

### 2.2.1 Tratamento químico: fungicidas

No cenário atual o método de controle mais empregado é químico, utilizando fungicidas de produção comercial, e recomendado para cada cultura em específico. Os fungicidas são empregados no tratamento de sementes ou pulverização da parte aérea.

De acordo com a literatura, os fungicidas indicados pela pesquisa para tratamento de sementes são Carboxim+Tiram (Vitavax-Tiram), Difenconazole (Spectro), Tiram (Thiram), Triadimenol (Baytan), Triticonazole (Premis) e Triticonazole+Iprodiona (Premis+Rovral), no entanto poucos são os registros sobre a eficiência no controle de *Alternaria* spp. (BELANI, 2010)

Alguns estudos com tratamento de sementes têm relatado a eficiência no controle de espécies de *Alternaria* dos ingredientes ativos iprodiona em sementes de trigo (BELANI, 2010) e de iprodiona com tiram em sementes de coentro (REIS et al., 2006)

De acordo com Toffoli et al. (2015) os fungicidas desempenham um papel decisivo no controle das alternarioses em várias hortaliças uma vez que a maioria dos cultivares comerciais são suscetíveis à doença. Destacam-se os cúpricos, ditiocarbamatos cloronitrilas, dinitroanilinas, triazóis, estrobilurinas, carboxamidas, anilino-pirimidinas e dicarboxamidas, através da pulverização aérea.

No presente estudo foram estudados os produtos comerciais DEROSAL PLUS® (CARBENDAZIM + Thiram) e CARBENDAZIM NORTOX® (CARBENDAZIM), ambos recomendados para o tratamento de sementes.

O CARBENDAZIM é um fungicida de amplo espectro que possui atividade sistêmica de inibição da formação de microtúbulos mitóticos durante a mitose, o que afeta o crescimento e a divisão dos esporos (PMRA, 2011).

O tiram (Thiram) é um dimetilditiocarbamato (TMTD) dissulfeto de tetrametiluram (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S<sub>4</sub>) usado em produtos agrícolas, quer em aplicação foliar, quer no tratamento de sementes como um repelente (MARIANO et al., 2008).

### 2.2.2 Óleos essenciais

Atualmente, pode-se notar um grande aumento do número de patógenos resistentes oriundos da pressão de seleção ocasionada pelo uso recorrente de produtos químicos, muitas vezes indiscriminadamente e sem rotação de princípios ativos (NUNES, 2012), o que tem incentivado a estudos de controles alternativos de fitopatógenos.

As plantas têm a capacidade de produzir metabólitos secundários, como fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcaloides. Em muitos casos, essas substâncias atuam como defesa da planta contra microrganismos, insetos e herbívoros. Cientistas de diversos campos têm investigado as atividades antimicrobianas das plantas demonstrando a ação inibitória a vários grupos de microrganismos devido à produção de fitoquímicos (CAWAN, 1999).

A espécie *Eucalyptus citriodora* pertencente ao gênero *Eucalyptus* é uma planta da família Myrtaceae, nativo da Austrália, utilizada no Brasil para atender a demanda da produção de celulose, utilizada na fabricação de papel, carvão e madeira. É uma planta perene, de porte alto, e possui algumas espécies aromáticas. Alves et al. (2019) encontraram em seu trabalho avaliando óleos essenciais para o óleo de EUCALIPTO, os compostos neral (21,2%) e geraniale (31,6%).

Capim-CITRONELA (*Cymbopogon nardus*) pertencem à família Poaceae, são plantas perenes que possuem porte ereto e podem atingir até um metro de altura, também possuem folhas longas e destacam-se pela grande quantidade de constituintes químicos importantes. Alves et al. (2019) relata que no capim-CITRONELA encontra-se, eucaliptol (19,2 %), linalol (18,4 %) e acetato de  $\alpha$ -terpineol (13,5 %)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento constou de dois ensaios os quais foram realizados no período de março a maio de 2021, no Laboratório de Fitopatologia do Curso de Agronomia *Campus* da Universidade Federal de Santa Maria em Frederico Wetphalen, RS.

Ambos os ensaios foram realizados *in vitro* para avaliar a sensibilidade do fungo *Alternaria alternata* a produtos químicos (Ensaio 1) e óleos essenciais (Ensaio 2).

#### 3.1 OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE INÓCULO

O fungo *Alternaria alternata* foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia, sendo o mesmo isolado de sementes feijão (*Phaseolus vulgaris*), provenientes do município de Frederico Westphalen, RS.

Para a realização dos ensaios, o isolado de *A. alternata* foi repicado em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) para a obtenção de cultura pura do patógeno e posterior utilização nos ensaios descritos a seguir.

#### 3.2 CONDUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS:

##### **3.2.1 Ensaio 1: Sensibilidade *in vitro* do fungo *Alternaria alternata* a diferentes concentrações de fungicidas.**

Para a avaliação da fungitoxicidade sobre *A. alternata* foram utilizados os produtos químicos CARBENDAZIM NORTOX® (CARBENDAZIM 500g/l) e DEROSAL PLUS® (CARBENDAZIM 150g/l + Tiram 350g/l), nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm, sendo a concentração de 0 ppm, considerada com testemunha.

O meio de cultura utilizado foi o BDA, o qual foi esterilizado em autoclave e resfriado a uma temperatura de 45° C, onde foi adicionado os fungicidas nas diferentes concentrações mais o antibiótico Streptomicina (0,5%) e vertidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, constituindo as 5 concentrações.

Após a solidificação do meio, foi colocado um disco de 7mm da cultura pura contendo micélio do fungo no centro da placa. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas em BOD à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas.

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado  $2 \times 5$  (fungicidas x concentrações), com 6 repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma unidade experimental.

As avaliações foram realizadas diariamente após 24 horas de inoculação, através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), com auxílio de paquímetro digital obtendo-se uma média para cada repetição, até o momento em que a testemunha de cada tratamento apresentasse colonização completa da superfície do meio, determinando-se o Diâmetro Final da Colônia (DFC), e posterior determinação do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e a Porcentagem de Inibição do Crescimento colônia (PIC).

O DFC foi determinado a partir dos valores de crescimento micelial, utilizando as médias da última observação de cada repetição do respectivo tratamento.

Para a determinação do IVCM foi utilizada a fórmula descrita por OLIVEIRA (1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

O PIC foi calculado através da fórmula:

$$PIC = \left[ \frac{(\emptyset \text{ da testemunha} - \emptyset \text{ do tratamento})}{\emptyset \text{ da testemunha}} \right] \times 100$$

$$PIC = (\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento} / \text{Diâmetro da testemunha}) \times 100$$

### **3.2.2 Ensaio 2: Avaliação do efeito fungitóxico de diferentes doses de óleos essenciais à *Alternaria alternata*, in vitro**



Neste segundo ensaio foi avaliado a sensibilidade do fungo *A. alternata* aos óleos essenciais de modo a testar o controle alternativo aos químicos.

Os óleos essenciais utilizados foram de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*), obtidos no comércio, nas concentrações de 0, 100, 250, 500 e 1000 ppm, os quais foram adicionados ao meio BDA esterilizado mais o antibiótico (Streptomicina /0,5%). Após a solidificação do meio, foi transferido um disco de 7 mm da cultura pura contendo micélio do fungo para o centro da placa. As placas foram vedadas e então incubadas em BOD à 25°C e 12 horas de fotoperíodo.

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado 2 x 5 (óleos x concentrações), com 6 repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma unidade experimental.

As avaliações iniciaram 24 horas após a incubação e foram feitas diariamente através de medidas de diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital até que todas as placas do tratamento zero ppm (testemunha) estivessem com todo o meio de cultura coberto pelo patógeno. As variáveis analisadas foram as mesmas do Ensaio 1.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para ambos os ensaios *in vitro*, as variáveis DFC, IVCM e PIC foram submetidas à análise de variância e quando significativas os dados quantitativos foram avaliados por meio de análise de regressão e os dados qualitativos foram submetidos ao teste de médias, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENSAIO 1: SENSIBILIDADE *IN VITRO* DO FUNGO *ALTERNARIA ALTERNATA* A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FUNGICIDAS.

De acordo com a análise de variância (Tabela 1), ambos os tratamentos químicos (CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS®) apresentaram efeitos no controle do fungo *A. alternata*, verificando-se significância para os fatores independentes (fungicidas e concentrações) e para a interação, nas variáveis analisadas Diâmetro Final da Colônia /DFC e Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial / PIC. A variável Índice de Velocidade de Crescimento Micelial /IVCM diferiu significativamente entre os fungicidas e concentrações, entretanto a interação não foi significativa.

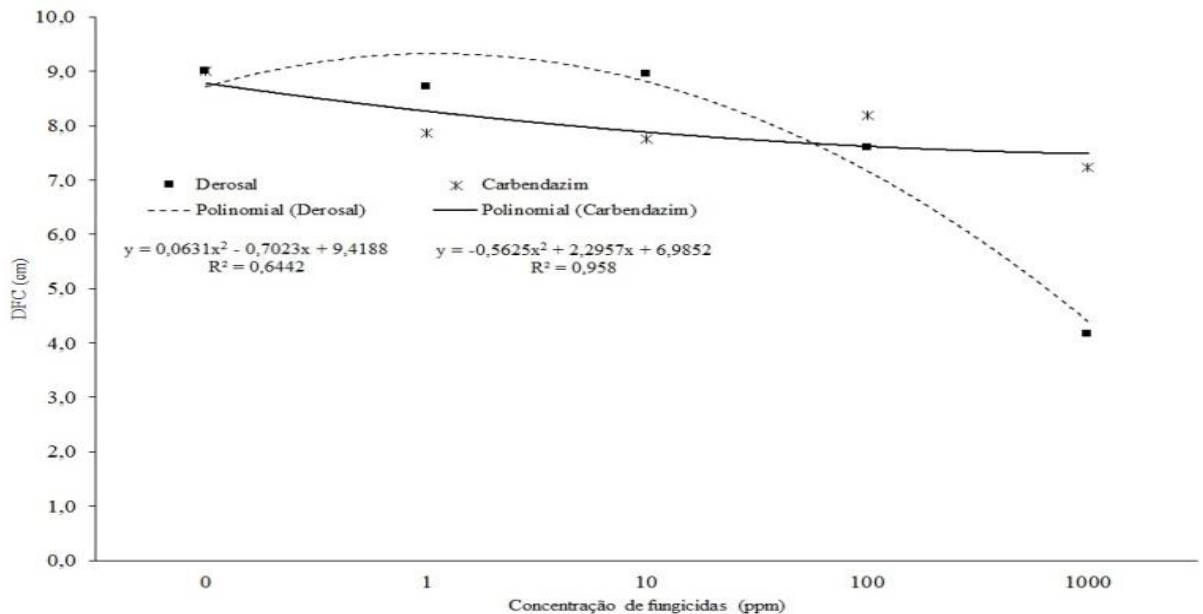
Tabela 1 - Análise de variância das variáveis diâmetro final da colônia (DFC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Alternaria alternata*, submetido a diferentes concentrações dos fungicidas CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS® *in vitro*. Frederico Westphalen – RS, 2021.

Tratamentos	DFC	IVCM	PIC
CARBENDAZIM	8,007 <sup>a</sup>	3,030a	11,03b
DEROSAL PLUS	7,685b	2,677b	14,61a
Valores de F			
Fungicidas	10,809**	7,185**	10,816**
Concentrações	133,996**	2,667*	134,018**
Fung. x Conc.	59,172**	1,858 <sup>ns</sup>	59,184**
CV	4,83	17,89	32,83

<sup>ns</sup>, \*,\*\* Não significativo e significativo para o teste F a 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

A Figura 1 demonstra que ambos os fungicidas proporcionaram redução do crescimento micelial de *A. alternata*, com o aumento das concentrações. O fungicida CARBENDAZIM NORTOX® foi o que apresentou maior fungitoxicidade, pois nas menores concentrações (1ppm e 10 ppm) ocasionou uma redução média de 19% em relação a testemunha. Entretanto, nas maiores concentrações o fungicida DEROSAL PLUS foi o que apresentou o melhor resultado inibindo o crescimento da colônia com redução de 54% na concentração de 1000 ppm (Tabela 2).

Figura 1 - Diâmetro final da colônia do fungo *Alternaria alternata* submetido às diferentes concentrações dos fungicidas CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS®. Frederico Westphalen – RS, 2021.



O controle químico de *A. alternata in vitro* não foi encontrado em trabalhos anteriores, entretanto vários autores relatam resultados semelhantes quanto à eficácia dos fungicidas DEROSAL PLUS e CARBENDAZIM para outros patógenos fúngico. Pascuali (2018) observou o efeito fungitóxico do DEROSAL PLUS, *in vitro*, para *Phomopsis phaseoli* var. *sojae* e *Fusarium* sp, o qual na dose de 10 ml proporcionou um crescimento de 0,8 cm e 2,7 cm, respectivamente, enquanto a testemunha na média de 7 dias teve um crescimento de 7,6 cm. Em trabalho onde foi analisado as associações entre *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, foi observado que os mesmos fungicidas usados neste trabalho (DEROSAL PLUS e CARBENDAZIM), na dose recomendada e testado *in vitro*, teve um efeito de controle sobre as colônias de *Trichoderma* sp., mostrando redução no diâmetro das colônias de todos os isolados testados que se manteve em 0,60 cm para DEROSAL PLUS e CARBENDAZIM, enquanto a testemunha obteve valores de 8,5 cm. Quando testados sobre os parâmetros de dose recomendada, meia dose e o dobro da dose, constatou-se que para alguns isolados não houve crescimento micelial nenhum demonstrando controle eficiente sobre o fungo. Na avaliação da interferência de fungicida no crescimento

micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* os fungicidas DEROSAL PLUS e CARBENDAZIM, na dose recomendada e no dobro da dose apresentaram controle total do crescimento micelial do fungo (PANDOLFO, 2007).

Moura (2019) em seu estudo de bioatividade de óleos essenciais de espécies de hortelãs na sanidade e fisiologia de sementes de *Phaseolus vulgaris* usou como testemunha positiva o fungicida DEROSAL PLUS o qual apresentou eficiência de controle para os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., demonstrando inibição total do crescimento micelial e esporulação para os dois fungos. Em contrapartida Valentini (2018) em seu trabalho utilizando o fungicida DEROSAL PLUS também como testemunha positiva, verificou que este apresentava eficácia diferente para o controle *in vitro* dos fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. O fungicida inibiu totalmente o crescimento micelial e esporulação e reduziu a germinação do *Penicillium* spp. Já para *Aspergillus* spp. observou valores de crescimento micelial de 2,12 cm, esporulação de 0,64 e germinação de conídios de 3,33%.

Tabela 2 - Valores médios do diâmetro final da colônia (DFC) do fungo *Alternaria alternata* submetido a diferentes concentrações dos fungicidas CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS® *in vitro*. Frederico Westphalen – RS, 2021.

Concentrações (ppm)	Fungicidas	
	CARBENDAZIM NORTOX®	DEROSAL PLUS®
0	9,00A	9,00A
1	7,867B	8,717A
10	7,758B	8,950A
100	8,183A	7,5917B
1000	7,225A	4,167B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O efeito fungicida do CARBENDAZIM também foi observado por Oliveira (1998), ao avaliar o crescimento micelial de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* nas doses de 1, 10 e 100 ppm aos 3, 5 e 16 dias de vida verificando em todas as datas de avaliação um crescimento micelial médio na dose de 1 ppm. Já para outro isolado só foi possível observar crescimento micelial apenas aos 16 dias nas doses 1 e 10 ppm. Quando avaliou número de escleródio, o fungicida, na concentração de 1ppm permitiu a formação de 3 escleródios para um isolado, porém para outro, demonstrou um controle de 100% para produção de escleródios.

Para a variável IVCN (Tabela 1), verificamos significância apenas para o fator fungicidas, onde observa-se que o DEROSAL PLUS® foi o que proporcionou menor velocidade de crescimento da colônia fúngica de *A. alternata*, sendo a interação (fungicidas x concentrações) não significativa e, portanto, não representada graficamente.

Marques (2012) ao avaliar a fungitoxicidade do CARBENDAZIM à *S. sclerotiorum*, nas dosagens de 2,500; 1,562 e 0,625 mg de ingrediente ativo por ml observou que o índice de velocidade de crescimento micelial foi igual a zero demonstrando inibição completa do crescimento micelial e produção de escleródios, diferindo dos resultados encontrados neste trabalho.

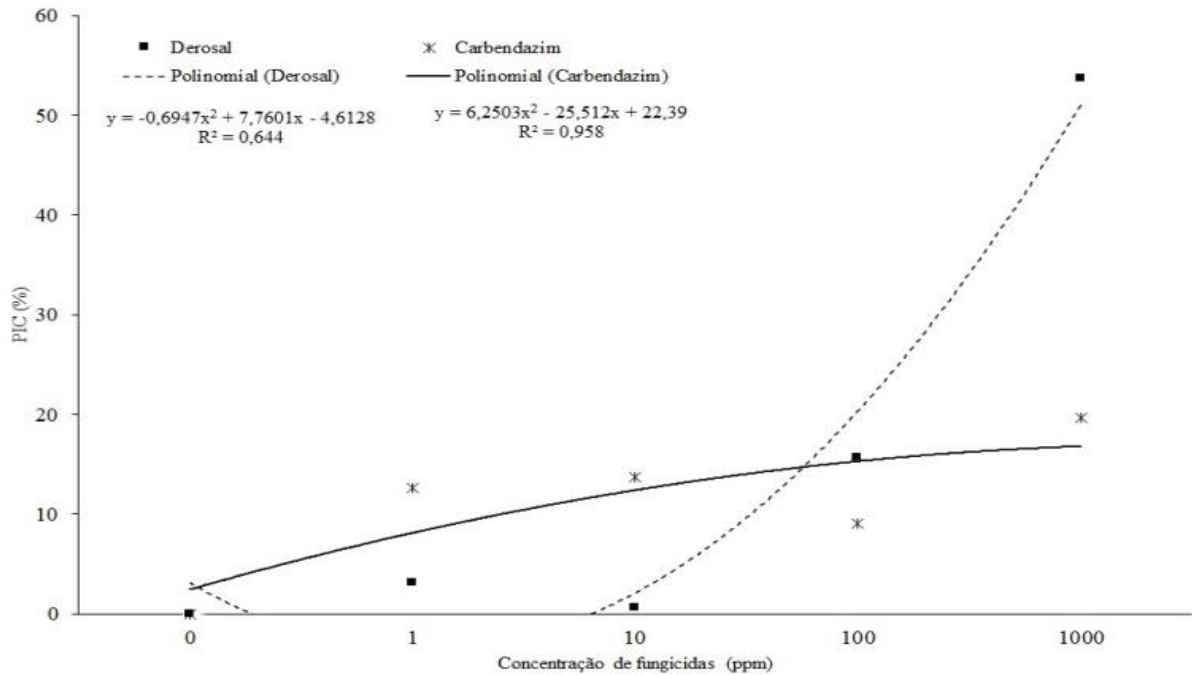
O efeito fungitóxico do CARBENDAZIM mais Iprodione (1000mL / ha) à *S. sclerotiorum* também foi observado por Ribeiro (2018), na cultura do algodoeiro, à nível de campo através do controle total no índice de crescimento micelial e produção de escleródios.

Corroborando com os dois autores anteriormente, citados, porém com outro patógeno analisado, Machado et al (2006) em seu trabalho sobre avaliação da eficiência de diferentes fungicidas no controle *in vitro* de *Myrothecium roridum* também obtiveram efeito positivo do fungicida CARBENDAZIM (500ml/ha) para as variáveis IVCN, DMC (cm) e Concentração de esporos (10<sup>5</sup>)/mL.

O produto comercial DEROSAL PLUS® embora tenha demonstrado maior eficiência de controle quando comparado com o CARBENDAZIM NORTOX® (Tabela 1), neste estudo, reduzindo o crescimento micelial e o IVCN não foram encontrados estudos *in vitro* para embasamento da discussão.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) verificada na Figura 2 demonstra que as maiores inibições foram proporcionadas nas maiores doses de ambos os fungicidas, sendo observado para o DEROSAL PLUS® e CARBENDAZIM NORTOX®, 53,70 % e 19,72%, respectivamente, de inibição do crescimento micelial em relação à testemunha. A equação que melhor se ajustou a ambas variáveis foi o modelo quadrático (Figura 2). Nóbrega (2018) em contrapartida aos resultados observados demonstrou que ao utilizar apenas o THIRAM, um dos princípios ativos do fungicida DEROSAL PLUS®, na concentração de 250 µL no controle *in vitro* dos fungos *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*, encontrou porcentagens de controle de crescimento micelial em torno de 100%.

Figura 2: Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* submetido às diferentes concentrações dos fungicidas CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS®. Frederico Westphalen – RS, 2021.



Os resultados observados na Tabela 3 demonstram que em todas as concentrações testadas houve diferença significativa entre os fungicidas avaliados. Nas menores concentrações o fungicida CABERDAZIM NORTOX® foi o que apresentou maior fungitoxicidade. Resultados semelhantes, porém, apresentados para outro patógeno foram observados por Gaviria-Hernández (2013) que em seu estudo *in vitro*, para avaliar a eficiência de diferentes doses de CARBENDAZIM no controle de *Colletotrichum* spp. verificou que para as concentrações de 300, 600 e 900 ppm, o fungicida apresentou para *C. gloeosporioides* um controle de 85,75; 85,50 e 85,25% respectivamente, demonstrando que com o aumento das doses houve um menor controle. Já para o fungo *C. acutatum* os controles foram de 33,75; 46,50 e 47,75%, demonstrando que este fungicida apresenta variabilidade quando a sua eficácia depende do gênero e espécie fúngica.

Vários autores também ao trabalharem com o Fungicida CARBENDAZIM para controle de outros patógenos fúngicos observaram porcentagem de inibição variável. Aguiar

(2015) em seu ensaio *in vitro*, ao avaliar diferentes fungicidas sobre o crescimento micelial de isolados de *Corynespora cassiicola*, observou que a porcentagem de inibição da colônia entre os 30 isolados testados, apresentou controles de 0 a 100%. Tal variação também é demonstrada por Brent e Hollomon (1995), que diz ser como uma “resistência cruzada negativa”, ou seja, uma resistência cruzada inversa. O efeito aparece entre interações do fungicida CARBENDAZIM com outros fungicidas, pois, raças resistentes a um determinado fungicida conferem de forma automática diferença de sensibilidade para este fungicida, que ocorrem devido a mutações individuais, as quais são selecionadas através de exposição em todos os fungicidas.

Já Oliveira (1998) obteve em seu experimento uma alta eficiência do fungicida, *in vitro* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm, onde o CARBENDAZIM, inibiu 100% do crescimento micelial do fungo para o isolado testado.

Tabela 3 - Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Alternaria alternata* submetido a diferentes concentrações dos fungicidas CARBENDAZIM NORTOX® e DEROSAL PLUS® *in vitro*. Frederico Westphalen – RS, 2021.

Concentrações	Fungicidas	
	CARBENDAZIM NORTOX®	DEROSAL PLUS®
0	0A	0A
1	12,588A	3,143B
10	13,752A	0,555B
100	9,070B	15,643A
1000	19,718B	53,70 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na literatura a maioria dos trabalhos sobre a avaliação do controle químico de *Alternaria* spp. são avaliados através do tratamento de sementes e controle da doença em parte aérea e poucos são realizados *in vitro*. E no caso específico do gênero *Alternaria*, como existem várias espécies ocorrentes em diversos hospedeiros como hortaliças, soja, feijão, canola, girassol, trigo, mamoeiro, citrus, os produtos avaliados geralmente são os recomendados para a cultura específica, o que justifica a pouca discussão frente aos resultados encontrados neste trabalho.

Entretanto vários outros princípios ativos tem demonstrado eficácia no controle de *Alternaria* spp. O ingrediente ativo iprodiona foi o mais eficiente no controle “*in vitro*” do

fungo, sendo o mais indicado para uso em tratamento de sementes de trigo visando *Alternaria* (BELANI, 2010). A mistura de iprodiona com tiram foi o melhor fungicida no controle de *A. dauci* e *A. alternata* em sementes de coentro cv. Verdão, tanto no teste de papel filtro como no teste de transmissão em plântula (REIS et al., 2006).

Aplicações de fungicidas com azoxistrobina mais ciproconazol, iprodiona e flutriafol são eficientes para o controle de *Alternaria* spp. em plantas de canola tanto na aplicação preventiva como erradicativa (SCHEFFER, 2013). O tratamento com trifloxystrobin + propiconazole foi eficiente no controle da mancha marrom (*Alternaria alternata* fsp. *citri*) em tangor murcot (COLTURATO et al., 2009).

Senhor et al. (2009) ao avaliarem a eficiência dos fungicidas thiabendazole, azoxystrobin e imazalil, na dose comercial, 194g; 8g e 100g i.a./100L, respectivamente, no controle de podridão pós-colheita causada por *Alternaria alternata* verificaram que todos os fungicidas foram eficientes no controle 'in vitro', porém não mostraram eficiência no controle de *A. alternata* sobre os frutos armazenados a temperatura ambiente.

De acordo com Toffoli et al. (2015) os fungicidas desempenham um papel decisivo no controle das alternarioses em várias hortaliças uma vez que a maioria dos cultivares comerciais são suscetíveis à doença. Destacam-se os cúpricos, ditiocarbamatos cloronitrilas, dinitroanilinas, triazóis, estrobilurinas, carboxamidas, anilino pirimidinas e dicarboxamidas.

#### 4.2 ENSAIO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO FUNGITÓXICO DE DIFERENTES DOSES DE ÓLEOS ESSENCIAIS À *ALTERNARIA ALTERNATA*, *IN VITRO*

De acordo com a análise de variância (Tabela 4), os óleos essenciais apresentaram efeito fungitóxico para o fungo *Alternaria alternata*, verificando-se significância para os fatores independentes (óleos e concentrações) e para a interação, nas variáveis analisadas Diâmetro final da colônia/DFC, Índice de Velocidade de Crescimento Micelial/IVCM e Porcentagem de inibição do crescimento micelial/PIC. Estes resultados indicam que os óleos testados, quando usados nas diferentes concentrações apresentam eficiência de controle para o patógeno.

Tabela 4 - Análise de variância das variáveis, diâmetro final da colônia (DFC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Alternaria alternata*, submetido a diferentes concentrações dos óleos de



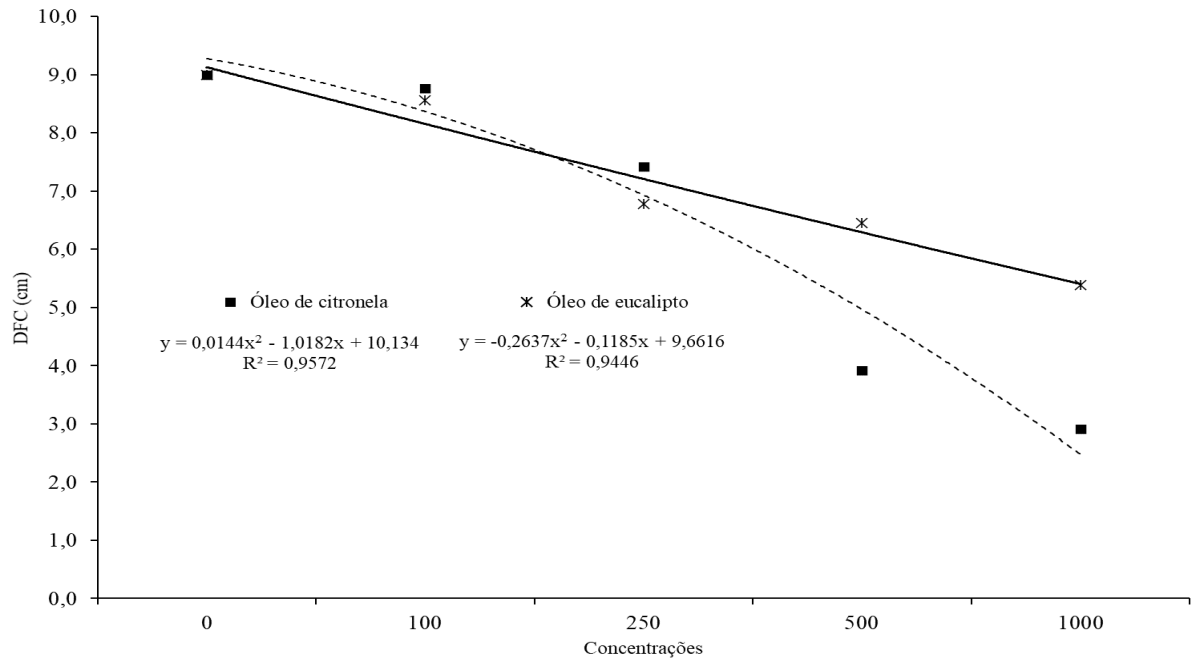
EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*), *in vitro*. Frederico Westphalen – RS, 2021.

Tratamentos	DFC	IVCM	PIC
Óleo de EUCALIPTO	7,238a	2,478a	19,57b
Óleo de CITRONELA	6,405b	2,280b	28,831a
Valores de F			
Óleos	235,494**	24,015**	235,475**
Concentrações	1219,695**	86,665**	1219,210**
Óleos x Concentrações	161,344**	5,766**	161,290**
CV	3,08	6,58	9,66

<sup>ns</sup>, \*,\*\* Não significativo e significativo para o teste F a 5 e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

Ao observar a Figura 3 verificou-se que ambos os óleos essenciais testados, independente da concentração, demonstraram efeito antifúngico, pois interferiram negativamente no crescimento de *A. alternata*, proporcionando uma inibição no crescimento micelial do patógeno a partir da concentração de 100ppm, sendo nas maiores concentrações observados os menores diâmetros da colônia. O óleo de CITRONELA foi o que apresentou a mais alta fungitoxicidade a *A. alternata*, pois proporcionou a maiores inibição do crescimento em relação à testemunha.

Figura 3 - Diâmetro final da colônia (DFC) do fungo *Alternaria alternata* sob diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*). Frederico Westphalen – RS, 2021.



O potencial fungitóxico dos óleos variou significativamente em algumas concentrações (Tabela 5). Na concentração de 100 ppm os óleos apresentaram mesmo efeito. Entretanto, na concentração de 250 ppm, a maior fungitoxicidade foi do óleo de EUCALIPTO sobre a *A. alternata*. Efeitos de redução de crescimento micelial proporcionado pelo óleo de *Eucalyptus citriodora* também foram relatados por Dias-Arieira et al. (2010), porém para o controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro, verificando *in vitro* que o crescimento micelial do fungo nas doses mais altas ( 1,0 e 1,50%) acarretou colônias com diâmetro de 0,8 cm, mostrando controle eficiente quando comparado com a testemunha que teve um diâmetro final de 9 cm, já para as dosagens mais baixa (0,25 e 0,50) os diâmetro observados foram de 5,8 e 4,3 respectivamente, também diferindo estatisticamente da testemunha, mas com um controle inferior ao das dosagens mais elevadas.

Tabela 5 - Valores médios do diâmetro final da colônia (DFC) do fungo *Alternaria alternata* em reação as diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*) *in vitro*. Frederico Westphalen, 2021.

Óleos essenciais		
	EUCALIPTO	CITRONELA
Concentrações		

0	9,00A	9,00A
100	8,558A	8,767A
250	6,783B	7,417A
500	6,458A	3,925B
1000	5,392A	2,917B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em contraponto aos resultados obtidos no ensaio, porém para outros patógenos, Salgado et al. (2003) ao avaliarem *in vitro* a atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*, verificaram que os patógenos apresentavam sensibilidade diferente as doses dos óleos essenciais. *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum* não demonstraram diferenças significativas no DFC nas menores concentrações dos óleos das diferentes espécies de eucaliptos, porém, para a dose mais elevada, houve presença de maior atividade fungitóxica do óleo essencial de *E. urophylla*. Para *Bipolaris sorokiniana* houve diferença significativa nas doses maiores.

O óleo de CITRONELA se destacou apresentando maior efeito fungitóxico sobre o patógeno através da redução do crescimento micelial nas maiores concentrações (500 e 1000ppm) proporcionando colônias com diâmetro de 3,93 e 2,92 cm, respectivamente, mostrando controle mais eficiente quando comparado ao óleo de EUCALIPTO e a testemunha que teve um diâmetro final de 9 cm (Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados por Porcino (2018) onde descreve que o óleo essencial de CITRONELA na concentração de 1% inibiu por completo o crescimento micelial e a produção de esporos de *Alternaria alternata*, demonstrando um efeito similar ao fungicida testado. Já o óleo de EUCALIPTO, em igual concentração para o mesmo isolado não demonstrou diferença significativa da testemunha, mas para outro isolado teve efeito de indução de esporulação do fungo em relação à testemunha.

Resultados confrontantes foram relatos por Franzener et al. (2007) utilizando um subproduto do óleo essencial de CITRONELA, os hidrolatos, os quais não diferiram significativa da testemunha no controle do crescimento micelial e da esporulação do fungo *Alternaria brassicae* nas concentrações testadas. Além disso, Moreira (2008) constatou que não houve inibição, do crescimento dos tubos germinativos de *A. brassicae* o que evidencia que o hidrolato de CITRONELA, nas dosagens testadas não possui compostos antifúngicos.

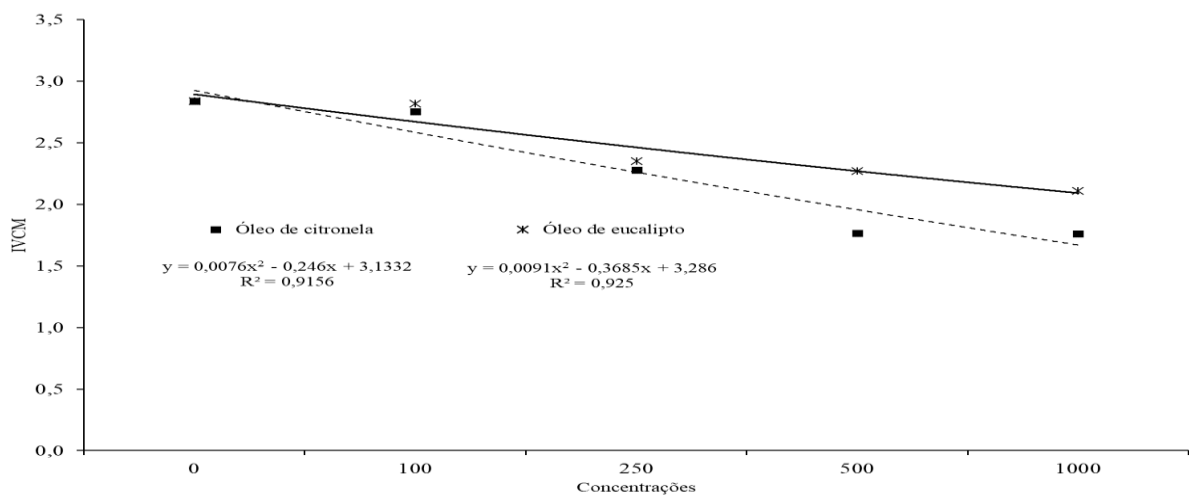
O efeito fungistático / fungicida do óleo essencial de CITRONELA para outros patógenos, também foi relato por Brum (2012), o qual observou menores DFC em diferentes

concentrações testadas (0,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; 0,50  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; 0,75  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e = 1,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), onde os fungos *Colletotrichum graminicola* e *Helminthosporium sp* apresentaram pequeno crescimento micelial nas duas menores doses e nas demais dosagens o crescimento se igualou a zero. Para *Pyricularia grisea* as dosagens de 0,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e 0,50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  também não conseguiram inibir por completo o crescimento micelial, entretanto na concentração 0,50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  só houve crescimento micelial após o quarto dia, e nas demais doses o mesmo foi inibido por completo. Porém, mesmo com a ocorrência de diâmetro final da colônia houve um decréscimo em relação à testemunha nas duas concentrações menores.

Em relação ao Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM), pode-se verificar na Figura 4, que o fungo quando submetido ao efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais, decresceu conforme aumento das concentrações dos óleos essenciais. Esse resultado não foi comprovado por Porcino (2018) que relata em seu trabalho que o isolado de *A. alternata* quando submetido ao óleo de EUCALIPTO na concentração de 1%, houve uma promoção do crescimento das colônias, ultrapassando o crescimento micelial da testemunha.

Reduções significativa no IVCM de *A. alternata* de 25% e 38% foram observadas, na maior dose de 1000ppm, para os óleos de EUCALIPTO (2,11) e CITRONELA (1,762), respectivamente, em relação à testemunha (2,84), evidenciando o efeito fungitóxico dos respectivos óleos (Figura 4). Para o óleo de CITRONELA, Porcino (2018) demonstra que na concentração de 1% usada em seu trabalho, o óleo essencial obteve valores de 0 para IVCM.

Figura 4: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Alternaria alternata* sob diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*). Frederico Westphalen – RS, 2021.



Analisando-se a velocidade de crescimento do fungo *A. alternata* em cada concentração dos óleos essenciais verifica-se diferenças significativas no IVC, apenas nas concentrações de 500 e 1000ppm (Tabela 6), onde o óleo de CITRONELA foi o que demonstrou maior efeito inibitório do crescimento em relação ao óleo de EUCALIPTO. Nas demais concentrações os dois óleos analisados não diferiram estatisticamente. Corroborando com os resultados, Gama (2020) em estudo sobre o uso de óleos essenciais no controle do fungo *Fusarium oxysporum* não encontrou diferença significativa entre o óleo de EUCALIPTO e a testemunha em nenhuma das concentrações testadas demonstrando que esse óleo não obteve eficiência em seu estudo. Por outro lado, o óleo de CITRONELA obteve uma eficiência considerável demonstrando que na concentração 0,2% o índice de crescimento micelial estabiliza não havendo mais crescimento das estruturas do fungo. Nunes e Nascimento (2018) também observaram efeito positivo do óleo de CITRONELA, *in vitro*, sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de fungo da antracnose (*Colletotrichum acutatum*) em que em todas as concentrações de 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL e 25 µL o óleo de CITRONELA obteve significância diferindo positivamente da testemunha e do fungicida usado.

Tabela 6 - Valores médios do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *Alternaria alternata* em reação as diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*) *in vitro*. Frederico Westphalen, 2021.

Concentrações	Óleos essenciais	
	EUCALIPTO	CITRONELA
0	2,840A	2,840A
100	2,818A	2,753A
250	2,352A	2,278A
500	2,272A	1,768B
1000	2,110A	1,762B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em contradição com os resultados apresentados, Nóbrega (2018), ao testar óleo de EUCALIPTO no controle *in vitro* dos fungos *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* nas concentrações 0,0; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% constatou que para *A. alternata* o IVC foi de 0,3 e 0,1 cm dia<sup>-1</sup> nas concentrações de 0,8 e 1,0%, respectivamente, diferindo significativamente

da testemunha (0,0 %), com IVCM de 0,64 cm dia-1. Para o fungo *Colletotrichum musae*, nas mesmas concentrações, o índice foi de 0,41 e 0,69 cm dia-1 diferindo do controle negativo que foi de 1,18 cm dia-1, evidenciando redução.

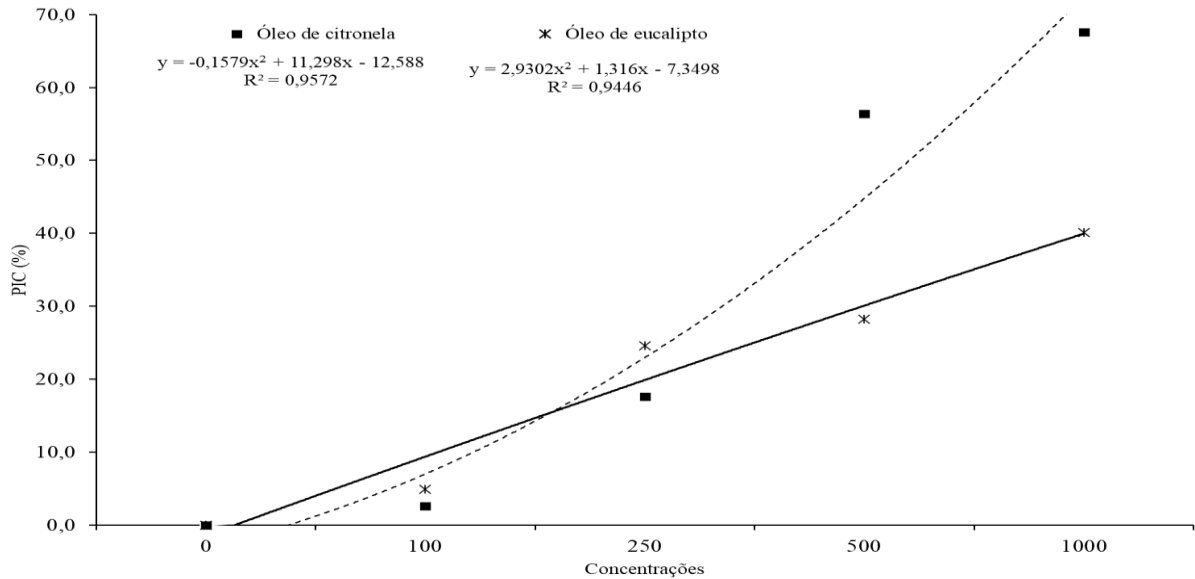
Outros autores também demonstraram o efeito fungitóxico do óleo de EUCALIPTO expresso pela redução do IVCM ao analisarem o crescimento de *Colletotrichum* spp (SILVA, 2017) e *Thielaviopsis paradoxa* (NASCIMENTO, 2013).

Por outro lado, corroborando com os resultados apresentados, porém em testes realizados sobre outro patógeno, Santos (2017) ao testar o efeito fungitóxico do óleo essencial de hortelã (*Mentha* sp.) e EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.) em *Macrophomina phaseolina* verificou que não houve diferença significativa para com a testemunha na variável IVCM e apenas uma pequena redução na concentração de 1% para o óleo de EUCALIPTO. Resultados semelhantes ao autor anterior foram encontrados por Gama (2020) o qual observou que o óleo de EUCALIPTO não inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum*

A Figura 5 demonstra a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *A. alternata*, onde se observa aumento da taxa de inibição do crescimento com o aumento das concentrações. Na maior concentração (1000ppm) observou-se uma porcentagem de 40,09 % e 67,59% de inibição do crescimento fúngico em relação à testemunha, para os óleos de EUCALIPTO e CITRONELA, respectivamente. Portanto, o óleo de CITRONELA foi o que expressou um maior potencial fungitóxico, pois proporcionou a maior inibição no crescimento fúngico, bem como o menor IVCM (Figura 4).

Resultados semelhantes de comparações de eficiência entre os óleos essenciais de CITRONELA e EUCALIPTO, porém no controle de outro patógenos já foram evidenciados por Perini et al. (2013) que relata o efeito de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Pyricularia grisea*, demonstrando que o óleo de CITRONELA se sobressaiu perante aos outros testados obtendo resultado de 100% de inibição do micélio nas alíquotas de 30, 60, 90, 120 e 150 µL. Já para o óleo de EUCALIPTO nas concentrações de 30 e 60 µL obteve um percentual de controle de 30% e 83,79% respectivamente.

Figura 5: Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Alternaria alternata* sob diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*). Frederico Westphalen – RS, 2021.



Em relatos dos mesmos óleos em estudos, porém analisados sobre o poder fungicida de fungos biotróficos, Medice et al. (2007) constatou em seu experimento que para a concentração de 1% do óleo essencial de EUCALIPTO houve o controle de 100% na germinação de urediniósporo de ferrugem, o mesmo controle também foi observado no óleo essencial de CITRONELA só que esse em uma concentração de 0,5%, resultado que vem de encontro ao encontrado no trabalho onde foi nas maiores concentrações que o óleo de CITRONELA apresentou maior fungitoxicidade à *A. alternata*.

De acordo com os resultados da Tabela 7, verifica-se que os óleos essenciais estudados diferem estatisticamente entre si em cada concentração avaliada, onde nas menores concentrações (100 e 250ppm), destaca-se o óleo de EUCALIPTO em relação ao óleo de CITRONELA, com maior porcentagem de inibição. Entretanto, nas maiores concentrações (500 e 1000ppm) o maior efeito fungitóxico é proporcionado pelo óleo de CITRONELA.

Resultados que evidenciam o efeito fungitóxicos do óleo essencial de EUCALIPTO sobre os fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *C. sublineolum* e *Alternaria alternata* foram demonstrados por Bonaldo et al. (2007) em sua avaliação *in vitro* onde nas dosagens de 40, 100, 500 e 1000  $\mu$ L, o óleo promoveu 100% de inibição do crescimento micelial e na dosagem de 20  $\mu$ L ocorreu inibição de 100% do crescimento micelial para *S. rolfsii*, *Phytophthora* sp., *A. alternata* e *C. sublineolum* e para *R. solani* de 90%. Nóbrega (2018) demonstrou em seu trabalho que o óleo essencial de EUCALIPTO promoveu as maiores porcentagens de inibições de crescimento dos fungos *Alternaria*

*alternata* e *Colletotrichum musae* nas maiores concentrações (0,8 e 1,0%), obtendo como resultado um PIC igual a 52,6 e 79,6% para o fungo *A. alternata* e 66,3 e 41,2% de *C. musae*.

Na literatura, o efeito inibitório do óleo de EUCALIPTO nas maiores concentrações também são relatados por outros autores, tais como Dias-Arieira et al. (2010) (*Colletotrichum acutatum*) e Borges (2007) (*Phakopsora pachyrhizi*) demonstrando que este óleo tem atividades antifúngicas.

Tabela 7 - Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Alternaria alternata* em reação as diferentes concentrações dos óleos essenciais de EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*) e CITRONELA (*Cymbopogon nardus*) *in vitro*. Frederico Westphalen, 2021.

Concentrações	Óleos essenciais	
	EUCALIPTO	CITRONELA
0	0A	0A
100	4,903A	2,590B
250	24,623A	17,588B
500	28,237B	56,387A
1000	40,088B	67,588A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## 5 CONCLUSÃO

Para os fungicidas testados, o DEROSAL PLUS® foi que o apresentou melhor controle *in vitro* sobre o fungo *Alternaria alternata*.

Os óleos essenciais testados demonstraram atividade antifúngica sobre *Alternaria alternata*, entretanto as maiores inibições foram proporcionadas pelo óleo de CITRONELA com 67%.

Embora em ensaios individuais é possível constatar que os óleos essenciais testados demonstraram porcentagem de inibição do crescimento micelial superior aos produtos químicos mostrando uma opção viável no controle alternativo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS G.N. **Planta Pathology**. Florida. Elsevier Academic Press. 922p.

AGUIAR, F. M. **Caracterização de isolados de *Corynespora cassicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas**. Tese de doutorado em fitopatologia, Universidade de Brasília. Brasília DF, p. 28-74, 2015.

ALHUSSAEN, K. M. Morphological and physiological characterization of *Alternaria solani* isolated from tomato in Jordan Valley. **Research Journal of Biological Sciences**, Karaman, v. 7, n. 8, p. 316-319, 2012.

ALVES, M. S. Et al. Diversidade Química dos Óleos essenciais de Plantas do Jardim botânico da UFRRJ e de outras localidades, baseado em análise de imagem e estatística Multivariada. **Ver. Virtual Quim.**, Vol. 11, pag. (5), no prelo. 2019.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. **American Phytopathological Society**, 4 ed., 240p, 1998.

BEDENDO, I.P MANCHAS FOLIARES In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia . Princípios e Conceitos**, v1, 5ªed. Ouro Fino –MG: Agronômica Ceres. p. 339-344, 2018.

BELANI, A.M.M. BELANI, A.M.M. **Levantamento, sobrevivência e controle de *Alternaria alternata* em sementes de trigo**. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências Agroveterinárias UDESC-Lages. 2010.42p. Biológico, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2013.

BONALDO, S.M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitoras de fitoalexinas em sorgo e soja por EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica** 33: p. 383-387, 2007.

BORGES, D. I. **Óleos e extratos vegetais no controle da ferrugem asiática da soja (*Glycine max* (L.) Merrill.)**. Tese, Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. Lavras MG, p.26-47, 2007.

BRENT, K.J., & HOLLOMON, D.W. (1995). **Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed**. Brussels: FRAC monograph nº1, v.2, p.58.

BRUM, R. B. C. S. **Efeito de Óleos Essenciais no Controle de Fungos Fitopatogênicos**. 2012, xv, 135 f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, 2012.

BUENO, C. J., MEYER, M. C., SOUZA N. L. De. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum: Agronomy**. Maringá, v. 25, n. 1, p. 231-235, 2003.

CAWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COLTURATO, A.B., et al. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 210-215, 2009.

DIAS-ARIEIRA, C.R., et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. *Alternaria citri*. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 242p, 1970.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. *Ciência & Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 28, núm. 1, enero-marzo, 2007, pp. 29-38 Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil.

GAMA, B. F., et al (2020). Use of essential oils in the control of the fungus *Fusarium oxysporum* isolated in northern MT. **Scientific Electronic Archives**, 13(6), 25–30.

GAVIRIA-HERNÁNDEZ, V., PATIÑO-HOYOS, L. F., SALDARRIAGA-CARDONA, A. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. **Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.** (2013) 14(1) 67-75.

HILLEN, T., SCWAN-ESTRADA, K. R. F., MESQUINI, R. M., CRUZ, M. E. S., STANGARLIN, J. R., & NOZAKI, M. (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14 (3), 439-445.

BELANI, A. M. M. **Levantamento, sobrevivência e controle de *Alternaria altenata* em sementes de trigo**. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina. Centro de Ciências Agroveterinárias - Lages, 2010. 42p.

MACHADO, A.Q., et al. Avaliação da eficiência de diferentes fungicidas no controle “*in vitro*” de *Myrothecium roridum*. Docplayer: **Fitopatologia**, 2006. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/10081975-Avaliacao-da-eficiencia-de-diferentes-fungicidas-no-controle-in-vitro-de-myrothecium-roridum.html>>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

MARIANO, R.M.et al. Avaliação de bis(4-metilfenilditiocarbimato) zincato (II) de tetrabutilamônio como acelerador em composições de borracha natural. **Polímeros: Cienc. Tecnol.**, v. 18, p. 297-301, 2008.

MARQUES, D. M., CAMPOS, H. D., RIBEIRO, D. C., GUIMARÃES, L. D., SILVA, F. H. F., SILVA, L. H. C. P. Da. Sensibilidade a fungicidas de isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*. MASSOLA JUNIOR, N.S. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia . Princípios e Conceitos**, v1, 5ªed. Ouro Fino –MG: Agronômica Ceres. p. 107-141. 2018.

- MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia** 31: p. 83-90, 2007.
- MOREIRA, C.G.A. et al. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium* **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 332-337, 2008.
- MOURA, G. S., BONOME, L. T. Da S. Bioatividade de óleos essenciais de espécies de hortelãs na sanidade e fisiologia de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 14, n. 3, jul.-set, p. 366-373, 2019.
- NASCIMENTO, S. M. C. Do. et al. Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* por óleos vegetais. **Encontro Amazônico de Agrárias**, 5., 2013, Belém, PA. A importância da tecnologia e do empreendedorismo no desenvolvimento amazônico. Belém, PA: UFRA, 2013.
- NÓBREGA, L. P. **Potencial fungitóxico dos óleos essenciais de copaiba e eucalipto sobre fitopatógenos**. Dissertação, Mestre, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal PB, 38p, 2018.
- NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 181-196, 2012.
- NUNES, G.G. NASCIMENTO G.F. do. **Efeito de óleos essenciais sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de fungo da antracnose - *Colletotrichum acutatum***. Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica. Centro Universitário de Brasília. Brasília, DF, 23p, 2018.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- OLIVEIRA, S. H. F. De. **Controle químico de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro: ação *in vitro* sobre o ciclo de vida, ação preventiva e curativa em condições controladas, eficiência e modo de aplicação em campo**. Tese, Doutorado em Agronomia, Universidade de São Paulo. Piracicaba SP, 74p, 1998
- PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp.e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. Dissertação, Mestre em fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre RS, p. 19-45, 2007.
- PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F. Tratamento de sementes. Instituto Agronômico Campinas (IAC). Disponível em: <[http://www.iac.br/imagem\\_informacoestecnologicas/81.pdf](http://www.iac.br/imagem_informacoestecnologicas/81.pdf)>. Acesso em: 15 de julho 2021.
- PASCUALI, L. C., CARVALHO, J. W. P., SOUZA, A. A., GONÇALES, L. R. B., SILVA FILHO, A. Da. Atividade de bioextratos no desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e no tratamento de sementes de soja. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. V. 11 n. 2, p. 457-478, 2018.

PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease*, **St Paul**, v. 87, 750p, 2003.

PERINI, V. B. DE M. et al. Efeito de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 4(1), 70-77, 2013.

PMRA. **Pest Management Regulatory Agency**. Registration decision. carbendazim. REV2011-11. 2011

PORCINO, M.M. **Óleos essenciais no manejo da mancha marrom de alternaria em tangerineira ‘dancy’**. Dissertação de mestrado em agronomia, universidade federal da Paraíba. Areia PB, p. 30-60, 2018.

REIS A; SATELIS JF; PEREIRA RS; NASCIMENTO WM. 2006. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. **Horticultura Brasileira**, 24: 107-111, 2006.

REIS, A.; STATELIS, J.F.; PEREIRA, R.S.; NASCIMENTO, W.M. Associação de REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas**. 6 ed. Passo Fundo: UPF, 2010. 226p.

RIBEIRO, L. R. et al. Eficiência de aplicação de fungicidas no controle de mofo branco no algodoeiro. **XLI Congresso Paulista de Fitopatologia**, 2018, Marília, SP, 2018.

RODRIGUES, T. T. M. S. ET AL. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, Wellesbourne, v. 22, n. 1, p. 28, 2010.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. **St. Paul**: APS Press, 1994. 326p.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia** 27: p.249-254, 2003.

SANTOS, A.B. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de hortelã (*Mentha* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) em *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid.** Trabalho de conclusão de curso, Bacharel em Agronomia, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal PB, 2017.

SENHOR, R.F. ET AL. SILVA, H. A. O. Da. **Eficiência de diferentes fungicidas no controle de óleos essenciais no controle da antracnose em feijão caupi**. Monografia, bacharel em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Areia PB, p. 46, 2017.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, v. 23, n. 11, p. 16-21, 1999..

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; OROZCO-SANTOS, M . *Alternaria* brown spot of mandarins Compendium of Citrus Diseases (Timmer LW Garnsey SM & Graham JH, eds), The American Phytopathological Society Press, **St. Paul**, MN, v. 2, p. 19–21. 2000.

TÖFOLI, J. G. ET AL. Potato late blight and early blight: importancy, characteristics and sustainable management. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 210-215, 2009.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. Em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.

VALENTINI, R. P. **Tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais de limão taiti e canela casca**. Trabalho de conclusão, Bacharel em Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do Sul, RS, 32p, 2018.

VI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE RIO VERDE 2012. **Anais**. Rio Verde GO, p. 36-40, 2012.