

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Lucas Graciolli Savian

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE “IN VITRO” DE PATÓGENOS
FOLIARES ASSOCIADOS À *Carya illinoensis***

Santa Maria, RS
2020

Lucas Gracioli Savian

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE “IN VITRO” DE PATÓGENOS FOLIARES
ASSOCIADOS À *Carya illinoensis***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marlove Fatima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil
2020

Lucas Graciolli Savian

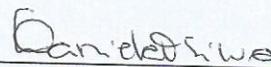
**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE “IN VITRO” DE PATÓGENOS FOLIARES
ASSOCIADOS À *Carya illinoensis***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

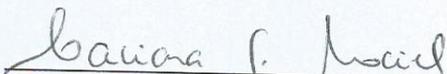
Aprovada em 18 de fevereiro de 2020:



Marlove Fatima Brião Muniz, Profª Drª. (UFSM)
(ORIENTADORA)



Daniela Thomas da Silva, Drª.



Caciara Gonzatto Maciel, Profª Drª. (UFMT)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro concedido através da disponibilização da bolsa mestrado.

À minha família pelo apoio e compreensão nos momentos de minha ausência.

À professora Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, por ter aceitado ser minha orientadora, desde os tempos de graduação, por sua atenção, pelos ensinamentos e confiança em meu trabalho.

À professora PhD. Berta Maria Heizmann, pela co-orientação, ensinamentos, e preocupação com o andamento de meu trabalho.

À banca examinadora, constituída pela Dra. Daniela Thomas da Silva e Prof^a. Dra. Caciara Gonzatto Maciel

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, agradeço pela amizade e auxílio na realização deste trabalho

Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, em especial a Nadia Bianchini e Bibiana Batista, por sempre me ajudarem quando precisei.

A laboratorista Maria Nevis Deconto pela amizade, carinho e atenção.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE “IN VITRO” DE PATÓGENOS FOLIARES ASSOCIADOS À *Carya illinoensis*

AUTOR: LUCAS GRACIOLLI SAVIAN
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch, conhecida como noqueira-pecã é uma espécie florestal nativa da América do Norte e foi introduzida no Brasil por volta de 1915. Atualmente, a espécie está difundida pela região sul do país, onde tem grande importância econômica. Como qualquer cultura, a noqueira-pecã está sujeita a incidência de doenças que afetam a viabilidade dos pomares. Nos últimos anos, a sarna, causada por *Cladosporium* spp. e a mancha foliar, ocasionada por *Pestalotiopsis* spp. têm causado danos aos plantios brasileiros e até o presente momento, não existem formas de controle para estas doenças. O uso de produtos químicos e os consequentes problemas causados, têm desencadeando a busca por métodos de controle que tenham um impacto ambiental reduzido. Nesse contexto, o controle de patógenos através de compostos secundários presentes em óleos essenciais (OEs) vêm constituindo-se como potencial forma de controle de doenças em plantas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos OEs de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* e seus efeitos nas características morfológicas de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp., patógenos foliares da noqueira-pecã. Para isso, OEs previamente extraídos de folhas de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* tiveram seus constituintes identificados por análise em cromatografia gasosa. Os fungos foram repicados para o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), enriquecido com cinco concentrações de cada um dos OEs previamente diluídos em etanol. O controle foi constituído por meio BDA combinado com etanol e o controle positivo constituiu da suplementação do meio com fungicida Propiconazole®. As placas foram incubadas em condições controladas (25 °C, 12h fotoperíodo), sendo avaliado o crescimento das colônias diariamente e após o fim do experimento, caracterizado a esporulação, dimensões de conídios e ramoconídios (quando presente), coloração da colônia e modo de ação dos óleos. Ao final do teste, também foi avaliado o efeito de cada OE na concentração de 1,00 µL. mL⁻¹. Colônias fúngicas foram selecionadas para a visualização das características morfológicas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). A análise estatística deu-se em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. O óleo essencial de *O. gratissimum* foi composto majoritariamente por Eugenol (86,84%) e *H. ringens* por Pulgona (56,72%). Ambos OEs inibiram fortemente o desenvolvimento micelial na concentração 1,00 e 1,25 µL. mL⁻¹. Os isolados apresentaram taxa de crescimento micelial, esporulação, tamanho e comprimento de conídios influenciadas em pelo menos uma das concentrações utilizadas para cada OE. Quando comparado os OEs, houve efeito significativo em algumas variáveis analisadas e o fator isolado foi o mais influente. Em MEV, foram constatadas deformações nas hifas, devido ao rompimento da membrana e extravasamento do citoplasma celular. Os resultados obtidos por este trabalho demonstram a atividade antifúngica dos OEs de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* contra *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

Palavras chave: Extrativos vegetais. Fitopatógenos. Controle natural. Microscopia.

ABSTRACT

ESSENTIAL OILS IN THE “IN VITRO” CONTROL OF FOLIAR PATHOGENS ASSOCIATED WITH *Carya illinoensis*

AUTHOR: LUCAS GRACIOLLI SAVIAN
ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch, known as pecan is a native forest species from north american and was introduced in Brazil around 1915. Currently, the species is widespread mainly in the southern region of the country, where it has great economic importance. Like any crop, a pecan is subject to diseases and illnesses that can affect the viability of orchards. In recent years, scab, caused by *Cladosporium* spp. and a leaf spot caused by *Pestalotiopsis* spp. have caused damage to Brazilian orchards and so far, there are no efficient ways to control these diseases. The use of chemicals and the resulting problems triggered a search for control methods that had a reduced environmental impact. In this context, the control of pathogens through secondary compounds present in essential oils are shown as a potential form of disease control in plants. Given the above, this study aimed to evaluate the antifungal activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* and their effects on morphological characteristics of *Cladosporium* spp. and *Pestalotiopsis* spp., pecan leaf pathogens. For this, essential oils (EO) extracted from leaves of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* suffered its components caused by gas chromatographic analysis. were transfered to Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium, enriched with five different variations of each of the EO initially diluted in ethanol. The control consisted of PDA combined with ethanol and the positive control consisted of supplementation with Propiconazole® fungicide medium. The plates were incubated under controlled conditions (25 °C, 12h photoperiod), and the growth of the daily colonies was evaluated and after the end of the experiment, the sporulation, conidia and ramoconidia dimensions (when present), colony color and action mode of oils. At the end of the test, fungal colonies were selected for morphological characteristics responses in the scanning electron microscope (SEM). Statistical analysis was performed in a completely randomized design (CRD) with five replications. *Ocimum gratissimum* essential oil was mostly composed of Eugenol (86.84%), while *Hesperozygis ringens* the majority was Pulegone (56.72%). Both EO strongly inhibited mycelial growth of *Cladosporium* spp. and *Pestalotiopsis* spp. at concentrations 1.00 and 1.25 µL. The isolates showed mycelial growth rate, sporulation, conidia size and length influenced by at least one of the concentrations used for each EO. When comparing the OEs, there was a significant effect on some variables analyzed and the isolated factor was the most influential. In SEM, severe deformations in the fungal hyphae were observed due to membrane rupture and cytoplasm cellular extravasation. The results obtained by this work demonstrate the antifungal activity of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* EO against *Cladosporium* spp. and *Pestalotiopsis* spp.

Keywords: Plant Extractives. Plant Pathogens. Natural Control. Microscopy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Código do isolado, espécie fúngica, nome da doença, codificação Genbank e autor/referência dos isolados utilizados neste trabalho.....	25
Tabela 2 - Composição química, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no óleo essencial de folhas de <i>Ocimum gratissimum</i>	31
Tabela 3 - Composição química, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no óleo essencial de folhas de <i>Hesperozygis ringens</i>	34
Tabela 4 - Taxa de crescimento micelial de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	37
Tabela 5 - Inibição do crescimento micelial de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	39
Tabela 6 - Comprimento de conídios de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	41
Tabela 7 - Largura de conídios de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	42
Tabela 8 - Tamanho de ramoconídios de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	43
Tabela 9 - Taxa de crescimento micelial de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	45
Tabela 10 - Inibição do crescimento micelial de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	46
Tabela 11 - Tamanho de conídios de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	48
Tabela 12 - Taxa de crescimento micelial de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Hesperozygis ringens</i>	51
Tabela 13 - Inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	52
Tabela 14 - Dimensões de conídios de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	54

Tabela 15 - Tamanho de ramoconídios de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	55
Tabela 16 - Taxa de crescimento micelial de colônias de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	57
Tabela 17 - Inibição do crescimento micelial de colônias de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	58
Tabela 18 - Tamanho de conídios de colônias de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	60
Tabela 19 - Diâmetro final obtido de três colônias de <i>Cladosporium</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	62
Tabela 20- Tamanho de conídios de três colônias de <i>Cladosporium</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	64
Tabela 21- Tamanho de conídio de três colônias de <i>Cladosporium</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	65
Tabela 22 – Diâmetro final de colônia de duas colônias de <i>Pestalotiopsis</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	65
Tabela 23 – Comprimento de conídios de duas colônias de <i>Pestalotiopsis</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características de <i>Cladosporium</i> spp.	17
Figura 2 - Aspecto morfológico de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	18
Figura 3 - Aspecto geral da planta de alfavaca-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i>)	21
Figura 4 - Aspecto geral da planta de espanta-pulga (<i>Hesperozygis ringens</i>)	22
Figura 5 - Resumo das atividades desenvolvidas nesta dissertação	29
Figura 6 - Representação gráfica dos resultados da análise de regressão para o diâmetro da colônia de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	36
Figura 7 - Esporulação de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	40
Figura 8 - Representação gráfica de análise de regressão para o diâmetro final da colônia de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	44
Figura 9 - Esporulação de colônias de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de <i>Ocimum gratissimum</i>	47
Figura 10 - Análise de regressão para o diâmetro da colônia de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	50
Figura 11 - Esporulação de colônias de três isolados de <i>Cladosporium</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	53
Figura 12 - Análise de regressão para o Diâmetro da colônia de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	56
Figura 13 - Esporulação de colônias de dois isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i>	59
Figura 14 - Esporulação de três colônias de <i>Cladosporium</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	63
Figura 15 - Esporulação de duas colônias de <i>Pestalotiopsis</i> spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OE1), <i>Hesperozygis ringens</i> (OE2) e etanol (CN).	66
Figura 16 - Microscopia de varredura de colônias de <i>Cladosporium cladosporioides</i> cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	69
Figura 17 - Microscopia de varredura de colônias de <i>Pestalotiopsis clavispora</i> cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>Carya illinoensis</i> (WANGENH.) K. KOCH.....	14
2.2	MANCHAS FOLIARES.....	15
2.3	O GÊNERO <i>Cladosporium</i>	16
2.4	O GÊNERO <i>Pestalotiopsis</i>	17
2.5	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
2.5.1	Espécies produtoras de óleos essenciais	20
2.5.1.1	<i>Ocimum gratissimum</i>	20
2.5.1.2	<i>Hesperozygis ringens</i>	21
2.5.2	Óleos essenciais no controle de fungos patogênicos	22
2.6	ARMAZENAGEM DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	FUNGOS UTILIZADOS E LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	24
3.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
3.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	26
3.4.1	Avaliação do crescimento micelial	26
3.4.2	Formação e caracterização de esporos	27
3.4.3	Viabilidade fúngica	27
3.5	COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA APRESENTADA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
3.6	COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS E MODO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
3.7	CARACTERIZAÇÃO DE ESPOROS POR MICROSCOPIA DE VARREDURA.....	28
3.8	RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	29
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

4.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	30
4.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>Ocimum gratissimum</i>	35
4.2.1	Atividade antifúngica de <i>Ocimum gratissimum</i> sobre <i>Cladosporium spp.</i>.....	35
4.2.2	Atividade antifúngica de <i>Ocimum gratissimum</i> sobre <i>Pestalotiopsis spp.</i>.....	43
4.2.3	Coloração das colônias de <i>Cladosporium spp.</i> e <i>Pestalotiopsis spp.</i> submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> e modo de ação.	48
4.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>Hesperozygis ringens</i>	49
4.3.1	Atividade antifúngica de <i>Hesperozygis ringens</i> sobre <i>Cladosporium spp.</i>.....	49
4.3.2	Atividade antifúngica de <i>Hesperozygis ringens</i> sobre <i>Pestalotiopsis spp.</i>.....	55
4.3.3	Colorações das colônias de <i>Cladosporium spp.</i> e <i>Pestalotiopsis spp.</i> submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i> e modo de ação	61
4.4	COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA APRESENTADA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS	61
4.4	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.....	67
5	CONCLUSÕES.....	71
	<u>REFERÊNCIAS</u>	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior país em área geográfica e o que mais possui terras cultiváveis (IBGE, 2016). Sua posição geográfica, características de solo e relevo criam vários climas, permitindo a caracterização de diferentes ecossistemas, o que possibilita a exploração comercial de plantas de diferentes partes do mundo.

A noqueira-pecã [(*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] é uma espécie da família Juglandaceae, originária das florestas temperadas da América do Norte e foi introduzida no Brasil em 1915, por imigrantes americanos, no estado de São Paulo. Entretanto, foi no estado do Rio Grande do Sul que a cultura ganhou destaque, sobretudo pelo clima favorável. Nas últimas duas décadas, a área destinada a pecanicultura no estado vem aumentando significativamente, ano após ano devido ao consumo cada vez maior de nozes e um retorno financeiro satisfatório para os produtores (FRONZA; HAMANN, 2016).

Conforme dados disponibilizados por Lesina (2020), citando a Associação Brasileira de Nozes, Castanhas e Frutas Secas (ABNC), o Brasil alcançou no ano de 2019, 3,5 mil toneladas de noz-pecã, tornando-se o 4º maior produtor mundial, atrás somente do México, Estados Unidos e África do Sul. Dentre os estados com área destinada a pecanicultura no Brasil, o Rio Grande do Sul é o estado com mais hectares. Segundo dados da câmara setorial da noz-pecã existem no estado aproximadamente quatro mil hectares com noqueira-pecã, que produziram segundo dados do mesmo órgão 2,5 mil toneladas na safra de 2016/2017 (SEAPDR,2017).

O cultivo da noqueira-pecã no Brasil é realizado principalmente, por pequenos agricultores, existindo ainda médias e grandes propriedades especializadas no cultivo. Além do bom rendimento da cultura (preço pago pelo quilograma da noz atrativo – internacionalmente o preço médio é de US\$ 4,00), a possibilidade de consórcio com outras culturas agrícolas e pecuária em sistemas agrosilvipastoris é um fator que estimula sua implementação por parte dos pequenos proprietários de terras, já que possibilita um incremento na renda da propriedade (MARTINS et al., 2017).

Assim como outras culturas florestais e agrícolas, a noqueira-pecã está sujeita a pragas e doenças, que podem comprometer a rentabilidade do cultivo. No Brasil, várias doenças já foram identificadas causando danos aos pomares. Dentre as causadas por fungos, destacam-se a “sarna”, ocasionadas por espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* (WALKER et al., 2016), a mancha foliar, causada por *Pestalotiopsis* spp. (LAZAROTTO et al., 2014a), a

podridão de raízes (LAZAROTTO et al., 2014b) e a murcha vascular (ROLIM, 2019) ambas causadas por *Fusarium* spp. As duas primeiras doenças são as mais comuns nos plantios no sul do Brasil e afetam plantas desde a fase de mudas até a em franca produção.

Problemas fitossanitários são comuns em monocultivos agrícolas e florestais e são favorecidos ou minimizado por práticas culturais, assim como condições climáticas (ASSIS, 2006). Fungos causadores de manchas foliares, em especial, podem causar sérios danos ao hospedeiro, como a redução da área fotossintética, desfolha prematura, restrição do desenvolvimento dos frutos e até morte da planta (FERREIRA, 1989).

O uso de produtos químicos e os problemas causados, como a contaminação do meio ambiente e da própria sociedade, vem desencadeando a busca por métodos de controle que tenham um impacto ambiental reduzido (KNAAK; FIÚZA, 2010). Nesse contexto, o controle de patógenos, através de compostos secundários presentes no extrato bruto ou em óleo essencial (OE) de plantas medicinais e de espécies florestais, vêm constituindo-se como potencial forma de controle de doenças em plantas (COSTA et al., 2011; BRESSAN et al., 2018). Numerosas pesquisas têm provado a eficácia de extratos e óleos essenciais de plantas no controle de fungos patogênicos, inibindo parcial ou totalmente o desenvolvimento *in vitro* (PINHEIRO, 2014; SOUZA et al., 2018).

Dentre os óleos essenciais utilizados no controle de fitopatógenos, destacam-se os óleos produzidos por espécies das famílias Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae e Lamiaceae, dentre outras. As lamiáceas são conhecidas por apresentarem atividade biológica (SIMÕES; SPITZER, 2004), e alguns gêneros dentro desta família destacam-se pela alta rentabilidade apresentada quanto aos óleos essenciais. *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Hesperozygis ringens* (Benth.) E. (espanta-pulga), são duas espécies da família Lamiaceae, cujos OEs vêm apresentando boa atividade antimicrobiana antiparasitária e rendimento satisfatórios quando comparadas com outras espécies produtoras de OEs (OLIVEIRA et al., 2016; PINHEIRO, 2014).

Acredita-se que a atividade antimicrobiana apresentada por muitos óleos essenciais é resultado da capacidade dos componentes presentes nos OEs de romper e degradar a parede e membrana celular (ISMAN; MACHIAL, 2006). Avaliando em microscópio eletrônico de varredura estruturas de *Phakopsora pachyrhizi*, fungo responsável por ocasionar a ferrugem asiática na soja (*Glicine max*) submetidas a diferentes óleos essenciais (dentre eles *Thymus vulgaris* – Lamiaceae), Medice et al. (2007) constataram que as plantas com menor incidência da doença eram as que apresentaram uredosporos com alterações estruturais.

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* nas características morfológicas de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Carya illinoensis* (WANGENH.) K. KOCH

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch) é uma espécie florestal pertencente à família das Juglandáceas. É originária da América do Norte, distribuindo-se naturalmente por uma faixa de terra que se estende desde o nordeste do México até o estado Norte-Americano de Illinois, passando pela bacia hidrográfica do rio Mississippi. A noqueira-pecã, é, assim como as outras cinquenta espécies da família Juglandaceae, um dos principais componentes do ecossistema das florestas decíduas do leste da América do Norte, sendo utilizada a milhares de anos por animais selvagens e humanos como fonte de alimento. (REYES-VÁZQUEZ, et al., 2016). É uma espécie de grande porte, podendo atingir até 60 metros de altura, 40 de diâmetro de copa, circunferência de tronco de 2 metros (GILMAN; WATSON, 1993), decídua, com folhas grandes, de até 50 cm, possuindo numerosos folíolos (FRONZA; HAMMAN, 2016).

O consumo de nozes tem aumentado anualmente devido a rica composição nutricional das mesmas, que proporcionam muitos benefícios a saúde humana quando ingeridas. A presença de macro e micronutrientes que estão relacionados a prevenção de doenças como o Alzheimer, Parkinson, e alguns tipos de câncer, aumentou o interesse pelas amêndoas (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007). Além disso, as amêndoas são ricas em vitaminas, proteínas, ômega 3 e 6, que auxiliam na prevenção de doenças do coração e diante da demanda, muitos agricultores passaram a cultivar a planta em suas propriedades.

Segundo Martins et al. (2018), nos últimos quinze anos a produção mundial de frutos secos praticamente dobrou, passando de cerca de 2000000 mil toneladas em 2004 para 4000000 em 2018. Ainda segundo o autor, quando se analisa o incremento na produção é possível constatar que a noz-pecã ficou em 4º lugar em termos de incremento de percentual de produção dentre todos os frutos secos, com 74%, um valor bem expressivo, embora relativamente inferior ao constatado para sua parente próxima, a noz-europeia (*Juglans regia*), com 142%.

Apesar de no Brasil os plantios estarem destinados a produção de nozes, Gatto et al. (2008) afirmam que outras possibilidades podem ser dadas aos espécimes, já que estudos

comprovaram maleabilidade elevada da madeira da nogueira-pecã. Ainda segundo os autores, a maleabilidade elevada é ideal para a fabricação de móveis vergados, o que pode agregar maior valor comercial à espécie.

2.2 MANCHAS FOLIARES

As folhas são, na maioria dos organismos fotossintetizantes, responsáveis pelo processo fotossintético, essencial a vida. Neste sentido, a ocorrência de manchas foliares interferem diretamente no processo fotossintético e indiretamente afetam o desenvolvimento e o processo reprodutivo das plantas, pois podem desencadear desfolhamento precoce e comprometimento de órgãos florais e frutos, que acabam sendo abortados pela falta de glicose originada do processo fotossintético deficitário (BENDENDO, 2011).

As manchas foliares são as doenças de plantas mais prevalentes e podem ser causadas por uma série de patógenos (HORST, 2013). As ocasionadas por fungos vêm causando prejuízos em espécies agrícolas e florestais a centenas de anos. Muitas dessas doenças, ocasionalmente levaram ao colapso não só de plantações, mas também da sociedade que delas dependia. Algumas epidemias tornaram-se famosas, como a catástrofe de Bengala, causada por *Cochliobolus miyabeanus*, que causou danos de 90% na produção de arroz, desencadeando a morte de milhões de pessoas pela fome. No Brasil, a outrora promissora indústria da exploração do látex da seringueira (*Hevea brasiliense*) na região amazônica entrou em colapso quando *Microcyclus ulei* passou a acometer os plantios no início do século XX (BENDENDO, 2011).

Além deste patógeno, outros também acometem a cultura da seringueira, como *Thanatephorus cucumeris*, conhecido por ocasionar a mancha areolada (BASSETO et al., 2019), *Colletotrichum* spp., responsável pela antracnose (GONÇALVES et al., 2017) e *Alternaria* spp., responsável pela mancha-de-alternária (MOREIRA et al., 2017), demonstrando uma ampla diversidade de gêneros fúngicos como causadores de danos não só em culturas agrícolas como também florestais.

Outras culturas florestais também são atingidas por manchas foliares, como a cultura do açazeiro, a qual tem-se relatado *Exserohilum rostratum* (anamorfo de *Setosphaeria rostrata*) causando manchas foliares no Brasil (Poltronieri et al., 2008), e eucalipto, acometida pela mancha de *cylindrocladium*, a mancha de *coniella* a mancha de *Mycosphaerella* e a mancha de *Pestalotiopsis* como doenças importantes (ALFENAS et al. 2009).

2.3 O GÊNERO *Cladosporium*

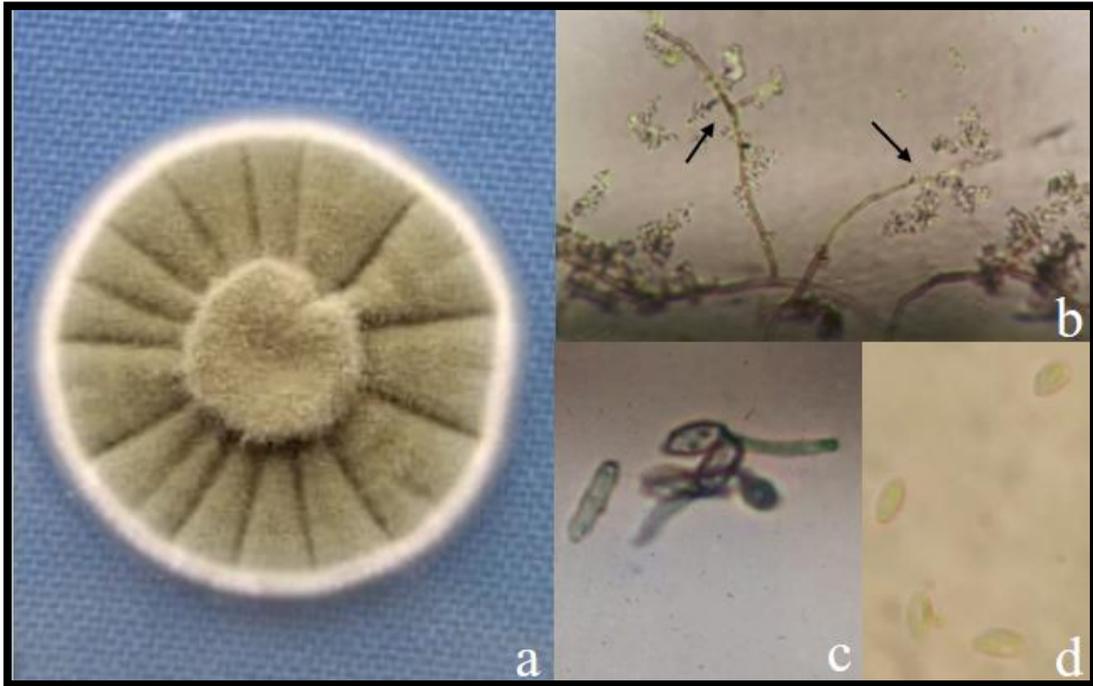
Cladosporium spp. é um dos mais heterogêneos gêneros fúngicos que se conhece, abrangendo mais de 770 espécies (DUGAN et al 2004). A alta diversidade deste grupo de organismos é atribuída não só a elevada capacidade de adaptação do gênero (podendo habitar o solo, ser patógeno de humanos, parasitas de plantas, etc.) mas também, porque até recentemente, qualquer fungo hifomiceto dematiáceo cujos conídios são formados em cadeias acropetais, era alocado dentro do gênero, representando um obstáculo para estudos de muitas espécies (BENSCH et al, 2012). Esta classificação confusa ainda pode ser observada em outros gêneros dentro da família mycosphaerellaceae, como *Cercospora*, por exemplo, devido a ambiguidade de características morfológicas (FERREIRA et al., 2019).

Cladosporium spp. é comumente encontrado causando doenças em quase todos os tipos de plantas, sejam elas gramíneas ou plantas de porte arbóreo (BENSCH et al., 2012). Como causadores de manchas foliares, as espécies de *Cladosporium* são conhecidas por ocasionar danos. Como exemplos, pode-se citar *Cladosporium tenuissimum* como patógeno de folhas de mamona (*Ricinus communis*) (LIU et al., 2019) e alfafa (*Medicago sativa*) (HAN, et al., 2019). *C. cladosporioides* foi relatado como patógeno em folhas de mamoeiro (*Carica papaya*) (CHEN et al. 2009), enquanto que *C. sphaerospermum* foi associado a danos em folhas de aloe vera (*Aloe vera*) (AVASTHI et al., 2016).

No cultivo da noqueira-pecã, em escala mundial, *Cladosporium* spp. configura-se como o principal patógeno que acomete os pomares. *C. caryigenum* (sin. *Fusicladium effusum*) recentemente renomeado para *Venturia effusa* é a espécie mais difundida sobre as regiões produtoras da América do Norte e sul da África, onde causa danos em folhas, flores ramos e frutos. O patógeno também foi identificado na Argentina (MANTZ, et al. 2009), embora naquele país sua presença nunca foi comprovada efetivamente, já que os autores consideraram apenas as características morfológicas. Na região sul do Brasil, pelo menos três espécies foram identificadas ocasionando danos aos cultivos de noqueira-pecã: *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* (WALKER et al., 2016).

A maioria das espécies do gênero *Cladosporium* apresenta em meio de cultivo coloração acastanhada ou olivácea, esporulação abundante e crescimento micelial lento (BENSCH et al., 2012), quando comparado com outros gêneros. Além disso, *Cladosporium* spp. é caracterizado por conidióforos altos e escuros, muitas vezes ramificado perto do ápice de onde saem os conídios ovóides de tonalidades negras a oliváceas (Figura 1) (BARNETT; HUNTER, 1998).

Figura 1 - Características de *Cladosporium* spp.



Onde: a: Aspecto geral de uma colônia de *Cladosporium* sp. em meio de cultivo BDA visto ao microscópio estereoscópico. b: Aspecto geral de hifas modificadas em microscópio ótico (40x) com conidióforos indicados pelas setas. c e d: Detalhe das estruturas reprodutivas de uma colônia com presença de esporo em forma de garrafa (ramoconídio secundário - c) e ovoides (d).

Fonte: o autor.

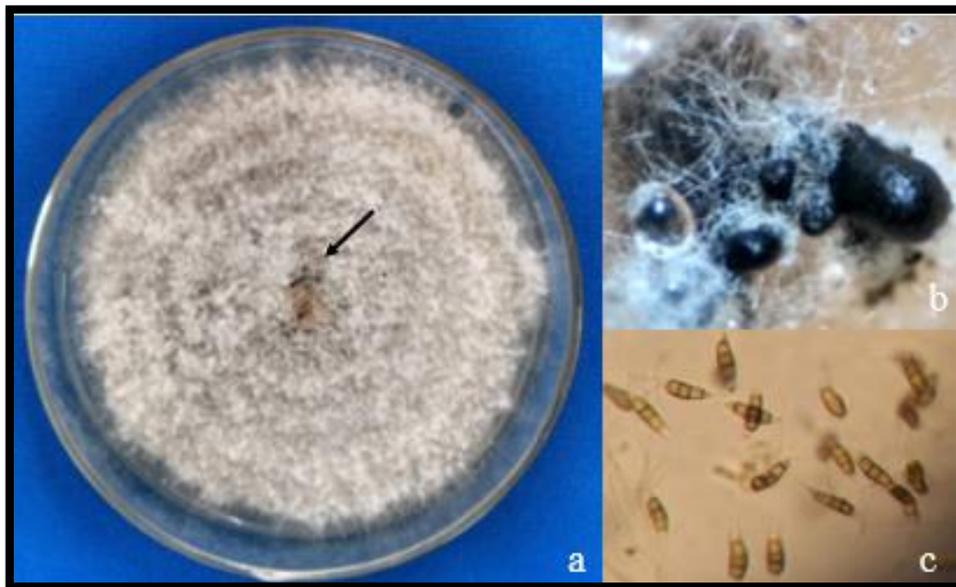
2.4 O GÊNERO *Pestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* (sin. *Pestalotia*) compreende espécies fúngicas com conídios multi-septados, fusiformes, com apêndices em uma ou ambas as extremidades e com células melanizadas (Figura 2-c) (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Desde sua criação em 1949, o gênero é fonte de intenso estudo filogenético, e muitos taxonomistas vêm tentando separar as espécies por tamanho, número de septos, pigmentação do conídio e ausência ou presença de apêndices. Maharachchikumbura et al. (2012), por exemplo, testaram 10 regiões gênicas aliadas a caracteres morfológicos e ainda obtiveram resultados variados para alguns espécimes. Recentemente, uma revisão sobre o gênero foi apresentada por Maharachchikumbura et al., (2014), que através de característica morfológicas e moleculares propuseram a divisão do gênero em três (*Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*). Neste sentido, *Pestalotiopsis clavispora* por exemplo, foi realocado em *Neopestalotiopsis*, enquanto que *P. cocculi* permaneceu em *Pestalotiopsis*.

Apesar de divergências entre muitos pesquisadores a respeito da classificação de espécies ou da divisão do gênero, *Pestalotiopsis* spp. é conhecido por causarem manchas foliares (ZHANG et al., 2012), embora outras doenças já tenham sido associadas a diferentes espécies do gênero, como cancro (BORRERO et al., 2018) e podridão de raízes (OBREGÓN et al., 2018).

Como patógeno foliar, *Pestalotiopsis* spp. é conhecido por causar danos em muitas espécies arbóreas, como alfeneiro (*Ligustrum lucidum*) (CHEN et al., 2019), macadamieira (*Macadamia integrifolia*) (SANTOS et al., 2019), macieira (*Malus domestica*) (SUN; CAO, 1990), mirtilheiro (*Vaccinium myrtillus*) (LUAN et al., 2008), goiabeira (*Psidium guajava*) (KEITH et al., 2006), mangueira (*Mangifera indica*) (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014), dentre outras. No cultivo da noqueira-pecã, espécies do gênero foram identificadas como agentes patogênicos no Brasil por Lazarotto et al., (2014a). Dentre os sintomas relatados pelos autores, destacam-se por bordas irregulares, com coloração marrom-clara e com pontuações escuras (acérvulos).

Figura 2 - Aspecto morfológico de *Pestalotiopsis* spp.



Onde: a: aspecto geral de uma colônia de *Pestalotiopsis* sp. em meio de cultivo BDA visto ao microscópio estereoscópico, com presença de acérvulos em meio ao micélio (seta). b: detalhe dos acérvulos em microscópio estereoscópico. c: conídios de *Pestalotiopsis* sp. em vistos ao microscópio (40x).

Fonte: o autor

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os vegetais produzem grandes quantidades de compostos orgânicos que podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são sintetizados por reações químicas intracelulares que utilizam clorofila, carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo, para a fotossíntese, fonte de energia, transporte de solutos além do controle e transmissão genética das células. Esses processos são essenciais à vida, por isso têm distribuição universal pelo reino vegetal. Por sua vez, substâncias que não têm função direta no desenvolvimento dos vegetais (por serem produzidas por um número restrito de plantas) são denominados metabólitos secundários (TAIZ; ZIEGLER; MASSIMO, 2017).

Os óleos essenciais (OEs), também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências são sintetizados exclusivamente pelos vegetais. São compostos formados por uma mistura heterogênea de substâncias (com restritas exceções), de baixo peso molecular. Os OEs são oriundos do metabolismo secundário, podendo estar presentes em qualquer parte de um vegetal, ou em locais específicos, como na superfície das folhas, em tricomas glandulares, em células parenquimáticas ou em órgãos no interior de tecidos vegetais, como canais oleíferos ou bolsas lisígenas. São caracterizados pela coloração que varia de transparente a amarela (com poucas exceções), aromáticos e com solubilidade apenas em solventes orgânicos, como éteres por exemplo (NAZZARO et al., 2013)

Na natureza, os vegetais estão expostos a uma vasta gama de inimigos potenciais, como bactérias, fungos, nematoides, insetos e outros animais herbívoros, além de estresses abióticos. Conforme Taiz, Ziegler e Massimo (2017), diferentemente de outros organismos, os vegetais não conseguem deslocar-se para outros locais evitando tais inimigos, por isso, desenvolveram outros mecanismos de proteção). Além disso, segundo os mesmos autores, muitas plantas superiores (Magnoliophytas) desenvolveram técnicas elaboradas para sobrevivência e perpetuação de suas espécies, e têm os OEs como um importante constituinte desse processo. Segundo alguns pesquisadores, muitas espécies de plantas utilizam OEs e outros componentes em seu ecossistema de maneira sinérgica. Várias pesquisas têm demonstrado distintas funções ecológicas dos OEs, como atração de polinizadores, proteção contra temperaturas elevadas, dentre outras.

2.5.1 Espécies produtoras de óleos essenciais

Os OEs podem ser encontrados em cerca de cinquenta famílias botânicas, sobretudo em dicotiledôneas como Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae e Rutaceae, e, em muitas dessas, com atividades biológicas conhecidas. Entretanto, devido a heterogeneidade dos compostos presente em cada planta e a influência de fatores externos e fenotípicos na composição do OE, na maioria das vezes não se têm uma caracterização específica da ação do óleo essencial frente a fungos fitopatogênicos (BRUNETON, 2001; FIGUEIREDO et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2004).

As lamiáceas compreendem um conjunto de aproximadamente, 200 gêneros e 3200 espécies de distribuição global, apresentam importantes compostos biossintetizados pelo metabolismo secundário, dentre os quais estão óleos essenciais, que são muito empregados em aromaterapia (LIMA; CARDOSO, 2007).

2.5.1.1 *Ocimum gratissimum*

Ocimum gratissimum, conhecida como alfavaca-cravo, é uma espécie herbácea da família das Lamiáceas (Figura 3) de origem ainda incerta, mas difundida globalmente. Muitos estudos descrevem a origem da espécie como sendo na África (PINO; ROSADO; FUENTES, 1996), enquanto outros descrevem o centro de origem pertencente a Ásia. Apesar da imprecisão quanto sua área de ocorrência natural, suas propriedades são conhecidas na medicina tradicional em muitos locais do mundo, com propriedades analgésicas (DUBEY et al., 2000), antimicrobianas (KÉITA et al., 2000), antifúngicas (ADEBOLU; OLADIMEJI, 2005), dentre muitas outras. Além disso, esta espécie, assim como outras do gênero *Ocimum*, é uma importante fonte de Eugenol para a indústria de perfumaria e cosméticos.

Quanto as características botânicas os estudos são escassos, entretanto, Albuquerque e Andrade (1998) caracterizam a espécie como sendo uma herbácea de 2,5m de altura, com ramos abertos, ramificados, apresentando folhas pequenas, ovaladas e elípticas. Os autores ainda destacam a inflorescência robusta apresentada pela espécie e que quando analisadas apresentam altos teores de óleos essenciais.

Figura 3 - Aspecto geral da planta de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*)



Fonte: Sheila Gregory, Royal Botanic Gardens Kew.

2.5.1.2 *Hesperozygis ringens*

Hesperozygis ringens (Benth.) E. é uma erva aromática (Figura 4) da família Lamiaceae, endêmica do Bioma Pampa, ocorrendo esparsamente associada a áreas de afloramento rochoso, no estado do Rio Grande do Sul. Conhecida popularmente como espanta-pulga, a espécie é utilizada como inseticida natural. É fonte de poucos estudos, concentrados principalmente sobre a composição e potencialidades de seu óleo essencial (PINHEIRO, 2014). Devido a área de ocorrência restrita ao bioma pampa e a predação, principalmente pelo gado a espécie entrou na lista vermelha da IUCN (Union for Conservation of Nature), com status de ameaçada de extinção. Além disso, a espécie encontra-se em status de vulnerável nas listas da portaria 443/2014 do Ministério do Meio Ambiente e 52109/2014 da SEMA-RS (Secretaria do Meio Ambiente e Infraestrutura).

Fracaro e Echeverriagay (2006), descreveram as características botânicas da espécie, que se caracteriza como um arbusto lenhoso, de até 50 cm de altura, ramificado, com folhas ovado robóides de tamanho pequeno. Suas flores provêm de inflorescências em forma de espigas terminais, cujos cálices tem coloração esverdeada e a corola violetácea.

Estudando o óleo essencial da espécie, Von Poser et al. (1996), e Pinheiro (2014), encontraram como constituinte majoritário a Pulegona. Além disso, os autores comprovaram atividade alelopática e antifúngica, respectivamente. Ribeiro et al. (2010), indicaram que o OE da espécie apresenta potencial larvicida e afeta a produção de ovos de parasitas de bovinos.

Rentemente Rosa et al. (2019), relataram resultados interessantes de extratos de *Hesperozygis ringens* no controle da proliferação de bactérias patogênicas de peixes *in vitro* e também *in vivo*.

Figura 4 - Aspecto geral da planta de espanta-pulga (*Hesperozygis ringens*)



Fonte: Sérgio Bordignon, Flora digital RS.

2.5.2 Óleos essenciais no controle de fungos patogênicos

Os óleos essenciais (OEs) de espécies vegetais têm sido utilizados para a constituição de uma grande gama de produtos, devido no geral a suas fácil obtenção e grande quantidade de compostos úteis ao homem. Estes produtos têm destaque nas indústrias de perfumaria, alimentos e também de produtos farmacêuticos. Os OEs, essências ou óleos voláteis etéreos, como também são conhecidos, têm funções que são de suma importância para a sobrevivência de certos tipos das plantas, dentre elas inibir a germinação de agentes infecciosos, proteger contra predadores, evitar a perda acentuada de água, proteção contra temperaturas elevadas e atração de polinizadores (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; SIMÕES; SPITZER, 2004; BRUNETON, 1991).

Estes óleos essenciais são substâncias secundárias, produzidas por um número restrito de plantas e caracterizam-se por estarem presentes em diversas partes vegetais, tais como folhas, sementes, frutos, flores, galhos, lenho, dentre outras partes. Entretanto, apenas uns números restritos de famílias têm demonstrado propriedades biológicas, atuando na interação planta-inseto e planta-planta, bem como na defesa de agentes infecciosos como fungos e bactérias (SANTURIO, 2007; SINGH; PRASAD; SINHA, 1993.)

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de inibição total ou redução do desenvolvimento de patógenos, sendo que os resultados obtidos são muitas vezes superiores aos obtidos fungicidas de uso comum (CARTA et al., 1996). Estes resultados provavelmente se devem ao fato de que os óleos essenciais formam o grupo de compostos com maior número de substâncias biologicamente ativas (DI STASI, 1996).

Medice et al. (2007), encontraram resultados de até 100% de inibição da germinação *in vitro* de esporos do fungo causador da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja (*Glycine max*) quando submetidos ao óleo essencial de algumas espécies de plantas. Os autores ainda constataram 62% menos incidência da doença em folhas submetidas a estes tratamentos. Quando analisaram as estruturas fúngicas, os autores observaram uma influência direta dos óleos sobre as estruturas do patógeno, como no tamanho e na turgidez dos esporos além da degradação das hifas.

Santos et al. (2010), por sua vez, encontraram importantes taxas de redução do crescimento de três espécies fúngicas de grande importância econômica, quando submetidas a OEs de *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle*, sendo que para alguns, doses de diluição de 1:10 de óleo foi letal, causando a morte do patógeno.

Costa et al. (2011) obtiveram resultados relevantes quando submeteram fungos de grande importância econômica, como *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* spp. e *Macrophomina* sp., a aplicação de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), em testes *in vitro*. Dentre os resultados obtidos, os autores destacaram a desorganização celular, diminuição da turgidez da parede celular, e grande fragmentação de hifas.

2.6 ARMAZENAGEM DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais estão se tornando cada vez mais uma alternativa ao uso de produtos químicos, como pesticidas e fungicidas por exemplo (SATISH et al., 2007). Além disso, vem recebendo grande interesse por parte de empresas de perfumaria, cuidados pessoais e farmacêuticas, para confecção dos mais diferentes produtos. Entretanto, por serem no geral

misturas muito complexas, de alta volatilidade, os OEs podem rapidamente perder suas propriedades, o que pode comprometer a eficácia dos resultados e a segurança em processos de aromaterapia por exemplo.

O processo de oxidação é o principal degradador do OE e não pode ser revertido. Este processo ocorre principalmente em uma substância pela exposição ao oxigênio, temperaturas de secagem de material vegetal (Queiroz et al., 2018), temperaturas de armazenamento (Seify et al., 2018) e luminosidade (Misharina et al., 2003), além do método de armazenamento que têm se mostrado um fator influente na alteração de constituintes e suas propriedades dentro de cada OE (Ebadi et al., 2017). Por este motivo, após a obtenção do OE, o mesmo deve ser armazenado em material inerte, em ambientes escuros e de baixa temperatura, a fim de se diminuir a velocidade do processo de oxidação (Bukle, 2014). Além disso, os constituintes presentes no OE também influenciam na velocidade do processo de oxidação, pois possuem maior ou menor facilidade de degradação de suas cadeias de moléculas (Misharina et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FUNGOS UTILIZADOS E LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Dr^a. Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária e no Laboratório de Extrativos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Santa Maria. Os patógenos fúngicos utilizados no presente estudo (*Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.) foram obtidos da coleção de culturas da micoteca do Laboratório de Fitopatologia, sendo estes, isolados de folhas de *Carya illinoensis* por Walker et al., (2016) e Lazarotto (2013), respectivamente, e atualmente encontram-se depositados no banco de dados de sequências de nucleotídeos (GenBank) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) dos Estados Unidos. Na Tabela 1 é possível visualizar mais informações sobre os isolados patogênicos

Os isolados foram coletados em pomares no estado do Rio Grande do Sul, sendo as cidades de Uruguaiana (9RS), Santa Maria (13/12RS) e Cachoeira do Sul (16/2RS).

Tabela 1 - Código do isolado, espécie fúngica, nome da doença, codificação Genbank e autor/referência dos isolados utilizados neste trabalho

Código	Espécie	Nome da doença	Código GenBank	Autor
9RS	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Mancha de Cladosporium	KT991543	Walker, 2016
16/2RS	<i>Cladosporium subuliforme</i>	Mancha de Cladosporium	KT995114	Walker, 2016
13/12RS	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	Mancha de Cladosporium	KT991563	Walker, 2016
P10	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	Mancha de Pestalotiopsis	KC837104	Lazarotto, 2013
P11	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	Mancha de Pestalotiopsis	KC837105	Lazarotto, 2013

Fonte: o autor

3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* foram obtidos do Laboratório de Extrativos Vegetais, onde encontravam-se armazenados em vidro âmbar e acomodados em freezer a -4°C. Ambos OEs são provenientes de folhas, sendo o local de coleta do material vegetal de *Ocimum gratissimum* a cidade de Santa Maria, RS (SUTILLI, 2016) e do segundo, São Francisco de Assis, RS (Pinheiro, 2014). O processo de extração dos óleos contidos nas folhas foi realizado anteriormente, por método de hidrodestilação utilizando Clevenger (KOC et al., 2013) pelos autores anteriormente citados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os constituintes presentes na composição química dos OEs foram identificados por meio do cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM) Agilent 5975C. A coluna capilar utilizada foi HP5-MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm), e a energia de ionização utilizada no espectrômetro de massas foi de 70 eV. O procedimento para identificação dos constituintes dos OEs ocorreu por comparação dos índices de retenção, determinados pela utilização de uma curva de calibração de n-alcenos injetados nas condições mencionadas

anteriormente e o banco de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST) por meio do website: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.

3.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a atividade antifúngica, os propágulos fúngicos (*Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.) foram repicados para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantidos em câmara de incubação BOD ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h fotoperíodo) por sete dias. Em câmara de fluxo laminar, alíquotas dos OEs (previamente diluídas em etanol na proporção de 1:1) foram incorporadas ao meio de cultura ainda fundente, e vertidos em placas de Petri de 70 mm. Para o experimento, cinco concentrações foram utilizadas (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$). Como tratamento negativo (tratamento controle), utilizou-se placas contendo apenas BDA acrescidas de $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ de etanol, e o controle positivo foi composto por fungicida comercial Propiconazole[®], na mesma concentração ($1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$). Após a solidificação do meio de cultura, discos de 7 mm de diâmetro obtidos das colônias puras foram depositados no centro das placas. Para cada tratamento, foram feitas cinco repetições. As placas foram então incubadas em BOD ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h fotoperíodo).

3.4.1 Avaliação do crescimento micelial

O efeito dos óleos essenciais no crescimento micelial dos isolados fúngicos foi avaliado por meio de medições diárias do diâmetro das colônias em dois sentidos opostos com auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se uma média para cada repetição. Para *Pestalotiopsis* spp., as medições foram realizadas até o sétimo dia, quando o crescimento do tratamento sem OE preenchia a placa. Para *Cladosporium* spp. o final do experimento deu-se aos 16 dias, devido ao crescimento mais lento desse fungo.

Com a média dos resultados obtidos determinou-se o crescimento final, a taxa de crescimento micelial diária (TCM) foi calculada utilizando a fórmula de Nascimento et al. (2013):

$$(TCM = \frac{Dn}{n})$$

Onde: Dn: Diâmetro final da colônia; n: número de dia de incubação.

O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculado através da fórmula proposta por Rolim et al. (2019 a):

$$ICM (\%) = \frac{[(CT - Ct) * 100]}{CT}$$

Onde: CT: crescimento testemunha; Ct: crescimento tratamento.

3.4.2 Formação e caracterização de esporos

A atuação dos óleos na capacidade de formação dos esporos pelas colônias fúngicas foi avaliada para cada concentração descrita no item 3.4. Para isso, as colônias permaneceram em BOD (25± 2°C, fotoperíodo 12h) até completarem um período de dez dias no caso de *Pestalotiopsis* spp. (LAZAROTTO, 2013), e dezesseis dias para *Cladosporium* spp. Para a avaliação, quatro placas foram escolhidas aleatoriamente de cada tratamento. Acrescentou-se 10 ml de água destilada a cada placa escolhida e, na sequência, a raspagem da superfície foi feita com uma alça de Drigalski. A suspensão foi filtrada com camada dupla de gaze para um béquer. Foram acrescentadas duas gotas de Tween 80[®] na solução aquosa, na sequência, colocada para agitação no vortex por 1 min. As concentrações de esporos (esporos. mL⁻¹) presentes em cada suspensão foram determinadas com o auxílio da câmara de Neubauer. Para a caracterização, cinquenta esporos foram escolhidos aleatoriamente. As dimensões foram tomadas com micrômetro acoplado a um microscópio, na magnitude de 40x.

3.4.3 Viabilidade fúngica

A viabilidade fúngica foi avaliada conforme a metodologia descrita por Costa et al. (2011). O efeito fungistático ou fungicida do óleo essencial sobre o desenvolvimento dos fungos foi avaliado a partir da transferência dos discos contendo os micélios tratados nos testes de crescimento micelial (item 3.4) respectivamente para placas de Petri contendo apenas meio BDA. Os tratamentos em que houve desenvolvimento fúngico no teste de crescimento micelial (item 3.4) tiveram duas repetições escolhidas ao acaso para a retirada de discos (7 mm), sendo retirados três discos de cada placa, totalizando seis repetições cada. Os discos foram feitos a aproximadamente, um mesmo raio do centro da placa para a retirada de micélio com uma mesma idade aproximada. Nos tratamentos com OE em que não houve o crescimento do

micélio fúngico retirou-se o disco depositado anteriormente, transferindo-os na sequência para placas contendo apenas meio de cultura BDA.

3.5 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA APRESENTADA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para tentar elucidar os resultados apresentados por cada um dos isolados fúngicos, as variáveis diâmetro final da colônia, esporulação e dimensão de conídios foram selecionadas e os OEs comparados entre si e com o tratamento controle.

3.6 COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS E MODO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A avaliação da coloração das colônias fúngicas deu-se pela comparação das cores apresentadas pelo micélio aéreo de cada placa e sua semelhança com as cores presentes na escala de cores Munsell (2009). A avaliação da coloração dos isolados foi realizada ao final da avaliação do crescimento micelial, aos 7 e 16 dias de incubação, para *Pestalotiopsis* e *Cladosporium* spp. respectivamente.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DE ESPOROS POR MICROSCOPIA DE VARREDURA

Para a observação de estruturas em microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.4 e posteriormente, levadas ao Laboratório de Processos Ambientais do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (LAPAM/UFSM). Fragmentos de micélio fúngicos foram retirados das colônias e depositados sobre suporte de alumínio “stub”, sendo em seguida metalizados com ouro usando uma corrente de 20 mA por 90 segundos, e secados por 72h em dessecador. Por fim, as amostras foram visualizadas usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Tescan, VEGA-3G, República Tcheca) acoplado com um detector de elétrons secundários (SE).

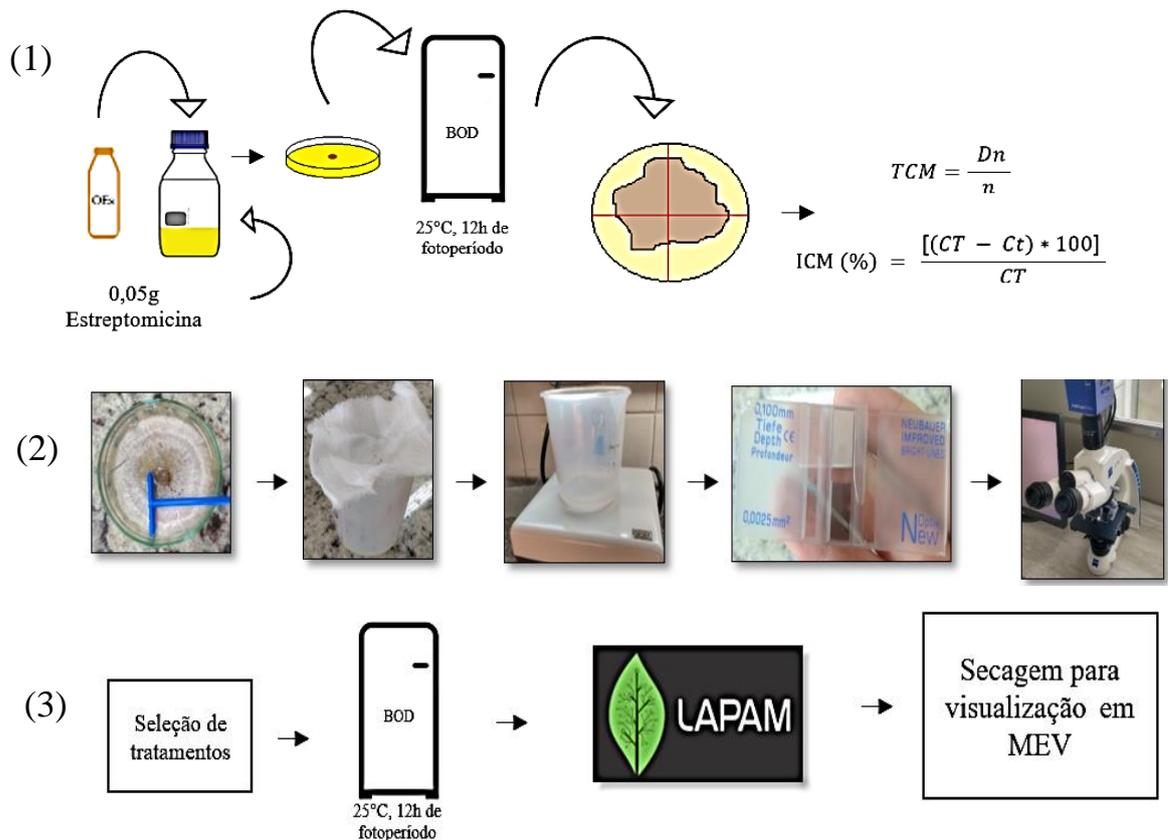
Para as imagens em MEV, foi selecionado um isolado de cada gênero e colônias submetidas a duas concentrações do OE de *O. gratissimum* (0,50 e 1,25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) além do tratamento controle (concentração 0,00).

Nos tratamentos em que houve ausência de crescimento na concentração de 1,25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, um fragmento do disco depositado sobre o meio BDA deste tratamento foi retirado e depositado sobre suporte de alumínio.

3.8 RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Na figura a seguir (Figura 5) é possível visualizar o processo de avaliação da atividade antifúngica (1), aferição da esporulação e dimensão de conídios (2) e visualização de estruturas fúngicas em microscópio eletrônico de varredura (3).

Figura 5 - Resumo das atividades desenvolvidas nesta dissertação



3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos em que não houve o desenvolvimento fúngico foram retirados da análise estatística devido à ausência de variância. Na sequência, para cada OE (*O. gratissimum* e *H. ringens*) O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (concentrações de OEs x espécies de cada gênero), com cinco repetições para cada tratamento, cada repetição foi composta por uma placa.

Os dados foram analisados por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2009). Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Além disso, a

escolha deu-se através do teste de modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados. Ao final do processo, os OEs foram comparados por meio das variáveis diâmetro final da colônia, esporulação e tamanho de conídios.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise da composição química do OE de *Ocimum gratissimum*, realizada através de cromatografia gasosa permitiu identificar 15 constituintes que representaram 99,85% da composição total (Tabela 2). Os compostos detectados em maior proporção foram Eugenol (86,84%), Trans- β -Ocimeno 6,39% Germacreno D (2,16%), Cariofileno (0,82%) e Limoneno (0,81%).

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos observados por Oliveira et al. (2016) e Mohr et al. (2016), que estudando a espécie, obtiveram um percentual de Eugenol em uma proporção de 51,84% e 7,24% respectivamente. No estudo feito por Oliveira et al. (2016), o composto majoritário foi o Linalool (32,95%) sendo Eucaliptol (21,91%) e Cânfora (11,97%) também presentes em grande quantidade. O Eucaliptol também foi identificado no OE extraído de folhas de *O. gratissimum* por Mohr et al. (2016), sendo o segundo constituinte em maior porcentagem relativa (23,81%), β -Seleneno com 8,88% e β -Cariofileno 5,31% também eram constituintes com grande porcentagem no OE analisado pelos autores. Ainda com relação ao OE de *O. gratissimum*, Charles et al. (2016), encontraram como constituintes principais os compostos γ -Terpineno (17,21%), (E) -9-octadecenoico ácido (11,85%) e Ácido oleico (10,21%), sendo que o Eugenol não estava presente na fração analisada.

É importante ressaltar que muitos fatores podem influenciar na composição do OE, um deles é a variabilidade genética entre as populações de plantas. Vieira et al. (2001) estudando populações de plantas silvestres de *Ocimum* spp. encontraram variação genética entre populações de uma mesma espécie. Além disso, muitas variações genéticas em plantas produtoras de OEs tendem a serem aproveitadas pelo homem, já que acabam sendo selecionadas por muitos anos para diferentes propósitos. Cita-se *O. basilicum*, um parente próximo de *O. gratissimum*, que apresenta pelo menos quarenta “variedades” descritas. Esta seleção natural por aromas de *Ocimum* spp. buscando espécies de interesse para a culinária, indústria de

cosméticos dentre outras, levou a formação de plantas quimiotipos, ou seja, ricas em certos constituintes (SIMON et al., 1999).

Tabela 2 - Composição química, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum*.

Pico	tRet	Constituinte	IKc	IKtab	%
1	10,39	β -Tujeno	924	920 ^N	0,117
2	10,65	α -Tujeno	930	936 ^N	0,543
3	11,81	Benzaldeído	959	959 ^N	0,514
4	12,29	Sabineno	970	971 ^N	0,243
5	12,45	β -Pino	974	975 ^N	0,412
6	13,03	β -Mirceno	988	989 ^N	0,152
7	14,59	Limoneno	1027	1027 ^N	0,81
8	14,94	Trans- β -Ocimeno	1036	1036 ^N	6,39
9	15,36	Ocimeno	1046	1046 ^N	0,213
10	16,24	cis-Tujano-4-ol	1068	1069 ^N	0,169
11	26,53	Eugenol	1348	1352 ^N	86,83
12	27,28	α -Copaeno	1374	1374 ^N	0,311
13	27,54	(-)- β -Bourboneno	1382	1382 ^N	0,146
14	27,67	NI	1386	NI	0,156
15	28,68	Cariofileno	1417	1417 ^N	0,822
16	30,62	Germacreno D	1479	1479 ^N	2,17
Total identificado					99,845

*tRet: Tempo de Retenção; IKc: Índice de retenção de Kovats calculado; IKtab: Índice de retenção de Kovats referenciado na bibliografia;; N: WebNist, 2019.

Analisando morfológicamente e quimicamente diferentes variedades dentro de *O. gratissimum* provenientes de distintos locais da Índia, Kumar et al. (2019), encontraram variação na composição do OE, inclusive dentro de indivíduos da mesma variedade. Além disso, outros fatores também são apontados como responsáveis por variações na composição

de OEs, como luz, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, parte da planta e horário da coleta (AMARAL, 2014), que podem explicar a diferente composição apresentada pelo OE detectada neste trabalho quando comparado com dados obtidos na literatura para a mesma espécie. A influência do horário da coleta na composição química de *O. gratissimum* foi constatada por Mith et al. (2016), onde folhas de um mesmo indivíduo apresentavam diferentes porcentagens de um composto conforme o horário de coleta do material vegetal. Na investigação daqueles autores, o Timol foi encontrado como constituinte majoritário em folhas, seguido de γ -Terpineno e p-Cimeno. Segundo os autores, o percentual de Timol como composto presente no OE variou de uma concentração mínima de 28,30% às 12h 30min até 37,70% às 7h, ou seja, numericamente quase dez pontos percentuais em poucas horas.

Cabe destacar que este OE permaneceu armazenado em freezer a -4°C por um período de quatro anos, o que pode ter alterado sua composição. Sutili (2016), avaliaram a composição do mesmo OE e relataram em seu estudo apenas cinco constituintes: Eugenol, (91,47) Z- β -Ocimeno (5,93), Germacreno D (1,22), β -Ocimeno e E- β -Ocimeno (0,14%), frente aos dezesseis picos encontrados nesta nova análise. Algum trabalho vem evidenciando uma maior suscetibilidade de monoterpenos a oxidação o que pode explicar em parte a menor porcentagem apresentada pelo Eugenol quando se compara as análises.

O Eugenol (IUPAC: 4-Alil-2-Metoxifenol), fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$, é um composto volátil e o principal componente ativo extraído do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Além disso, possui uma infinidade de aplicações, como anestésico para peixes (VIDAL et al., 2008) e atividade antifúngica (ARRAS; USAI, 2001). Também, é através da oxidação do Eugenol que se obtém a vanilina sintética, principal responsável pelo aroma e sabor da essência de baunilha, um importante produto utilizado na indústria alimentícia mundial (LINARD, 2008).

Para o óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (Tabela 3), a composição total dos constituintes identificados foi de 63,72%, sendo que o constituinte majoritário Pulegona, representou 54,70%. A Pulegona, (IUPAC: (R)-5-Metil-2-(1-metiletilidina), fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$, é um composto orgânico monoterpenóico, que pode ser obtido de uma grande variedade de plantas, sobretudo em gêneros da família Lamiaceae. Este composto, isolado pela primeira vez do OE de poejo (*Mentha pulegium*, - por isso o nome Pulegona), possui aroma e sabor refrescante que lembram a menta. Relatos da literatura indicam uma porcentagem maior de Pulegona como constituinte majoritário variando de 79,2 a 96,63% para *H. ringens* (SILVA et al., 2013; VON POSER et al., 1996).

Ribeiro et al. (2010) também avaliaram a composição química do OE de *H. ringens* e encontraram percentuais de Pulegona elevados (86%), enquanto o número de picos presentes no OE foi de vinte e cinco. Dolwitsch et al. (2020) por sua vez, quando analisaram a composição química espécie também encontraram Pulegona como composto majoritário, embora em quantidade bem menor que os autores anteriormente citados (64,56%) e apenas outros seis constituintes, que juntos representavam 76% da composição total.

Rosa et al. (2019), também avaliaram a composição química de folhas de *H. ringens* e encontraram Pulegona em menor quantidade (47%). Outros compostos identificados por Rosa et al. (2019), também foram identificados neste estudo, como o Espatulenol por exemplo.

Entretanto, outros estudos observaram variação entre as porcentagens de Pulegona conforme a época do ano (Pinheiro, 2014). O autor destaca que as variações nos teores do OE podem ser explicadas pelo clima da região, uma vez que as enzimas responsáveis pela formação dos terpenóides são estimuladas pelos raios ultravioletas.

Quando estudando o mesmo óleo, pode-se perceber que houve uma degradação, já que pinheiro identificou todos os constituintes dos onze picos observados. Os constituintes identificados pelo autor são em ordem de abundância: Pulegona (95,18), Limoneno (1,28), β -*E*-Ocimeno e β -Linalol (0,54), Neoisopulegol (0,31), α -Pineno (0,29), β -Cariofileno (0,27), β -Pineno (0,25), β -Miraceno (0,24), Sabineno (0,14) e 1-Octen-3-ol (<0,05%). Dos onze constituintes presentes na análise feita pelo autor, ainda estavam presentes na fração analisada recentemente Pulegona, Limoneno e β -Cariofileno.

Misharina et al., 2003, estudaram a composição do OE de manjerona (*Majorana hortensis*) durante 12 meses, realizando análise cromatográfica de três em três meses, de OE exposto a luminosidade contataram que alguns compostos se degradaram à medida que se aumentou-se o tempo de armazenamento, desaparecendo após nove meses, como no caso do α -folandreno e o α -terpineno. Outros compostos permaneceram-se praticamente inalterados, como o 4-terpenol, enquanto outros aumentaram sua porcentagem a medida que houve aumento no tempo de armazenamento, como o para-cimeno que atingiu 28% após um ano.

Ainda estudando espécies do mesmo gênero, Martini et al. (2011), constataram que a Pulegona foi o composto majoritário de folhas de *H. myrtoides*, representando mais de 44% de toda a composição do óleo essencial. Neste estudo, os autores anteriormente citados ainda destacam outro constituinte presente em grande quantidade, a Isomentona, com 32%. Estudando a composição química de várias espécies de plantas com propriedades medicinais na Turquia, Baser, Kirimer e Tümem (1998), constataram que mais de quinze espécies possuem valores altos de Pulegona, variando de 15 até mais de 85%.

Tabela 3 - Composição química, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens*

(continua)

Pico	tRet	Constituinte	IKc	IKtab	%
1	7,36	3-Metil-Ciclopentanono	846	846 ^N	0,349
2	10,66	NI	931		0,101
3	11,81	Benzaldeído	959	959 ^N	0,510
4	14,6	Limoneno	1027	1028 ^N	0,176
5	15,47	NI	1049		0,099
6	16,28	NI	1069		0,146
7	16,9	NI	1085		0,117
8	17,44	β -Linalool	1098	1098 ^N	0,749
9	20,29	NI	1173		0,259
10	21,02	NI	1193		0,254
11	21,5	NI	1206		0,255
12	21,79	NI	1214		0,377
13	22,2	NI	1226		0,408
14	22,58	Pulegona	1237	1236 ^N	54,707
15	22,76	NI	1242		0,636
16	23,05	d-p-Menth-4(8)-en-3-ono	1250	1244 ^N	0,606
17	23,34	Ascaridol	1258	1257 ^N	1,282
18	23,59	NI	1265		0,202
19	24,19	Piperona	1282	1275 ^N	1,048
20	24,31	NI	1286		13,078
21	24,76	NI	1298		0,840
22	25,15	NI	1310		0,650
23	25,49	NI	1320		0,548
24	25,99	NI	1335		0,187
25	26,28	NI	1344		1,377
26	26,69	NI	1356		5,337
27	27,03	NI	1366		0,534
28	27,53	NI	1381		0,478
29	28,12	NI	1399		3,144
30	28,54	NI	1412		0,256
31	28,67	β -Cariofileno	1417	1418 ^N	1,815
32	28,96	NI	1426		0,560
33	29,17	NI	1433		4,040
34	29,34	NI	1438		2,730
35	30,87	NI	1487		0,174
36	31,05	NI	1492		0,584

Tabela 3 - Composição química, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens*

37	31,75	NI	1516		(conclusão) 0,141
38	32,81	NI	1551		1,042
39	33,48	Espatuleno	1574	1574 ^N	0,684
40	33,64	Óxido de Cariofileno	1579	1579 ^N	1,793
41	33,78	NI	1584		0,386
Total identificado					63,719

*tRet: Tempo de Retenção; IKc: Índice de retenção de Kovats calculado; IKtab: Índice de retenção de Kovats referenciado na bibliografia; N: WebNist, 2019; NI: Não identificado.

Cabe destacar que, não foi possível identificar boa parte dos compostos presentes no OE de *H. ringens*, devido, sobretudo, a ausência de estudos com esta espécie para a comparação, o que. Estudando pela primeira vez a composição química por CG-EM do OE de *Ziziphora tenuior* uma espécie herbácea comum nas montanhas da Turquia, Sezik, Tümem e Baser (1991), também não conseguiram identificar todos os componentes presentes no OE da espécie. Para os autores, quase 25% dos constituintes não puderam ser identificados.

4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Ocimum gratissimum*

4.2.1 Atividade antifúngica de *Ocimum gratissimum* sobre *Cladosporium* spp.

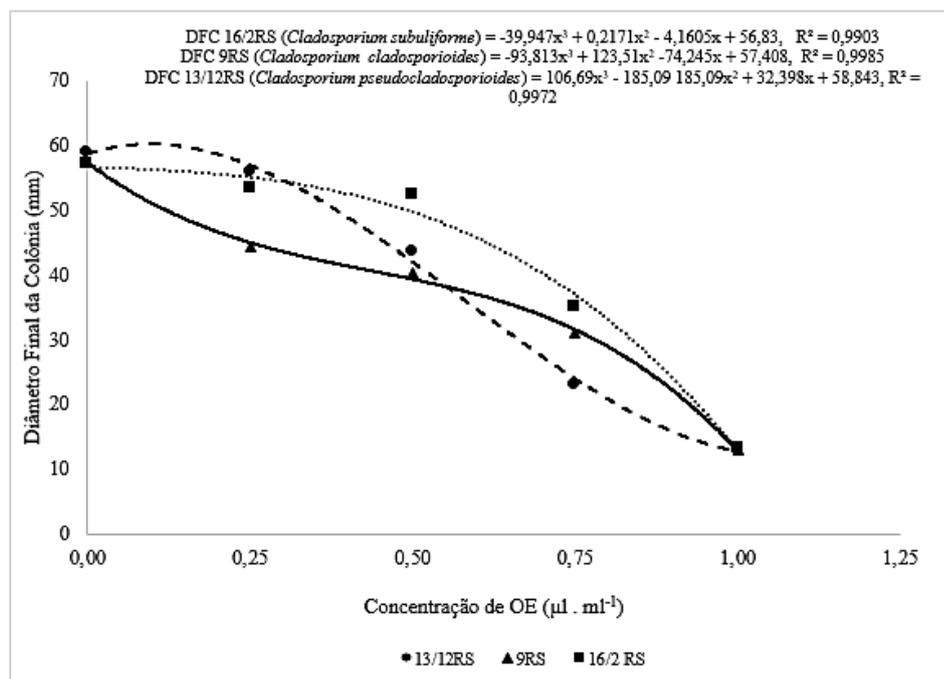
A concentração de 1,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ do OE de *Ocimum gratissimum* e do controle positivo, composto pelo fungicida, não permitiram o desenvolvimento das colônias fúngicas, e optou-se pela exclusão destes dados na análise das demais características morfológicas.

Nos tratamentos, o diâmetro final das colônias de *Cladosporium* spp. mostrou-se dependente concentração do OE de *O. gratissimum* (Figura 6), onde, em todos os isolados observou-se que os dados se ajustaram a um modelo polinomial cúbico e valor de R^2 próximos a 1,0. Os resultados de diâmetro final da colônia para cada concentração obtidos evidenciam a atividade antifúngica do OE de *O. gratissimum*, já que ocasionaram uma redução do desenvolvimento do micélio dos isolados naqueles tratamentos.

A taxa de crescimento micelial (Tabela 4) foi decrescente para todos os isolados quando se compararam as concentrações utilizadas, com exceção das concentrações 0,25 e 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para *C. subuliforme* e entre o tratamento controle e a concentração 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para o isolado

C. pseudocladosporioides. No tratamento controle, *C. pseudocladosporioides*, *C. cladosporioides* e *C. Subuliforme* apresentaram uma taxa de 3,70, 3,60 e 3,58 mm. dia⁻¹, enquanto que os mesmos isolados apresentaram uma taxa de 0,84, 0,82 e 0,82 mm. dia⁻¹ para a concentração de 1,0 µL. mL⁻¹, demonstrando uma redução superior os 77% para todos. Entre estes, ainda pode-se perceber que as taxas de crescimento apresentadas no tratamento controle não diferiram, enquanto que na concentração de 0,50 µL. mL⁻¹ todos os valores apresentados diferiram entre si, sendo as médias de *C. pseudocladosporioides* e *C. cladosporioides* respectivamente, a maior e a menor.

Figura 6 - Representação gráfica dos resultados da análise de regressão para o diâmetro da colônia de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.



Fonte: o autor.

Da Silva (2019), avaliando a taxa de crescimento micelial dos mesmos isolados de *C. pseudocladosporioides* e *C. Subuliforme* a uma concentração de 1,0 µL. mL⁻¹ de três OEs (*Nectanda grandiflora*, *N. megapotamica* e *Piper gaudichaudianum*), também encontraram diferença estatística entre as médias apresentada pelos tratamentos controle e aqueles cujas colônias estavam em contato com os OEs. Para a autora, as taxas apresentadas por *C. pseudocladosporioides* e *C. Subuliforme*, no tratamento controle, diferiram estatisticamente,

sendo que a de *C. Subuliforme* foi a maior, com 4,17 mm.dia⁻¹, contra 3,01 mm.dia⁻¹ de *C. pseudocladosporioides*.

Tabela 4 - Taxa de crescimento micelial de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.

Concentração de OE ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	Taxa de Crescimento Micelial (mm. dia ⁻¹)		
	16/2RS	9RS	13/12RS
0,00	3,58 aA*	3,60 aA	3,70 aA
0,25	3,34 bA	2,78 bB	3,50 aA
0,50	3,27 bA	2,52 cC	2,73 bB
0,75	2,21 cA	1,94 dB	1,44 cC
1,00	0,82 dA	0,82 eA	0,84 dA
CV (%)	4,92		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS: *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS: *Cladosporium pseudocladosporioides*; CV: Coeficiente de Variação.

Todas as concentrações de OE de *O. gratissimum* inibiram significativamente o desenvolvimento micelial dos isolados de *Cladosporium* spp., com exceção do isolado *C. subuliforme*, que não apresentou médias de diâmetro que diferissem estatisticamente nas concentrações de 0,25 e 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (6,60 e 8,48% menores que no tratamento controle) (Tabela 5). Para os isolados de *C. cladosporioides* e *C. pseudocladosporioides*, os valores de inibição variaram de 6,68% e 5,16%, na concentração de 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e superaram os 75% na concentração de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. O OE de *O. gratissimum* inibiu o desenvolvimento do isolado *C. cladosporioides* em 61,06% na concentração de 0,75 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e 29,57 % na concentração 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$.

Avaliando a atividade antifúngica de falsa-melissa (*Lippia alba*) também em *C. cladosporioides*, Shukla et al. (2009), encontraram valores para inibição de 50% somente com concentrações superiores a 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, o que demonstra a elevada atividade antifúngica do OE de *O. gratissimum* frente aos isolados deste estudo.

Da Silva (2019), também estudou características morfológicas dos mesmos isolados de *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* em meio de cultura acrescidos de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de

três OEs. Para *C. subuliforme*, a autora encontrou valores de inibição do crescimento micelial variando de 37,39, até 82,16%, ou seja, variação em mais de 50% no desenvolvimento das colônias dependendo do OE que acrescido ao meio de cultura. Para *C. pseudocladosporioides*, os valores encontrados pela autora em seu estudo variaram de 53,27, a 84,66%.

Além disso, vários autores já constataram crescimento fúngico inversamente proporcional a quantidade de OE. Al-shahrani et al. (2017), por exemplo, avaliando colônias de *Fusarium* sp, *Aspergillus flavus* e *A. niger* submetidas a ação do OE de tomilho (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae), também constataram que quanto maior a concentração utilizada, menor foi o diâmetro das colônias. Isto ocorre porque, com o aumento da concentração do OE no meio de cultura, também aumenta a concentração de compostos que podem ser tóxicos aos organismos. Além disso, os autores constataram que as espécies de *Aspergillus* do estudo respondiam de forma diferente para algumas determinadas concentrações, o que também ocorreu neste estudo e no estudo de Da Silva (2019).

A redução no crescimento das colônias pode estar associada a formação de película composta pelo OE sobre a superfície do meio de cultura, dificultando a obtenção de nutrientes pelos micélios. Sukcharoen, Sirrote e Thanaboripat (2018), constataram a redução na produção de aflotoxinas B1 (principal metabólito produzido por *Aspergillus* spp.) por parte de cepas de *Aspergillus flavus* quando submetidas ao OE da “árvore do diabo” (*Melodorum fruticosum*), além de uma menor esporulação e maior inibição no crescimento micelial das colônias dos isolados. Além disso, vários trabalhos envolvendo a aplicação de compostos e ceras de espécies de plantas sobre frutos têm possibilitado uma maior vida útil destes alimentos *in natura*. Durante o trabalho realizado por Fischer et al. (2018), a severidade da antracnose em frutos de abacateiro foi reduzida em aproximadamente 50% quando os frutos foram tratados com OE de capim-limão.

Prakash et al. (2011), também avaliaram a atividade antifúngica de diferentes concentrações de *O. gratissimum* em *Cladosporium* spp., e encontraram valores de inibição do crescimento micelial significativos. Os autores constataram inibição próximo a 80% utilizando uma concentração de 0,60 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Este mesmo percentual de inibição obtido pelos autores anteriormente citados foi observado neste trabalho aplicando-se uma concentração 1,00 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabela 5), indicando que o OE obtido pelos autores citados, possui talvez um maior potencial antifúngico. Entretanto, cabe destacar que no estudo feito por Prakash et al. não é especificada a espécie a qual pertence o isolado de *Cladosporium* o que pode influenciar no resultado, como pode ser visto entre os diferentes valores obtidos para os isolados apresentados na Tabela 5, sobretudo em concentrações intermediárias como a 0,50 e 0,75 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Tabela 5 - Inibição do crescimento micelial de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (mm)		
	13/12RS	9RS	16/2RS
0,25	5,16 dB*	6,68 dA	6,60 cA
0,50	26,14 cA	29,87 cA	8,48 cB
0,75	45,96 bB	61,06 bA	38,22 bB
1,00	77,87 aA	77,37 aA	76,51 aA
CV (%)	9,37		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS: *Cladosporium cladosporioides*, 13/12RS: *Cladosporium pseudocladosporioides*; CV: Coeficiente de Variação.

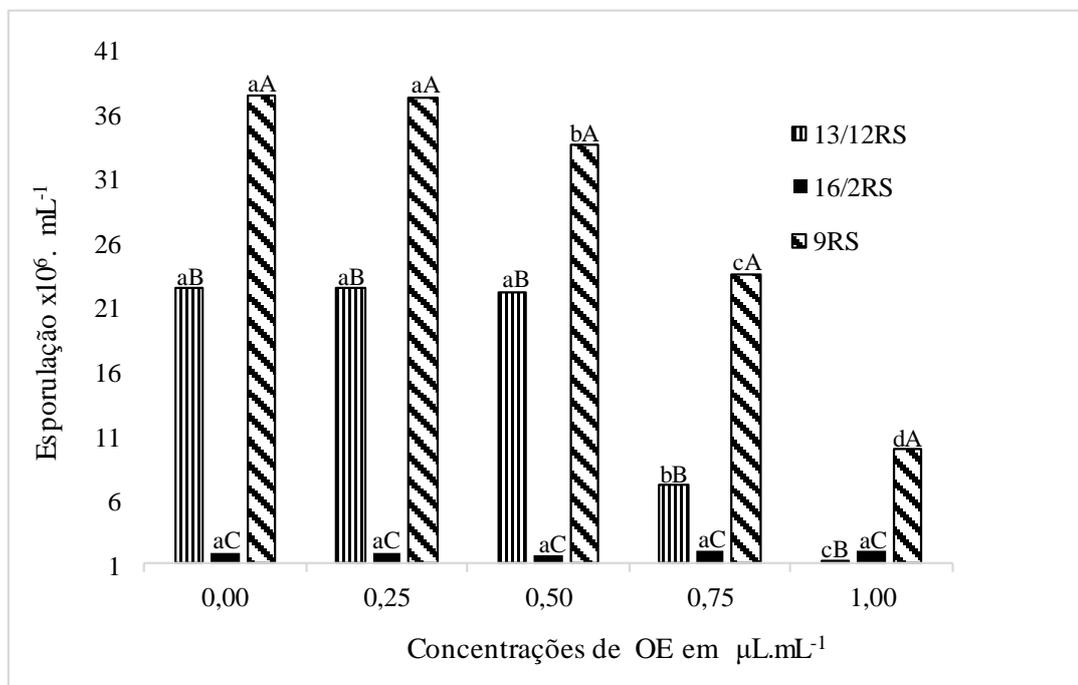
Adams, Kunz e Weidenbörner (1996) estudando os efeitos de diferentes concentrações dos compostos Eugenol e Carvacrol, sobre *C. herbarum* constataram que concentrações de 0,20 e 0,10 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ possuíam efeito inibitório total sobre o as colônias do isolado fúngico, e que, em menores concentrações, o efeito inibitório era gradativamente reduzido a medida que se passavam os dias de incubação. Os autores destacam que este processo de redução do efeito inibitório dos compostos deve-se a característica volátil dos mesmos. É plausível que o mesmo processo tenha ocorrido para os isolados de *Cladosporium* spp. deste trabalho, uma vez que necessitam de vários dias de incubação, devido ao crescimento naturalmente lento.

Para a variável esporulação (Figura 7), os isolados *Cladosporium subuliforme*, *C. pseudocladosporioides* e *C. cladosporioides* diferiram entre si, sendo que as maiores e menores médias foram apresentadas pelos isolados *C. cladosporioides* e *C. subuliforme*, respectivamente. A concentração de OE influenciou de forma negativa esta variável, já que as colônias submetidas a concentrações mais altas do OE foram as que apresentaram menor média de esporulação, com exceção de *Cladosporium subuliforme*, que não apresentou diferença entre a esporulação nas diferentes concentrações utilizadas no experimento. O isolado de *C. cladosporioides* no tratamento controle e na concentração 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ não apresentou valores médios de esporulação capazes de diferirem estatisticamente, entretanto, os valores de esporulação deste isolado, obtidos nas demais concentrações do OE diferiram entre si, enquanto que o isolado de *C. pseudocladosporioides* apenas apresentou diferença entre as médias obtidas

nas concentrações 0,75 e 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de OE acrescido ao meio de cultura. Para os isolados *C. pseudocladosporioides*, e *C. cladosporioides*, a concentração do OE foi capaz de reduzir a produção de esporos em 95,33% e 73,59% respectivamente quando compara-se as médias obtidas nos tratamentos controle e 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A diferença entre as médias de esporulação apresentadas pelos isolados de *Cladosporium* era esperada, uma vez que pertencem a três espécies diferentes, com variabilidade genética entre si.

Figura 7- Esporulação de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam um isolado em diferentes concentrações, maiúsculas comparam os isolados dentro de cada concentração e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Da Silva (2019), também constatou em seu estudo que as colônias de *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de 1,0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ em três OEs, obtiveram esporulação significativamente menor que no tratamento controle. A autora destaca que para alguns tratamentos com OE, os valores de esporulação foram reduzidos em até 94,43%. Também avaliando a esporulação de colônias de *Cladosporium* spp. tratadas com OE de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) Tzortzakis et al.

(2007) encontraram menor esporulação das colônias com a presença da maior concentração do OE.

Para a variável comprimento de conídio (Tabela 6), não houve interação entre os isolados e as diferentes concentrações. Entretanto, os conídios do isolado de *C. cladosporioides*, mostraram-se significativamente menores no tratamento controle que os conídios produzidos pelos demais. Walker et al. (2016) já demonstraram, através do Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) que os isolados de *Cladosporium* spp. deste estudo, apesar de pertencerem a um mesmo complexo, (*C. cladosporioides*) são morfologicamente diferentes. Neste sentido, o tamanho de esporos é uma característica intrínseca de cada espécie (BENSH et al., 2012). Cabe destacar ainda, que quando submetido às concentrações 0,75 e 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de OE, o isolado de *C. cladosporioides* apresentou largura de conídios significativamente menor, enquanto que para os demais, mesmo as maiores concentrações de OE, não influenciaram o comprimento dos conídios.

Tabela 6 - Comprimento de conídios de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Comprimento de conídio (μm)		
	13/12RS	16/2RS	9RS
0,00	5,17 a*	5,29 a	4,79 b
0,25	5,40 a	5,29 a	4,81 b
0,50	5,25 a	5,30 a	4,67 b
0,75	5,18 a	5,26 a	4,70 b
1,00	5,23 a	5,26 a	4,66 b
CV (%)	2,94		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle. 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*; CV: Coeficiente de Variação.

Para a largura dos conídios (Tabela 7), *C. subuliforme*, foi o que apresentou as maiores médias, diferindo dos demais isolados, com exceção do tratamento controle para o isolado *C. cladosporioides*, que não diferiu dos demais. A adição do OE não influenciou de forma significativa a largura dos conídios para *C. subuliforme* e *C. pseudocladosporioides*, enquanto que, para *C. cladosporioides* nas concentrações de 0,75 e 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de OE os esporos foram menores com 2,26 μm de largura para as duas concentrações.

Da Silva (2019) não encontrou diferenças significativas no comprimento dos conídios dos isolados de *C. subuliforme* e *C. pseudocladosporioides* no tratamento controle, enquanto que na concentração de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ foi possível constatar que os conídios produzidos pelo primeiro eram significativamente menores em todos os tratamentos com OE. Por este motivo, a autora sugere que *C. subuliforme* é mais sensível a aplicação de OE.

Tabela 7 - Largura de conídios de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Largura de conídio (μm)		
	13/12RS	16/2RS	9RS
0,00	2,48 aB*	2,80 aA	2,62 aAB
0,25	2,41 aB	2,83 aA	2,57 aB
0,50	2,51 aB	2,84 aA	2,45 aB
0,75	2,49 aB	2,87 aA	2,26 bC
1,00	2,37 aB	2,79 aA	2,26 bB
CV (%)	5,39		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*; CV: Coeficiente de Variação.

Em relação à variável tamanho de ramoconídio, o comprimento mostrou-se não influenciada pela presença do OE (Tabela 8) já que não houve variação entre as médias apresentadas pelas diferentes concentrações, com exceção de *C. subuliforme* nas concentrações de 0,75 e 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, que diferiram entre si e também dos demais tratamentos. Para a largura, de forma geral, as menores médias foram apresentadas por *C. cladosporioides* enquanto que as maiores por *C. pseudocladosporioides*. Cabe destacar que para esta variável, não houve diferença estatística entre as médias apresentadas por *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme*.

Tabela 8 - Tamanho de ramoconídios de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Tamanho (μm)					
	Comprimento			Largura		
	9RS	13/12RS	16/2 RS	9RS	13/12RS	16/2 RS
0,00	13,22 aB*	13,06 aB	16,27 aA	3,19 aC	4,97 aA	4,26 aB
0,25	13,13 aB	12,99 aB	16,03 aA	3,18 cC	4,60 bA	4,33 aB
0,50	12,97 aB	13,35 aB	16,07 aA	3,17 aC	4,61 bA	4,31 aB
0,75	12,79 aB	13,11 aB	14,51 bA	3,15 aB	4,33 cA	4,32 aA
1,00	13,01 aA	12,86 aA	12,69 cA	3,15 aB	4,32 cA	4,22 aA
CV (%)	4,03			3,65		

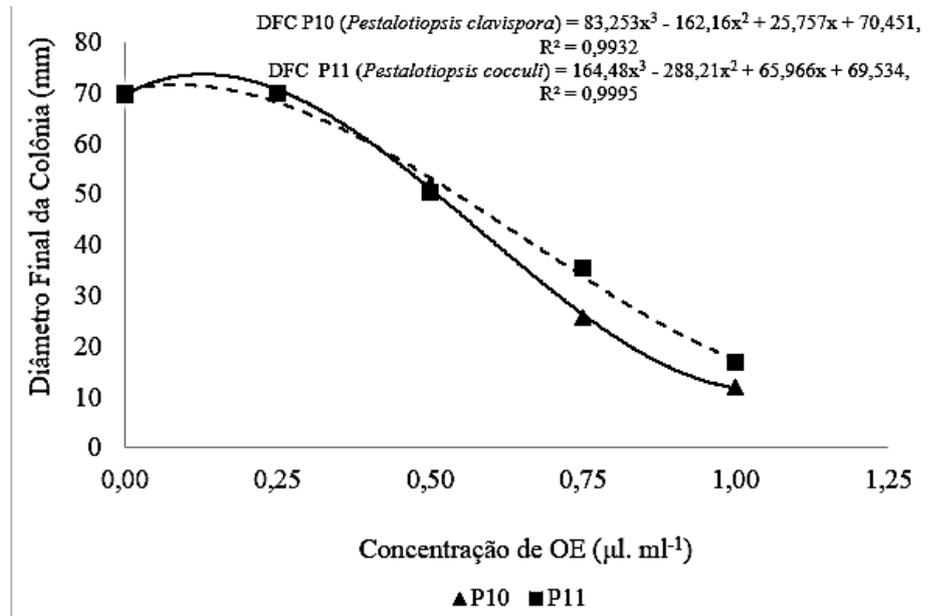
*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*; CV: Coeficiente de Variação.

4.2.2 Atividade antifúngica de *Ocimum gratissimum* sobre *Pestalotiopsis* spp.

Assim como no experimento da avaliação da atividade antifúngica do OE sobre *Cladosporium* spp., não houve o crescimento micelial das colônias de *Pestalotiopsis* spp. quando a concentração de $1,25 \text{ mL}^{-1}$ foi acrescentada ao meio de cultivo, tanto de OE como do fungicida. Sendo assim, estes tratamentos foram excluídos da análise estatística.

Para o diâmetro final da colônia dos isolados de *Pestalotiopsis* spp., verificou-se que, assim como para *Cladosporium* spp. a concentração do OE de *O. gratissimum*, influenciou significativamente esta variável quando os tratamentos tiveram maior concentração do OE acrescidos ao meio de cultura. Estes tratamentos, apresentaram, ao final do experimento, colônias fúngicas com um menor diâmetro. O isolado de *Pestalotiopsis cocculi* mostrou-se mais sensível ao OE de *O. gratissimum* já que apresentou diâmetro final da colônia significativamente menor nas concentrações de 0,75 e $1,00 \mu\text{L. mL}^{-1}$ (Figura 6). Além disso, o modelo de regressão que melhor descreveu os dados foi o cúbico, tanto para o isolado *P. clavispora*, como para *P. cocculi*, com valores de R^2 muito próximos de 1,0 e não houve inibição do crescimento micelial na menor concentração, de $0,25 \mu\text{L. mL}^{-1}$.

Figura 8 - Representação gráfica de análise de regressão para o diâmetro final da colônia de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.



Fonte: o autor.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos envolvendo a atividade antifúngica de *O. gratissimum* sobre *Pestalotiopsis* spp., entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que o desenvolvimento de fitopatógenos foliares pode ser significativamente reduzido pelo OE de *O. gratissimum*, principalmente *in vitro*. Avaliando a inibição do desenvolvimento de *Colletotrichum musae*, patógeno responsável por causar antracnose em bananeira (*Musa deliciosa*), Madjouko et al. (2019), encontraram valores de inibição de 80% com uma concentração de OE de *O. gratissimum* de 175 µL. mL⁻¹. Cabe destacar que o Eugenol, principal composto associado a atividade antifúngica de *O. gratissimum*, não foi identificado entre os constituintes presentes no OE obtido no estudo feito pelos autores. Já para o OE de *O. basilicum* o constituinte majoritário foi o Tujanol, com 24,38%. A redução de 100% no crescimento micelial de *C. musae* foi observada em 800 e 275 µl / L, para os óleos *O. basilicum* e *O. gratissimum*, respectivamente.

Estudando a atividade antifúngica de espécies do gênero *Ocimum*, dentre elas *O. gratissimum* Londhe, et al. (2015), com uma metodologia diferente, encontraram valores de inibição de até 30 mm para espécies de bactérias responsáveis por causar doenças em humanos e animais. Os autores destacam que os resultados obtidos servem de embasamento para a formulação de novos produtos antimicrobianos no tratamento de doenças em humanos.

Para *Pestalotiopsis* spp., quando se observa a taxa de crescimento micelial (Tabela 9), o tratamento acrescido de 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de OE não diferiu estatisticamente do tratamento controle, sendo que nos demais tratamentos de ambos os isolados, a taxa observada decresce a medida que a concentração do OE acrescido ao meio de cultura aumenta. Comparando-se a taxa de crescimento dos isolados, para o tratamento controle e a concentração de 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, não houve diferença estatística entre as médias. Entretanto, para as concentrações 0,75 e 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, a taxa apresentada por *P. clavispora* foi menor que a apresentada por *P. cocculi*, enquanto que o inverso ocorreu na concentração de 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$.

Tabela 9 - Taxa de crescimento micelial de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Taxa de crescimento (mm. dia ⁻¹)	
	P10	P11
0,00	9,95 aA*	10,00 aA
0,25	10,00 aA	9,98 aA
0,50	7,41 bA	7,21 bB
0,75	3,67 cB	5,06 cA
1,00	1,70 dB	2,40 dA
CV (%)	1,83	

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*, P11: *Pestalotiopsis cocculi*, CV: Coeficiente de Variação.

O OE na concentração de 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ acrescido ao meio de cultura não foi capaz de inibir o crescimento micelial dos isolados de *Pestalotiopsis* spp. utilizados neste estudo (Tabela 10). Para as demais concentrações, a inibição foi sempre maior para o isolado de *P. clavispora*, com exceção da concentração de 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, onde o inverso ocorreu. Quando se analisa a concentração em cada um dos isolados, pode-se perceber que todas as concentrações afetaram o crescimento fúngico.

Estudando os efeitos de 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de seis quimiotipos de OEs obtidos de folhas de canela indígena (*Cinnamomum osmophloeum*) como inibidor do crescimento de *Pestalotiopsis funereal*, Lee et al. (2005) encontraram inibição variável, dependendo do quimiotipo associado, mas que no geral não superaram os 20%. Neste sentido, o percentual de inibição apresentado pelo OE de *O. gratissimum* frente as espécies de *Pestalotiopsis* deste estudo é relevante.

Tabela 10- Inibição do crescimento micelial de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial	
	P10	P11
0,25	0 dA*	0,19 dA
0,50	25,49 cB	27,88 cA
0,75	63,10 bA	49,31 bB
1,00	82,88 aA	75,91 aB
CV (%)	3,82	

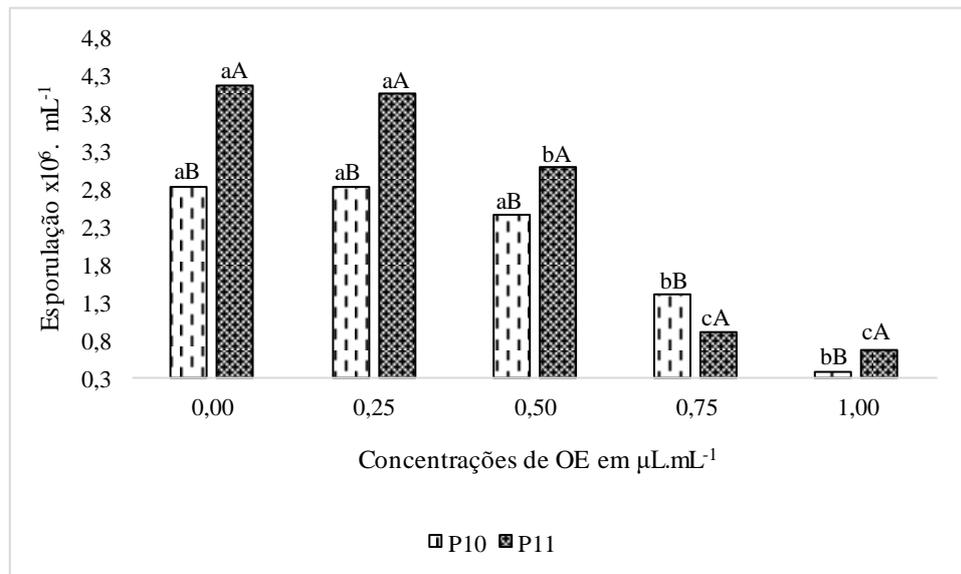
* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Houve diferença entre a esporulação apresentada pelos isolados de *Pestalotiopsis* spp., sendo que para o isolado de *P. cocculi* a esporulação foi estatisticamente superior ao de *P. clavispora* (Figura 9). Para o isolado de *P. cocculi* não houve diferença entre a esporulação apresentada no tratamento controle e na concentração 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, uma esporulação intermediária foi observada na concentração 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ com $3,08 \times 10^6$ esporos. mL^{-1} e as menores esporulações foram observadas demais concentrações utilizadas. O isolado de *P. clavispora* também demonstrou que quanto maior a concentração de OE, menor a esporulação, sendo possível perceber a formação de dois grupos distintos: um em que a esporulação não foi afetada pelo OE, caso das concentrações 0,25 e 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, que não se diferenciaram do tratamento controle e o outro grupo em que o OE interferiu diminuindo a esporulação, caso das concentrações 0,75 e 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$.

Também avaliado a esporulação de colônias de *P. clavispora* e *P. cocculi*, Da Silva, 2019, constataram redução na esporulação de colônias crescidas em meio de cultura acrescido de 1,0 μL de OE de *Nectandra grandiflora*, sendo que as menores médias encontradas pela autora também foram para o isolado de *P. clavispora*. Comparando-se as médias de esporulação obtidas pelas colônias cultivadas pela autora e por este trabalho, é possível perceber que em ambos os casos, utilizando-se uma mesma concentração de diferentes OE acrescido ao meio de cultura, 1,0 μL , a maior esporulação foi apresentada pelo isolado de *P. cocculi*, em ambos os casos. A redução na esporulação pela maior concentração de OE pode ser atribuída a perturbações em sistemas enzimáticos envolvidos na produção de energia e na síntese de componente de estruturas fúngicas. Grande parte dos compostos fenólicos contidos em OE são

conhecidos por afetarem as interações dentro da membrana celular fúngica, modificando o sentido do fluxo de prótons e com isso afetando a atividade celular (CASTRO; OLIVEIRA, 2016).

Figura 9 - Esporulação de colônias de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum*.



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam um isolado em diferentes concentrações, maiúsculas comparam os isolados dentro de cada concentração e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavisporea*; P11 *Pestalotiopsis cocculi*.

Também avaliando as características dos esporos de colônias de *Colletotrichum musae* crescendo em meio de cultura acrescido com OE de *O. gratissimum*, Madjouko et al., 2019, encontraram redução da esporulação conforme aumentaram a concentração do OE.

Para comprimento e largura de conídios, houve diferença estatística entre os dois isolados de *Pestalotiopsis* (Tabela 11). O isolado de *P. clavisporea* apresentou conídios com dimensões maiores, isto é, com maior comprimento e largura, do que o isolado *P. cocculi*. Além disso, o isolado de *P. clavisporea* não apresentou variação na largura de conídios obtida nas diferentes concentrações de OE. Entretanto, o mesmo não ocorreu para *P. cocculi* o qual apresentou médias variáveis. A maior média com relação a largura, para este isolado, foi apresentada no tratamento com $0,25 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de OE acrescido ao meio de cultura, e que não diferiu estatisticamente do tratamento controle, enquanto que os menores valores foram obtidos

nas concentrações de 0,75 e 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. Na concentração 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, os valores obtidos não diferiram dos demais.

Tabela 11- Tamanho de conídios de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Tamanho (μm) de conídio			
	Comprimento		Largura	
	P10	P11	P10	P11
0,00	30,76 aA*	25,78 aB	7,39 aA	6,35 abB
0,25	30,65 aA	26,12 aB	7,40 aA	6,40 aB
0,50	30,80 aA	21,44 bB	7,39 aA	6,20 abB
0,75	23,46 bA	17,07 cB	7,37 aA	6,17 bB
1,00	18,59 cA	14,40 cB	7,39 aA	6,18 bB
CV (%)	7,48		1,73	

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: "0,00" refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*; CV: Coeficiente de Variação.

4.2.3 Coloração das colônias de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e modo de ação.

Apesar de algumas concentrações do OE de *O. gratissimum* terem influenciado no desenvolvimento das colônias, isto é, reduzirem o crescimento micelial e esporulação de *Cladosporium* spp., não foram observadas variações na coloração do micélio aéreo no tratamento controle e nos acrescidos de OE, nem mesmo na maior concentração utilizada. Neste sentido, todas colônias do isolado *C. subuliforme* apresentaram micélio aéreo de coloração cinza esverdeado, as do isolado *C. pseudocladosporioides* cinza-esverdeado escuro, assim como o isolado de *C. cladosporioides*.

As colônias de *Pestalotiopsis* spp. que cresceram sobre meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar não apresentaram coloração distinta dos tratamentos controle. Neste sentido, a coloração apresentada por todas as colônias, tanto para o isolado de *P. clavispora* quanto para o isolado *P. cocculi*, foi branco rosado.

O modo de ação de *O. gratissimum* variou conforme a concentração utilizada. Na concentração mais elevada, de 1,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, tanto para *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis*

spp. a atividade foi considerada fungicida, porque esta concentração ocasionou a morte das estruturas fúngicas presentes nos discos de meio de cultura. Nas demais concentrações, houve alterações na esporulação, no crescimento micelial, ou ainda em características referentes ao tamanho de conídios, e por isso a atividade foi determinada como fungistática.

4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Hesperozygis ringens*

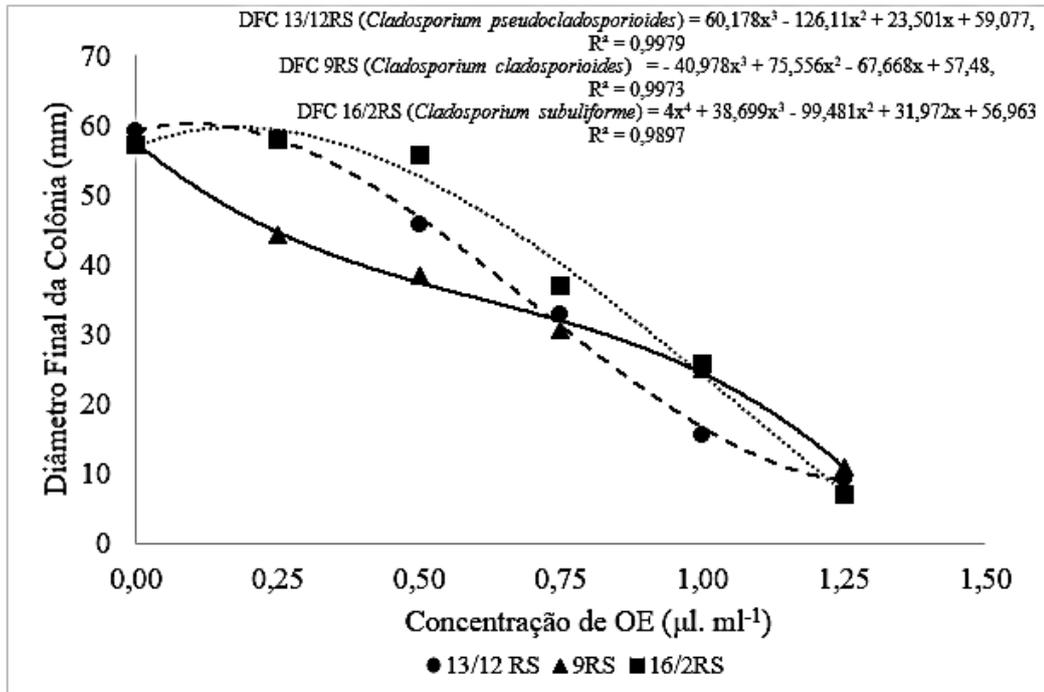
4.3.1 Atividade antifúngica de *Hesperozygis ringens* sobre *Cladosporium* spp.

O OE de *H. ringens*, exerceu efeito sobre o desenvolvimento das colônias de *Cladosporium* spp. (Figura 11). Entretanto, neste caso, a concentração de 1,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ não foi capaz de inibir totalmente o desenvolvimento das colônias. Esta diferença provavelmente ocorreu pela distinta composição química de cada OE. Ao que parece, o OE de *H. ringens*, possui menor efeito antifúngico quando se compara com *O. gratissimum*, sobre *Cladosporium* spp. já que a quantidade necessária para inibição total foi maior. Cabe destacar ainda, que a composição química dos OEs é distinta, e por isso, os patógenos podem apresentar comportamentos distintos quando em contato com cada OE.

A taxa de crescimento micelial não apresentou diferença entre os isolados no tratamento controle (Tabela 12). Para a concentração 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, o único isolado que se diferenciou dos demais foi *C. cladosporioides*, que apresentou o menor valor, de 2,40 mm dia^{-1} . Entretanto, o mesmo isolado foi o que apresentou a maior taxa de crescimento micelial na concentração de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, sendo o único que apresentou diferença. Para *C. subuliforme*, não houve diferença entre as médias do tratamento controle e as concentrações 0,25 e 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, enquanto que a média apresentada por *C. pseudocladosporioides* na concentração 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ não diferiu do controle. Nas demais concentrações, todas as medias obtidas diferiram-se, para todos os isolados.

Avaliando colônias dos isolados de *C. subuliforme* e *C. pseudocladosporioides*, crescidas em meio de cultura acrescido de OE de *N. megapotamica* Da Silva (2019), também constatou redução na taxa de crescimento micelial das colônias em meio de cultura com adição do OE. Segundo a autora, a redução na taxa apresentada pelas colônias em contato com o OE ultrapassou 80%, tanto para *C. subuliforme*, quanto para *C. pseudocladosporioides*.

Figura 10 - Análise de regressão para o diâmetro da colônia de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*



Fonte: o autor.

Observando inibição ocasionada pelas diferentes concentrações de OE foi possível perceber que, o tratamento com a maior concentração acrescida ao meio de cultura foi o que apresentou os maiores valores de inibição do crescimento micelial do isolados de *Cladosporium* spp. (Tabela 13). Nesta concentração, as médias obtidas em todos os isolados foram superiores a 80%, e não houve diferença estatística entre as médias apresentadas pelos isolados nesta concentração. Em comparação, na concentração 0,50 e na 0,75 µL. mL⁻¹, as médias obtidas diferiram entre si, sendo que *C. subuliforme* e *C. cladosporioides* foram os que apresentaram menor e maior valor de inibição, respectivamente. Comparando-se a influência das

concentrações no percentual de inibição do crescimento micelial de cada isolado verifica-se que para o isolado *C. subuliforme* todas as concentrações apresentaram diferença entre si.

Tabela 12 - Taxa de crescimento micelial de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de *Hesperozygis ringens*.

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Taxa de crescimento (mm. dia ⁻¹)		
	16/2RS	9RS	13/12RS
0,00	3,58 aA*	3,60 aA	3,70 aA
0,25	3,61 aA	2,76 bB	3,63 aA
0,50	3,48 aA	2,40 cB	2,87 bA
0,75	2,32 bA	1,91 dB	2,05 cB
1,00	0,82 cB	1,52 eA	0,97 dB
1,25	0,01 dB	0,68 fA	0,58 eA
CV (%)	4,92		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS: *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS: *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Na literatura não foram encontrados estudos sobre a atividade antifúngica do OE de *H. ringens* sobre *Cladosporium* spp. Entretanto, alguns trabalhos vem testando o OE de algumas espécies do gênero *Hesperozygis* frente a ampla gama de agentes patogênicos devido a sua atividade antibiótica. Avaliando a atividade antibiótica de *H. myrtooides* frente a cepas de diferentes bactérias e fungos, com uma metodologia diferente, Martini et al. (2011), constataram que potencial inibitório do OE de *H. myrtooides* no crescimento destes organismos. Os autores não constataram inibição no desenvolvimento de *Aspergillus niger*, entretanto, espécies como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* e *Lactobacillus casei* apresentaram crescimento da colônia significativamente menor que aqueles tratamentos sem a presença do OE.

Avaliando a atividade antifúngica de compostos isolados de OEs de plantas do gênero *Piper* spp. sobre *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, Lago et al. (2009) constataram que as espécies de *Cladosporium* do estudo, responderam de forma diferente para o composto éter naringenina. No estudo dos autores, *C. cladosporioides*, mostrou-se mais sensível que *C. sphaerospermum*.

Tabela 13 - Inibição do crescimento micelial de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Inibição do Crescimento Micelial (%)		
	13/12RS	16/2RS	9RS
0,25	1,51 dB*	0 eB	23,24 eA
0,50	22,27 cB	2,81 dC	33,06 dA
0,75	44,57 bB	35,25 cB	46,68 cA
1,00	73,68 aA	55,2 bB	57,84 bB
1,25	83,28 aA	99,98 aA	84,02 aA
CV (%)	12,86		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS *Cladosporium cladosporioides*, 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

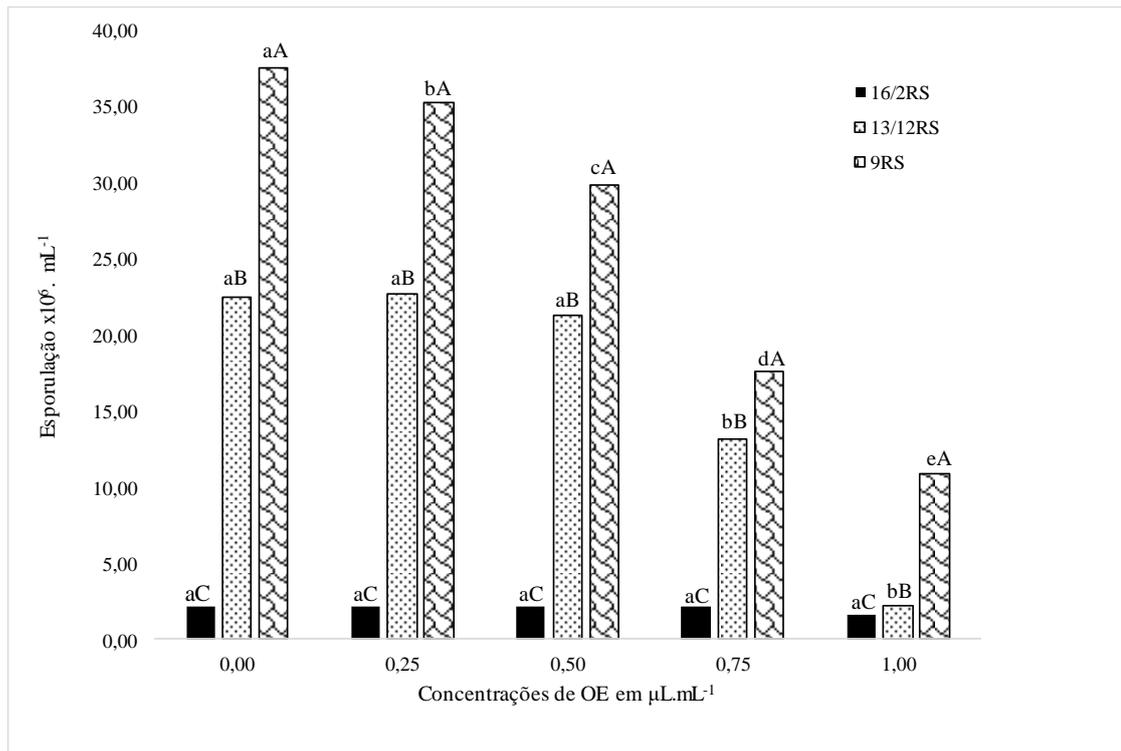
Na concentração de $1,25 \mu\text{L. mL}^{-1}$, apesar de apresentar o menor diâmetro final da colônia, não foi constatada esporulação para os isolados. Neste sentido, esta concentração foi excluída da avaliação das demais características das colônias.

Houve diferença significativa na esporulação em função dos diferentes isolados de *Cladosporium* spp. e das concentrações do OE, com exceção de *C. subuliforme*, em que independente da utilização OE a esporulação se manteve estável (Figura 11). A esporulação do isolado *C. cladosporioides* apresentou diferença estatística dos demais, já *C. pseudocladosporioides* teve esporulação intermediária. Para o isolado de *C. pseudocladosporioides* formaram-se dois grupos distintos da ação do OE, um com esporulação superior, onde foram utilizadas as menores concentrações de OE ($0,25$ e $0,5 \mu\text{L. mL}^{-1}$) e que não diferiram do tratamento controle, o outro em que a esporulação foi afetada pelo OE, nas concentrações de $0,75$ e $1,0 \mu\text{L. mL}^{-1}$. Para *C. cladosporioides*, todas as concentrações diferiram-se, sendo que a maior esporulação foi observada no tratamento controle, sem a utilização do OE e a menor no tratamento com a maior concentração do OE ($1,0 \mu\text{L. mL}^{-1}$).

A redução na esporulação das colônias de *Cladosporium* spp. submetida as diferentes concentrações de OE de *H. ringens* já era esperada, uma vez que a redução na esporulação é uma característica apresentada por várias espécies fúngicas quando em contato com muitos OE. Embora não tenha sido constatada (pela ausência de estudos) por nenhum outro trabalho, a redução da esporulação de colônias de *C. pseudocladosporioides*, *C. cladosporioides* e *C.*

subuliforme ocasionada pela adição de OE de *H. ringens* ao meio de cultura, provavelmente ocorreu pela alta afinidade do OE e da membrana fúngica.

Figura 11- Esporulação de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam um isolado em diferentes concentrações, maiúsculas comparam os isolados dentro de cada concentração e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Estudando o potencial de extratos de várias plantas sobre a esporulação de *Fusarium* sp, dentre elas *Citrus* spp., Baños, Lopez e Necha (2000), contataram uma redução de até 100% naqueles tratamentos submetidos a aplicação do extrativo.

Para o comprimento de conídios houve diferença estatística entre os isolados e entre as concentrações de OE utilizadas, havendo interação entre os fatores (Tabela 17). Os isolados que apresentaram maior comprimento de conídios foram *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* que não se diferenciaram estatisticamente entre si. Por outro lado, *C. cladosporioides* foi menor, diferenciando destes. *C. subuliforme* e *C. cladosporioides* não apresentaram diferença estatística para as diferentes concentrações de OE utilizadas, enquanto que o isolado de *C. pseudocladosporioides* apresentou diferença entre as concentrações.

Para a largura dos conídios, houve diferença estatística entre os isolados de *Cladosporium* spp. sendo que o que apresentou os maiores valores foi o isolado de *C. subuliforme*, que se diferenciou dos demais. Também houve diferença estatística entre as diferentes concentrações de OE incorporadas ao meio de cultura para os isolados de *C. pseudocladosporioides* e *C. cladosporioides*, enquanto que o isolado *C. subuliforme* não apresentou diferença estatística entre as diferentes concentrações de OE avaliadas.

Tabela 14 - Dimensões de conídios de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Tamanho de conídio (μm)					
	Comprimento			Largura		
	13/12RS	16/2RS	9RS	13/12RS	16/2RS	9RS
0,00	5,19 bA*	5,29 aA	4,79 aB	2,48 abB	2,80 aA	2,62 aB
0,25	5,32 abA	5,39 aA	4,86 aB	2,56 aB	2,90 aA	2,47 abB
0,50	5,41 aA	5,31 aA	4,84 aB	2,51 abB	2,88 aA	2,38 bB
0,75	5,38 aA	5,29 aA	4,80 aB	2,49 abB	2,88 aA	2,38 bB
1,00	5,27 abA	5,31 aA	4,76 aB	2,38 bB	2,83 aA	2,38 bB
CV (%)	1,99			3,86		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS: *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS: *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Para o comprimento de ramoconídios de *Cladosporium* spp. houve diferença estatística entre os isolados entre as diferentes concentrações de OE de *H. ringens*, apresentando interação entre os fatores (Tabela 15). O isolado em que foram observados os ramoconídios com maior comprimento foi o *C. subuliforme*, seguido do isolado de *C. cladosporioides* e por fim, o isolado de *C. pseudocladosporioides*, que apresentou os ramoconídios com menor comprimento. O comprimento dos ramoconídios dos isolados de *C. subuliforme* e *C. cladosporioides* não foram influenciados pelo OE independente da concentração de OE utilizada em cada tratamento, enquanto que *C. pseudocladosporioides* mostrou sensibilidade ao OE, principalmente na concentração de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. Nessa concentração os ramoconídios foram menores e se diferenciaram dos demais tratamentos.

Por outro lado, a largura de ramoconídios não foi influenciada pela presença de OE de *H. ringens* no meio de cultivo, e a diferença estatística observada para essa variável, foi somente entre os isolados de *Cladosporium* spp.

Tabela 15 - Tamanho de ramoconídios de colônias de três isolados de *Cladosporium* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Tamanho (μm)					
	Comprimento			Largura		
	13/12RS	16/2 RS	9RS	13/12RS	16/2 RS	9RS
0,00	13,05 aB*	16,27 aA	13,12 aB	4,96 aA	4,25 aB	3,18 aC
0,25	12,98 abC	16,25 aA	13,35 aB	4,37 aB	4,34 aA	3,18 aB
0,50	13,09 aC	16,27 aA	13,42 aB	4,48 aB	4,33 aA	3,17 aB
0,75	13,02 abC	16,21 aA	13,39 aB	4,46 aB	4,29 aA	3,19 aB
1,00	12,82 bC	16,22 aA	13,24 aB	4,29 aA	4,29 aA	3,12 aB
CV (%)	1,93			2,87		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde “0,00” refere-se ao tratamento controle; 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS: *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS: *Cladosporium pseudocladosporioides*.

4.3.2 Atividade antifúngica de *Hesperozygis ringens* sobre *Pestalotiopsis* spp.

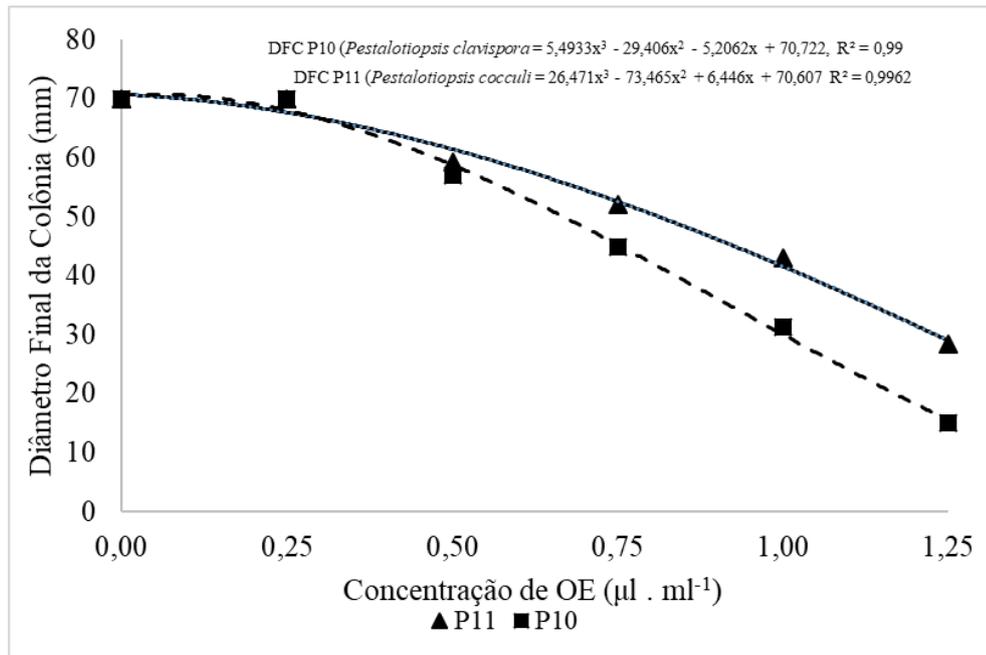
Diferentemente do constatado durante o teste de atividade antifúngica do OE de *O. gratissimum* (Item 4.2), as colônias de *Pestalotiopsis* submetidas a diferentes concentrações de OE acrescidas ao meio de cultura demonstraram desenvolvimento de micélio, embora em valor reduzido. Para ambos os isolados de *Pestalotiopsis*, o melhor modelo capaz de descrever os dados foi o polinomial de terceira ordem (Figura 12).

Foi possível perceber que as colônias fúngicas submetidas as maiores concentrações de OE apresentaram o menor diâmetro final da colônia, e formou-se uma linha decrescente do diâmetro final entre as concentrações, para ambos isolados, *P. clavisporea* e *P. cocculi*.

Não houve variação entre as taxas de crescimento apresentadas pelas colônias submetidas a concentrações de $0,25 \mu\text{L. mL}^{-1}$ comparada com o tratamento controle, tanto para *P. clavisporea*, quanto para *P. cocculi* (Tabela 16). Para as demais concentrações, a taxa de

crescimento micelial decresceu a medida que houve o aumento das concentrações, para ambos os isolados, sendo que as médias obtidas para *P. cocculi* foi significativamente menor.

Figura 12 - Análise de regressão para o Diâmetro da colônia de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*



Fonte: o autor.

Não foram encontrados trabalhos na literatura avaliando a capacidade antifúngica do OE de *H. ringens* sobre isolados de *Pestalotiopsis* spp. Entretanto, Baños, Lopez e Necha (2000), avaliando características morfológicas de isolados de *Pestalotiopsis* spp. submetidos a extrato de folhas (50g) de vinte espécies de plantas, constataram redução do micélio de algumas colônias submetidas a extratos de algumas plantas, quando compararam com o tratamento controle. Alguns extratos como das espécies *Crataegus mexicana*, conhecida popularmente como manzanita e *Inga spuria* chamado de Ingá-cipó foram capazes de reduzir em mais de 50% o desenvolvimento das colônias de *Pestalotiopsis* spp.

Tabela 16 - Taxa de crescimento micelial de colônias de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Taxa de crescimento (mm. dia^{-1})	
	P10	P11
0,00	10,00 aA*	10,00 aA
0,25	10,00 aA	10,00 aA
0,50	8,47 bA	8,14 bB
0,75	7,41 cA	6,42 cB
1,00	6,15 dA	4,47 dB
1,25	4,06 eA	2,15 eB
CV (%)	7,2	

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Não houve inibição do crescimento micelial na concentração 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para nenhum isolado de *Pestalotiopsis*, como pode ser observado na Tabela 17. Além disso, na maior concentração em que se teve o desenvolvimento das colônias fúngicas (1,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$) a inibição apresentada pelos isolados foi significativamente diferente. O micélio de *Pestalotiopsis cocculi* foi inibido em maior porcentagem, o que demonstra uma sensibilidade maior a este óleo. Além disso, todos os percentuais de inibição do crescimento apresentadas por *P. clavispora* e *P. cocculi* em todas as concentrações foram diferentes entre si.

Da Silva (2019), também estudou os isolados de *P. clavispora* e *P. cocculi* submetidos ao OE de *N. megapotamica* e *Piper gaudichaudianum* e constatou que as colônias destes isolados não apresentaram desenvolvimento fúngico quando submetidas ação do OE do último, o que resultou em um percentual de inibição de 100%.

Avaliando o efeito de três concentrações (120, 240, 480 $\mu\text{L. mL}^{-1}$) do OE de tomilho indiano (*Trachyspermum ammi*, Apiaceae) no desenvolvimento de três *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum* f.sp *lycopersici*, *F. o.* f.sp *cubense* e *F. o.* f.sp *capsici*), Siripornvisal (2010) constatou drástica redução biomassa das colônias (ocasionado por um menor desenvolvimento dos micélios), com 99,04% menos que no tratamento controle. O autor destaca ainda, que a quantidade mínima inibitória, ou seja, a menor quantidade necessária de OE capaz de reduzir o desenvolvimento das colônias variou em mais de 50% dentro da própria espécie. Para *F. o.* f.sp *lycopersici* e *F. o.* f.sp *capsici* a quantidade necessária foi de 12,5 $\mu\text{L. mL}^{-1}$.

mL⁻¹ do OE de *Trachyspermum ammi*, enquanto que para *F. o. f.sp cubense* ela foi de 06,0 µL. mL⁻¹. Este resultado obtido pelo autor demonstra que mesmo dentro de uma determinada espécie as respostas obtidas podem ser diferentes. Tal variação, sobretudo ocorreu provavelmente pela variação genética entre as diferentes populações de *F. oxysporum*, já que este patógeno vem apresentando alta evolução.

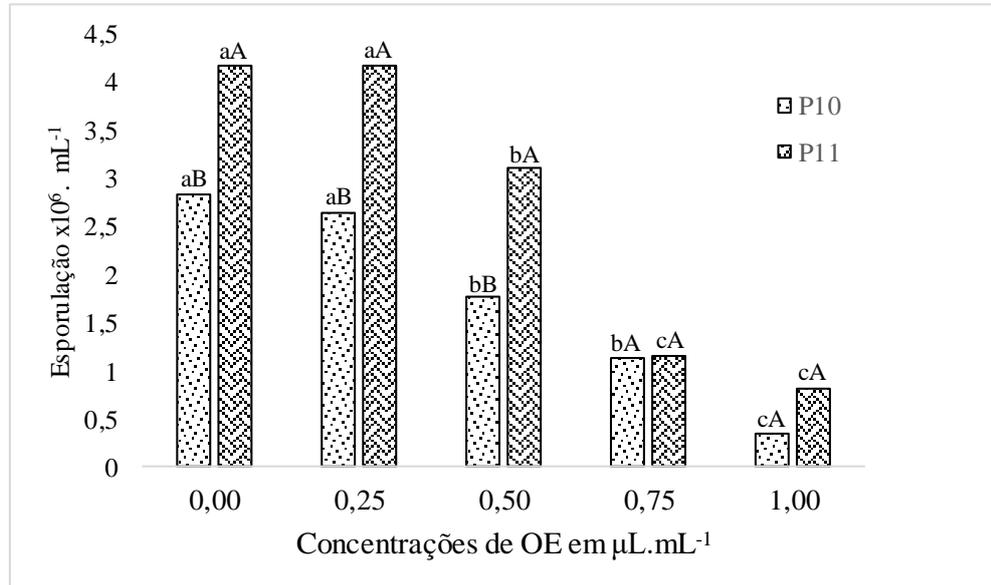
Tabela 17 - Inibição do crescimento micelial de colônias de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE (µL. mL ⁻¹)	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (%)	
	P10	P11
0,25	0 eA*	0 eA
0,50	15,22 dA	18,56 dA
0,75	25,51cB	35,84 cA
1,00	38,42 bB	55,26 bA
1,25	59,37 aB	78,42 aA
CV (%)	3,82	

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Na esporulação foi possível perceber que para ambos os isolados o comportamento foi similar (Figura 13). De modo geral, as menores produções de esporos foram constatadas naquelas colônias submetidas as maiores concentrações de OE. Entretanto, para ambas espécies foi possível constatar que a menor concentração utilizada não interferiu de forma significativa na esporulação das colônias. Para *P. clavispora*, as médias obtidas nas concentrações de 0,50 e 0,75 µL. mL⁻¹ não diferiram, enquanto que para *P. cocculi*, sim. Além disso, quando se comparam os isolados, foi possível constatar que as maiores médias foram apresentadas por *P. cocculi*, com exceção das dos tratamentos com 0,75 e 1,00 µL. mL⁻¹ que não diferiram entre sí.

Figura 13 - Esporulação de colônias de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam um isolado em diferentes concentrações, maiúsculas comparam os isolados dentro de cada concentração e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Quanto ao comprimento pode-se observar diferença estatística entre os isolados de *Pestalotiopsis* spp. e entre as concentrações de OE de *H. ringens* (Tabela 19). O isolado de *P. clavispora* foi o que apresentou as maiores dimensões para o comprimento dos conídios, com valores que variaram de 22,06 a 30,76 μm , para *P. cocculi*, as dimensões variaram de 12,59 a 25,78 μm . Ainda para *P. clavispora* foi possível observar a formação de dois grupos quanto a sensibilidade ao OE, um em que não houve alteração do comprimento em relação ao tratamento controle, nas concentrações de 0,25 a 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, enquanto que o outro grupo apresentou os menores comprimentos, no caso das concentrações 0,75 e 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. O isolado de *P. cocculi* formou três grupos de sensibilidade ao OE, sendo que o OE interferiu no comprimento dos conídios a partir da concentração de 0,75 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e a concentração em que se observou os menores foi a de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, com conídios com comprimento de 12,59 μm .

Avaliando as respostas de colônias de *Pestalotiopsis funereal* crescidas em meio de cultura contendo extrato de 50g de folhas de diferentes indivíduos de sequoia vermelha (*Sequoia sempervirens*), Espinosa-Garcia e Langenheim (1991), constataram redução de mais de 45% no desenvolvimento dos micélios de colônias fúngicas submetidas ao meio de cultura com o extrato, quando comparado com o tratamento controle. Além disso, os autores

constatarem ainda respostas diferentes para colônias submetidas aos extratos de folhas de indivíduos diferentes.

Para a largura dos conídios (Tabela 19) houve diferença estatística entre os isolados, e o OE interferiu na largura dos conídios de *P. cocculi*, contudo não influenciou a mesma variável para *P. clavispora*. Para *P. cocculi* pode-se observar conídios mais largos no tratamento controle com 6,35 μm , que não diferiu da concentração de 0,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (6,34 μm). Conídios com largura intermediária foram observados nas concentrações de 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ e 0,75 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. Nesta última concentração, os conídios apresentados pelo isolado de *P. cocculi* não diferiram dos apresentados na concentração de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$.

Da Silva (2019), constatou que as dimensões dos conídios dos mesmos isolados de *Pestalotiopsis* spp. foram afetadas pela presença de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de dois dos OEs testados por ela. Cabe destacar, que *P. cocculi* apresentou os menores valores de comprimento e largura de conídios em todos os tratamentos utilizados pela autora, o que também pode ser visto durante a realização deste experimento.

Tabela 18 - Tamanho de conídios de colônias de dois isolados de *Pestalotiopsis* spp. em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens*

Concentração de OE ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Tamanho (μm)			
	Comprimento		Largura	
	P10	P11	P10	P11
0,00	30,76 aA*	25,78 aB	7,40 aA	6,35 aB
0,25	30,74 aA	25,77 aB	7,42 aA	6,34 aB
0,50	30,18 aA	25,65 aB	7,43 aA	6,20 bB
0,75	22,93 bA	23,38 bB	7,41 aA	6,11 bcB
1,00	22,06 bA	12,59 cB	7,43 aA	6,05 cB
CV (%)	3,78		0,78	

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: “0,00” refere-se ao tratamento controle; P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

4.3.3 Colorações das colônias de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Hesperozygis ringens* e modo de ação

Não houve alterações na coloração das colônias dos isolados de *Pestalotiopsis* submetidos às diferentes concentrações de OE acrescentadas ao meio de cultura quando comparadas do tratamento controle. Também, estudando a morfologia de colônias dos isolados de *C. pseudocladosporioides* e *C. Subuliforme*, da Silva (2019), também não encontrou variação da coloração apresentada por colônias submetidas a uma concentração de 1 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de três óleos essenciais.

O óleo de *Hesperozygis ringens* foi considerado fungistático porque, quando em sua presença, em algumas concentrações, tanto as colônias de *Cladosporium* spp. com *Pestalotiopsis* spp. apresentaram alterações do desenvolvimento, isto é, menor diâmetro final da colônia e esporulação. Além disso, este OE mostrou-se influente para o tamanho dos esporos de *Pestalotiopsis* spp.

4.4 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA APRESENTADA PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Quando se analisa a variável diâmetro final da colônia, é possível perceber que para *C. pseudocladosporioides* não houve diferença entre o OE1 (*Ocimum gratissimum*) e o OE2 (*Hesperozygis ringens*). Entretanto, estes tratamentos diferiram estatisticamente do tratamento controle (CN). Para os demais isolados, houve diferença estatística entre todos os tratamentos, onde as menores medias foram apresentadas pelas colônias submetidas ao OE1 (Tabela 19). Martini et al., (2011), avaliaram a atividade antibiológica de *H. myrtoides* e *O. selloi*, pertencentes aos mesmos gêneros das espécies estudadas neste trabalho e também encontraram diferença nos valores do tamanho da colônia fúngicas e bacterianas, resultando em diferenças na inibição. Segundo os autores, podem explicar a diferença obtida entre os diferentes tratamentos a sensibilidade maior ou menor apresentadas por alguns organismos a determinados compostos.

Sampaio et al. (2020), avaliaram o efeito do OE de diferentes isolados de *Myrcia ovata*, conhecida popularmente como cabeludinha, sobre o crescimento micelial de *F. palidosporum* e *C. musae*, e também encontraram diferença estatística entre os valores obtidos para os isolados fúngicos em cada um dos OEs.

Tabela 19 - Diâmetro final obtido de três colônias de *Cladosporium* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).

Isolados	Tratamentos		
	CN	OE1	OE2
13/12RS	57,10 aA*	13,10 aB	15,55 bB
9RS	57,56 aA	13,01 aC	25,25 aB
16/12RS	57,19 aA	13,43 aC	24,66 aB
CV		9,32	

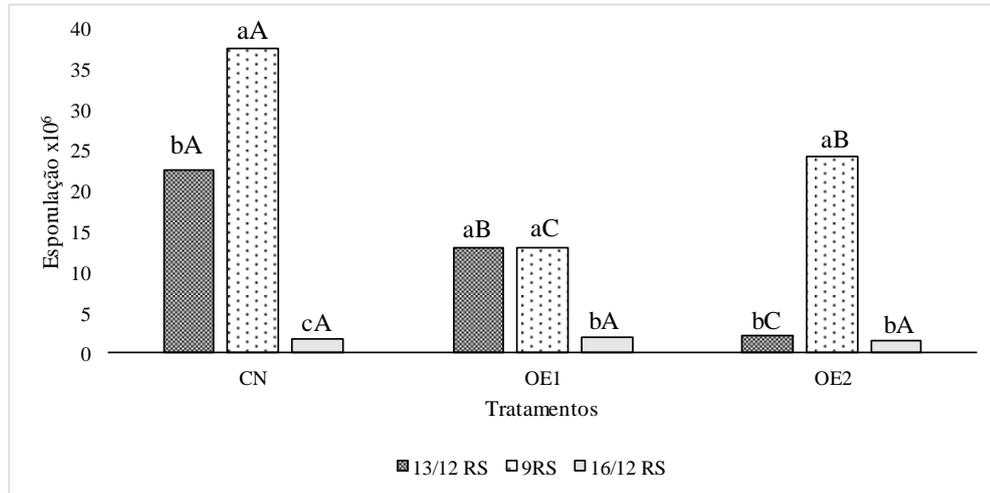
*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS *Cladosporium cladosporioides*, 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Com relação a esporulação, é possível perceber que a esporulação de *C. subuliforme* não foi influenciada pelos diferentes OEs, uma vez que não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 14). Foi possível perceber ainda que *C. cladosporioides* apresentou comportamento diferenciado quando submetido a cada um dos OEs. Para o OE1, não houve diferença entre este isolado e *C. pseudocladosporioides* enquanto que no OE2 ele apresentou a maior média de esporulação.

Na literatura, não existem trabalhos de comparação deste dois OEs frente a estas espécies de *Cladosporium*. Entretanto, Da Silva (2019), também avaliou a esporulação apresentada por diferentes espécies do gênero *Cladosporium* submetidas a concentração de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de três OEs de espécies florestais e encontrou variação de até 75% na esporulação de um mesmo isolado quando comparado o efeito dos OEs.

Avaliando a esporulação apresentada por *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* e *Verticillium dahliae*, submetidos a diferentes concentrações de OEs de lavanda (*Lavandula stoechas*), orégano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) hortelã (*Mentha spicata*) e salvia (*Salvia fruticosa*) Kadoglidou et al. (2011) encontraram diferenças entre as médias apresentadas por cada um dos isolados fúngicos, onde um dos fatores influentes foi o OE, demonstrando maior ou menor tolerância que determinados organismos tem a alguns compostos químicos.

Figura 14 - Esporulação de três colônias de *Cladosporium* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam os isolados dentro de cada tratamento, maiúsculas comparam um isolado nos diferentes tratamentos e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*; 9RS *Cladosporium cladosporioides*; 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Os resultados obtidos pelos autores demonstraram uma menor inibição do crescimento e esporulação dos isolados fúngicos quando em contato com o OE de orégano. Entretanto, os autores destacam que *P. expansum* tratado com OE de lavanda desenvolveu-se completamente, na ausência do principal constituinte, sugerindo interferência de outros compostos menos abundantes no óleo, que podem atuar sinérgica ou competitivamente com o efeito do constituinte principal.

Embora poucos trabalhos avaliem a influência dos OEs no tamanho dos conídios, muitos outros avaliam a capacidade de germinação dos conídios quando em contato com OEs, e vários trabalhos vem demonstrando um efeito inibitório na germinação de conídio ocasionada pelo OE, seja ele presente no meio de cultivo ou diluído em água. Nascimento et al. (2019), avaliaram a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos a oito OEs e constataram variação na germinação. A maior média de conídios germinados foi apresentada pelo tratamento controle, seguido do tratamento com OE de gengibre (*Zingiber officinale*). Os demais tratamentos não apresentaram conídios germinados, demonstrando toxicidade.

Os OEs não influenciaram de maneira significativa no comprimento dos conídios de *Cladosporium* spp, como pode ser visualizado na Tabela 20, enquanto que para a largura ambos os OEs influenciaram, não diferindo entre si, porém diferindo do tratamento controle (CN).

Tabela 20 - Tamanho de conídios de três colônias de *Cladosporium* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).

Isolados	Tamanho (μm) de conídio					
	Comprimento			Largura		
	CN	OE1	OE2	CN	OE1	OE2
13/12RS	5,17 aA*	5,26 aA	5,27 aA	2,48 bA	2,37 bA	2,38 bA
9RS	4,79 bA	4,66 bA	4,76 bA	2,62 abA	2,26 bB	2,38 bB
16/12RS	5,29 aA	5,23 aA	5,31 aA	2,80 aA	2,80 aA	2,84 aA
CV	2,74			5,27		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS *Cladosporium cladosporioides*, 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Hu et al. (2019), também encontraram inibição na germinação de esporos de colônias de *Aspergillus* spp. submetidas a diferentes concentrações de sete OEs. Para alguns isolados não houve diferença estatística entre as médias apresentada em cada um dos tratamentos enquanto que outros variaram, demonstrando assim, não só influencia do OE mas também do fator isolado.

Para a variável tamanho de ramoconídio, não houve diferença entre as médias apresentadas pelos OEs e o tratamento controle, com exceção do isolado *C. subuliforme*, o qual apresentou médias significativamente menores quando submetido ao OE1. Para a largura apenas para *C. pseudocladosporioides* os OE diferiram do tratamento controle, entretanto, não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 21).

Para *Pestalotiopsis* spp., os OEs influenciaram o diâmetro final da colônia de maneira distintas para *Pestalotiopsis* spp. (Tabela 22). Entretanto, embora as menores medias de diâmetro tenham sido apresentadas por colônias submetidas ao OE1, os valores observados em *P. cocculi* foram significativamente menores que os observados em *P. clavispota*, o que pode demonstrar uma maior susceptibilidade desta espécie às substâncias presentes em ambos os OEs, já que no tratamento controle não houve diferença entre as espécies.

Tabela 21 - Tamanho de conídio de três colônias de *Cladosporium* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 µL. mL⁻¹ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).

Isolados	Tamanho (µm) de ramoconídio					
	Comprimento			Largura		
	CN	OE1	OE2	CN	OE1	OE2
13/12RS	13,05 bA*	12,86 abA	12,82 cA	4,97 aA	3,32 aB	4,29 aB
9RS	13,21 bA	13,01 aA	13,24 bA	3,19 cA	3,15 bA	3,13 bA
16/12RS	16,27 aA	12,69 bB	16,22 aA	4,26 bA	4,22 aA	4,29 aA
CV	1,41			3,83		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: 16/2RS: *Cladosporium subuliforme*, 9RS *Cladosporium cladosporioides*, 13/12RS *Cladosporium pseudocladosporioides*.

Estudando a atividade antifúngica de diferentes concentrações do OE de *Salvia* spp. no crescimento micelial de seis isolados de *Aschochyta rabiei*, Yilar e Bayar encontraram diferenças entre as médias apresentadas por alguns isolados. Além disso, os autores não compararam as médias obtidas entre os isolados nos diferentes OEs por que destacam que cada um destes possui uma composição diferente, o que dificulta a análise, devido a heterogeneidade de constituintes.

Tabela 22 – Diâmetro final de colônia de duas colônias de *Pestalotiopsis* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 µL. mL⁻¹ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).

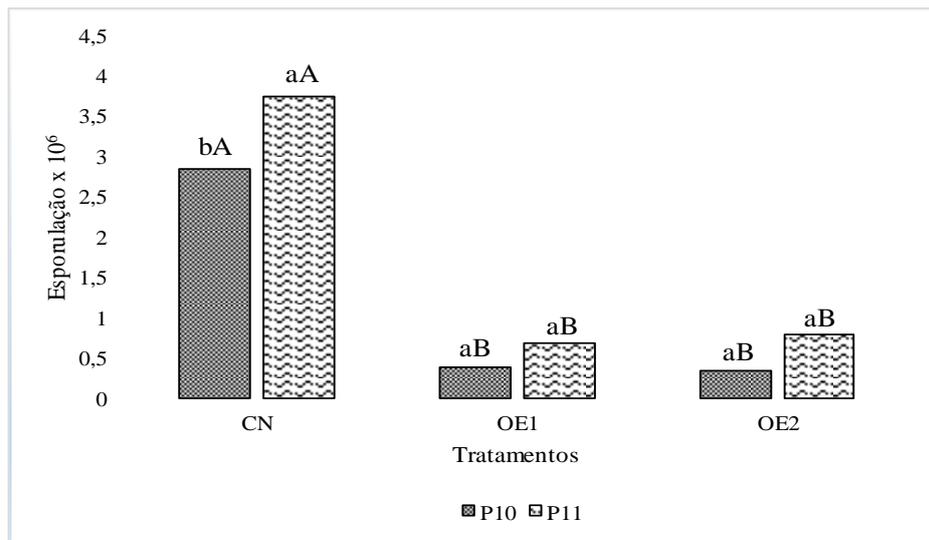
Isolados	Tratamentos		
	CN	OE1	OE2
P10	70,00 aA*	11,92 bC	43,11 aB
P11	70,00 aA*	16,85 aC	31,32 bB
CV	3,91		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: P10: *Pestalotiopsis clavisporea*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Com relação a esporulação de *Pestalotiopsis* spp. (Figura 15) foi possível constatar que, apesar de influenciarem de maneira negativa, isto é, proporcionando uma menor quantidade de conídios, quando se compara com o tratamento controle. As médias de conídios apresentadas

por *Pestalotiopsis* spp no tratamento controle foi superior a $2,5 \times 10^6$, enquanto que não ultrapassaram $1,0 \times 10^6$ conídios. mL^{-1} para ambos OEs. Deste modo, é possível afirmar que os OEs possuem o mesmo efeito redutor, já que não houve diferença estatística entre eles.

Figura 15 - Esporulação de duas colônias de *Pestalotiopsis* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de $1,0 \mu\text{L. mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).



Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam os isolados dentro de cada tratamento, maiúsculas comparam um isolado nos diferentes tratamentos e não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: P10: *Pestalotiopsis clavispora*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

Para a variável tamanho de conídio (Tabela 23), é possível perceber que os OEs influenciaram de maneira diferente o comprimento e a largura. Para o comprimento, *Pestalotiopsis clavispora*, apresentou as menores médias quando submetidas ao OE de *Ocimum gratissimum* (OE1). Neste tratamento, os conídios apresentaram média de $18,59 \mu\text{m}$, cerca de 40% menos que aqueles apresentados pelas colônias expostas ao OE2. Os conídios de *P. cocculi* por sua vez apresentaram largura significativamente menores quando submetidos ao OE2 quando comparados com o tratamento controle e o OE1, que não diferiram entre si.

Avaliando a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* submetidos a diferentes concentrações de três OEs Soylu et al. (2010), constataram redução na germinação, conforme aumentaram a concentração dos OEs. Além disso, os autores constataram interrupção total da emissão do tubo germinativo dos conídios. Neste sentido, estima-se que alterações no tamanho de conídios também possa alterar a germinação dos isolados deste trabalho.

Tabela 23 – Comprimento de conídios de duas colônias de *Pestalotiopsis* spp. cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OE1), *Hesperozygis ringens* (OE2) e etanol (CN).

Isolados	Tamanho (μm) de conídio					
	Comprimento			Largura		
	CN	OE1	OE2	CN	OE1	OE2
P10	30,76 aA*	18,59 aC	22,06 aB	6,55 bA	6,18 aA	7,43 aA
P11	26,70 bA	14,40 bB	12,60 bB	7,40 a A	7,40 aA	6,05 bB
CV	5,94			2,74		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Onde: P10: *Pestalotiopsis clavisporea*; P11: *Pestalotiopsis cocculi*.

4.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi possível a visualização das estruturas reprodutivas e vegetativas de *Cladosporium cladosporioides* (9RS). No tratamento controle foi possível visualizar em meio ao micélio, hifas diferenciadas, formadoras de conidióforos, muitos destes altos e ramificados com conídios subglobosos a ovoides, sem deformações severas (Figura 9, A, B e C). É possível visualizar na figura, os conídios em cadeia (A) e também o ramoconídio (B). Em “C” observa-se a “cicatriz” em um ramoconídio, característica comumente associada ao gênero, e que é a área de contato entre o conídio e o ramoconídio e visível após a liberação do primeiro.

Para os tratamentos com OE de *O. gratissimum*, na maior concentração utilizada (1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) foi possível observar deformações severas nas estruturas fúngicas de *C. cladosporioides* presentes nos discos depositados sobre o meio de cultura, com agregados de hifas enrugadas e vazias. Cabe lembrar que para esta concentração de OE não houve o desenvolvimento do micélio, sobre o meio de cultura e nem sobre o disco de meio de cultura. Em “D”, “E” e “F”, correspondentes ao tratamento na concentração de 0,50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ apresentam pouca variação estrutural das colônias quando comparadas ao tratamento controle.

As deformações apresentadas pelas colônias submetidas as concentrações mais elevadas do OE de *O. gratissimum* podem estar associadas a presença do componente majoritário do OE *O. gratissimum*, o Eugenol, um fenil propanoide. Os fenil-propanoide são conhecidos por serem extremamente tóxicos devido a presença de anéis aromáticos e servem como precursores

de uma série de polímeros naturais, os quais fornecem proteção contra a luz ultravioleta, defesa contra herbívoros e patógenos (TAIZ; ZIEGLER; MASSIMO, 2017).

Adams, Kunz e Weidenbörner (1996), estudando isoladamente o composto Eugenol, sobre colônias de *C. herbarum*, também constataram deformações no micélio de colônias submetida a diferentes concentrações do componente.

Segundo Inouye, (2003), a origem lipofílica e anaeróbica da membrana fúngica é o principal fator que permite a eficácia de OEs como forma de controle de patógenos. É ela que permite que os compostos tóxicos penetrem pela membrana fúngica e alteram os fluxos de cátions e prótons, essenciais para o funcionamento celular. (CASTRO; OLIVEIRA, 2016).

Por isso, é comum que estruturas fúngicas submetidas a concentrações de óleos essenciais apresentem deformações estruturais, tanto em seu micélio, como em estruturas reprodutivas. Phongpaichit et al. (2004), demonstraram que culturas fúngicas expostas a extratos de *Cassia* spp. apresentaram colapso e desnaturação celular após exposição. Estudando a ferrugem da soja, Medice et al. (2007), observaram em MEV que uredósporos submetidos a diferentes OEs de aspecto desidratados quando comparados com aqueles submetidos a apenas borrifagem com água destilada.

Estudando os efeitos de diferentes concentrações do OE de funcho (*Anethum graveolens*, Apiaceae), sobre *A. niger*, Tian et al. (2011), também constataram deformações severas em hifas fúngicas na maior concentração do OE. Os autores identificaram hifas rompidas, de aspecto rugado e vazias (o que também foi visualizado na figura 9), com visível perda da integridade dos conídios.

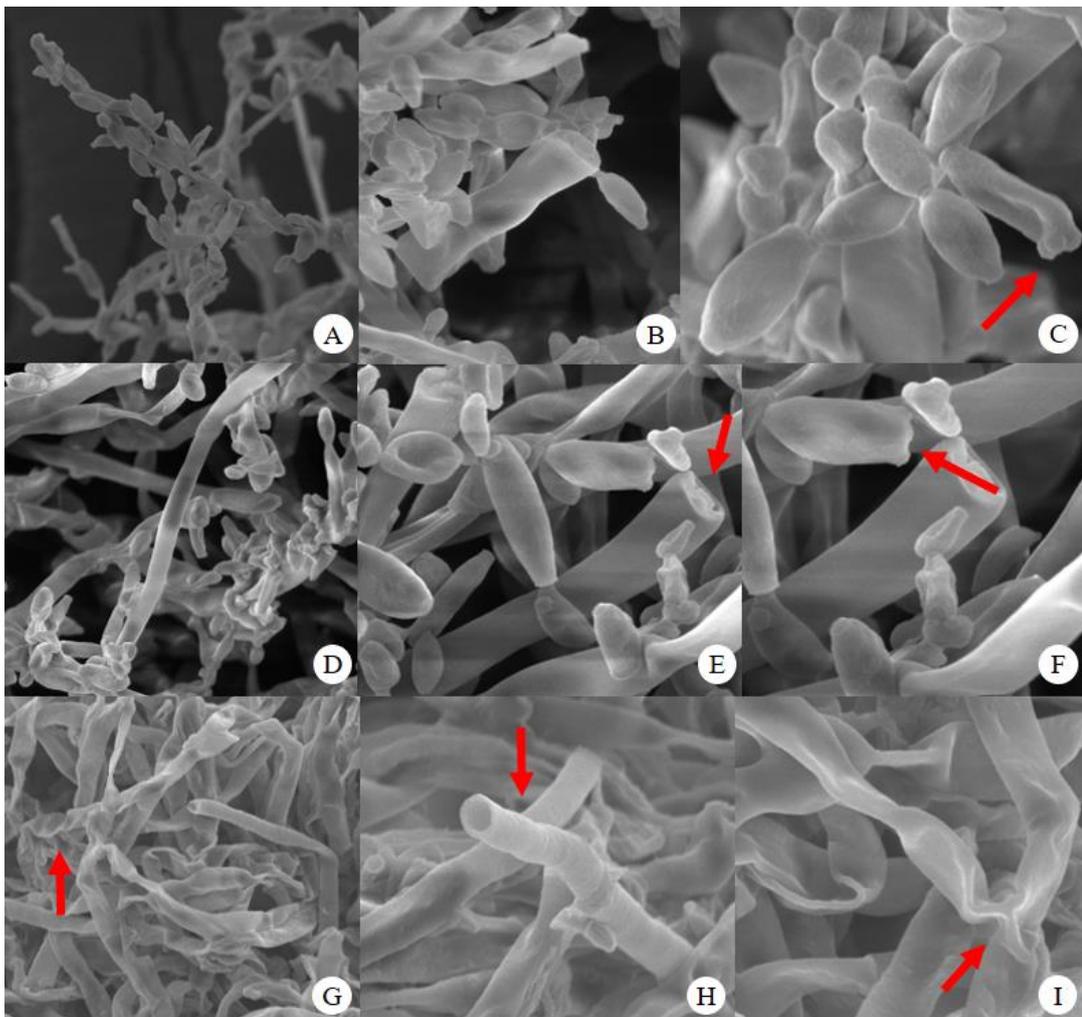
Para *Pestalotiopsis clavispora* (Figura 10), também foi possível a visualização de estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo. No tratamento controle, em “a”, é possível a visualização de acérvulos em meio ao micélio, enquanto que em “b” é observa-se em detalhes hifas. Na maior concentração utilizada, não foi observado conídios do isolado, já que essa concentração inibiu totalmente a esporulação do patógeno. Em “c”, apesar de não estar submetido ao OE, observa-se a desnaturação celular dos conídios, o que pode estar associado ao processo de secagem do material. Entretanto, no tratamento com 0,5 µL de OE é possível observar uma porcentagem bem maior de conídios com aspecto desnaturado. Este processo também pode ser visualizado em “g” e “h”, onde hifas também apresentaram aspecto rugoso e deformado.

Chen et al. (2020), avaliaram a atividade inibitória de *Mentha haplocalyx* conhecida popularmente como hortelã e *Schizonepeta tenuifolia*, planta amplamente utilizada pela medicina chinesa e conhecida por jing jie, contra sete patógenos fúngicos de ginseng (*Panax*

notoginseng). Durante os estudos, os autores além de identificar uma inibição de 100% no desenvolvimento dos micélios, constataram alterações estruturais severas em colônias de *Fusarium oxysporum*.

Han et al. (2019), estudaram a atividade antifúngica de diferentes concentrações do óleo essencial de crisântemo (*Chrysanthemum indicum*) como potencial agente de biocontrole contra o patógeno *Phytophthora nicotianae*. Os autores encontraram além de elevados valores de inibição do crescimento micelial, alterações morfológicas nas hifas do patógeno quando em contato com o OE.

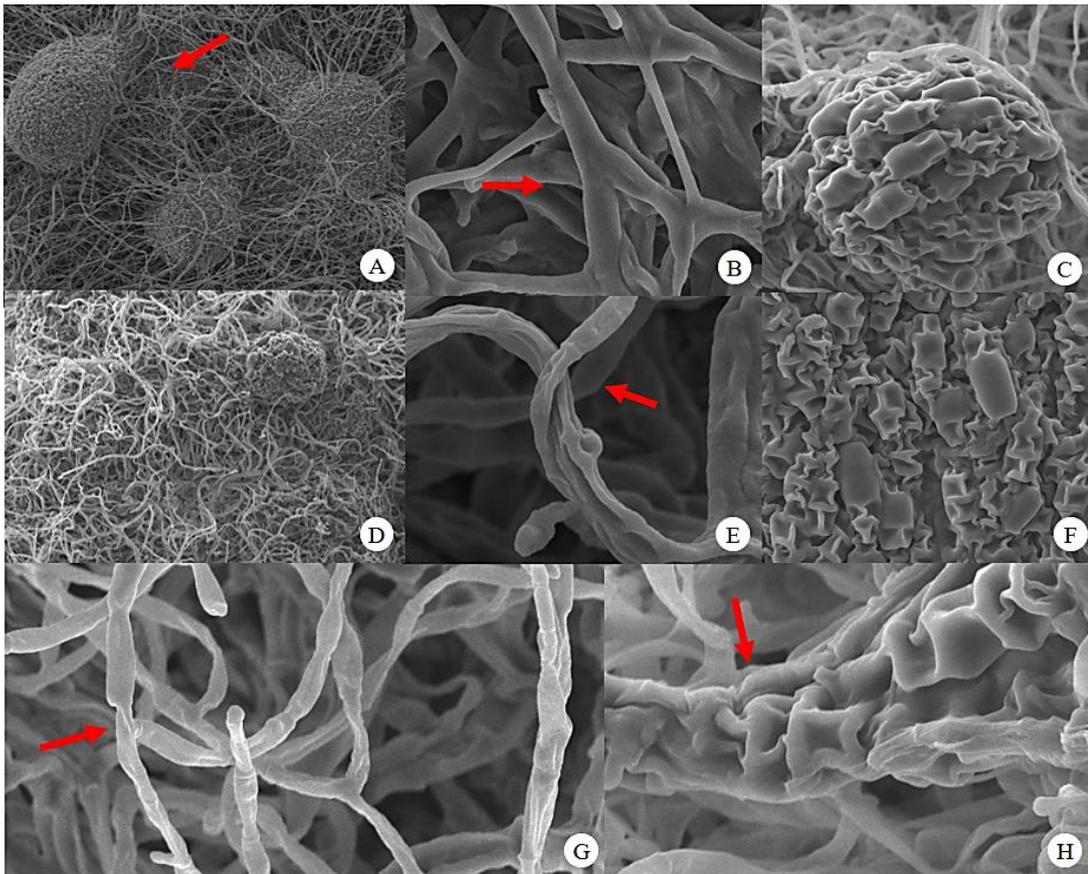
Figura 16 - Microscopia de varredura de colônias de *Cladosporium cladosporioides* cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*.



Onde: A, B, C: tratamento controle; D, E, F: concentração de 0,50 $\mu\text{L mL}^{-1}$; G, H, I: concentração de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Setas indicam: C e F: ramoconídio com detalhe de cicatriz; E: detalhe da área de contato entre a hifa modificada e o ramoconídio; G e I: hifa fúngica com deformação severa e desnaturação; H: estrutura tubular de hifa. A, D, G em 5 kV; B, E, H, 10 Kv; C, F, I 15 K.

Chen et al., (2018) observando características morfológicas por MEV constataram alterações dos micélios de colônias de *Pestalotiopsis microspora* tratadas com oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale*). Segundo os autores, durante a análise, a amostra controle de *P. microspora* apresentava micélios lisos, uniformes. No entanto, ainda segundo os autores os micélios pareciam, distorcidos, entrelaçados e amassados após exposição ao OE e nenhum conídio foi observado na estrutura. Além disso, os autores constataram um aumento na condutividade da membrana, que, segundo os mesmos é um indício do extravasamento dos eletrólitos da membrana fúngica, pela presença do OE.

Figura 17 - Microscopia de varredura de colônias de *Pestalotiopsis clavispora* cultivadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*.



Onde: A, B, C tratamento controle; D, E, F: concentração de $0,50 \mu\text{L. mL}^{-1}$; G, H: hifa fúngica com deformação severa e desnaturação; setas indicam: A: acérvulos entre o micélio fúngico. B: estrutura ramificada de hifa.

5 CONCLUSÕES

- Eugenol e Pulegona são compostos majoritários de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* respectivamente
- Os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* possuem atividade antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. subuliforme*, *Pestalotiopsis Clavispora* e *P. cocculi*, sendo a concentração utilizada um fator influente no diâmetro final da colônia, esporulação e morfologia dos conídios.
- Na concentração de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ o diâmetro final da colônia de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. foi significativamente reduzido pelo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sendo este, de forma geral, mais eficiente na redução quando comparado com o óleo essencial de *Hesperozygis ringens*, enquanto que na esporulação, tamanho de conídios e tamanho de ramoconídio em geral, não houve diferença entre as médias obtidas pelas variáveis analisadas nos diferentes óleos essenciais.
- A concentração de 1,25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* é capaz de causar severas deformações nas características morfológicas de *Cladosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.; KUNZ, B.; WEIDENBÖRNER, M. Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol or carvacrol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 535-540, 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1996.9700682>>. Acesso em: 14 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700682>.
- ADEBOLU, T. T.; OLADIMEJI, S. A. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 682-684, 2005. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/15166>>. Acesso em 21 set. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2005.000-3126>.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) em El Nordeste del Brasil. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p.43-64, 1998.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. ed. UFV, 2009, 457p.
- AL-SHAHRANI, M. H. et al. Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil. **Pharmacognosy Communications**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.phcogcommn.org/sites/default/files/10.5530pc.2017.1.5.pdf>>. Acesso em: 14 out 2019. DOI: 10.5530/pc.2017.1.5.
- AMARAL, L. P. **Caracterização química e avaliação biológica do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2014. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.
- ARRAS, G.; USAI, M. Fungitoxic Activity of 12 Essential Oils against Four Postharvest Citrus Pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheric Pressure Conditions. **Journal of Food Protection** v. 64, n.7, p. 1025-1029 2001. Disponível em:< <https://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-64.7.1025>>. Acesso em 21 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1025>.
- ASSIS, L. A. G. **Doenças fúngicas em espécies florestais nativas na Amazônia Central**. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006. Disponível em: <<https://bdtd.inpa.gov.br/bitstream/tede/1855/5/Disserta%20c3%a7%20a3o-Luiz%20Alberto%20Guimar%20es%20de%20Assis-CFT.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2019.
- AVASTHI, S.; GAUTAM, A.; BHADAURIA, R. First report of *Cladosporium sphaerospermum* causing leaf spot disease of *Aloe vera* in India. **Journal of Crop Protection**, v. 5, n. 4, p. 649-654, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Ajay_Gautam10/publication/312023548_First_report_of_Cladosporium_sphaerospermum_causing_leaf_spot_disease_of_Aloe_vera_in_India/links/5869f49e08ae8fce4917dbea/First-report-of-Cladosporium-sphaerospermum-causing-leaf-spot-disease-of-Aloe-vera-in-India.pdf>. Acesso em: 20 out. 2019.
- BAÑOS, S. B.; LÓPEZ, M. H.; NECHA, L. L. B. Antifungal screening of plants of the State of Morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and

vegetables. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 18, n. 1, p. 36-41, 2000. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/612/61218105.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2019.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1972, 241p.

BASER, K. H. C.; KIRIMER, N.; TÜMEN, G. Pulegone-rich essential oils of Turkey. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 1998. Acesso em: 14 jan. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1998.9700830?casa_token=-wKjFzPm0CwAAAAA:WRgJoouAjqTxZumMcoWlzUH8cWLe9GD0FoVSWtpWJePYKBnIzbxFyf09xSuZsqa0vDUKceMihfMkNUIN>.DOI: <<https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700830>>.

BASSETO, M. A. et al. Mancha areolada de Thanatephorus da seringueira na Amazônia: identificação filogenética e variação genética em populações do patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 3, p. 285-294, 2019. Disponível em:<>. Acesso em 20 mar. 2020.

BORDIGON, S. **Flora digital do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2020. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/imagens/1639e848c9414751e12d02b56fd999a3a8ac.JPG>>. Acesso em 25 fev. 2020.

BENDENDO, I. P. Manchas foliares. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 1, 4. ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2011. 451p.

BENSCH, K et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in mycology**, v. 72, p 1-401, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600713>>. Acesso em: 22 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim0003>.

BORRERO, C.; CASTAÑO, R.; AVILÉS, M. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) Causing Canker and Twig Dieback on Blueberry Bushes in Spain. **Plant Disease**, v. 102, n. 6, p. 1178-1178, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>>. Acesso em: 19 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **portal AGROFIT**, Brasília, 2019. Disponível em:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 set 2019.

BRESSAN, D. F. et al. Patologia e germinação de sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida* (benth) brenan) e potencial de óleos essenciais no controle de *Rhizoctonia* sp. *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista técnico-científica**, n. 10, maio 2018. Disponível em : <http://creaprw16.crea-pr.org.br/revista/sistema/index.php/revista/article/view/311>. Acesso em: 09 out. 2019.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinais**. v.1, 2.ed. Zaragoza: Editora Acribia S. A, 2001. 1082p. Disponível em:

<https://tejadarossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia_bruneton.pdf>. Acesso em: 11 set. 2019.

BUCKLE, J. Clinical Aromatherapy-E-Book: **Essential Oils in Practice**. Elsevier Health Sciences, 446 p. 2014.

CASTRO, R. D. de; LIMA, E. de O. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de odontologia UNESP (Online)**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010. Disponível em: <<https://revodontolunesp.com.br/article/588018b07f8c9d0a098b4d7f/pdf/rou-39-3-179.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2019. ISSN: 1807-2577.

CARTA, C.; MORETTI, M.D.L; PEANA, A. T. Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. **Journal of Essential Oil Research**. v, 8, n. 4, p. 399-404. 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1996.9700647>>. Acesso em 19 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700647>.

CHARLES, D. D. et al. Antifungal potential of essential oils, aqueous and ethanol extracts of thirteen plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary as major tomato pathogens in Cameroon. **International Journal of Current Science.**, v. 19, n. 2, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Galani_Joseph_Hubert/publication/301634188_Antifungal_potential_of_essential_oils_aqueous_and_ethanol_extract_of_thirteen_plants_against_Fusarium_oxysporum_f_sp_Lycopersici_and_Phytophthora_infestans_Mont_de_Bary_as_major_tomato_pathogens_in_C/links/571ef9b608aed056fa2276e9/Antifungal-potential-of-essential-oils-aqueous-and-ethanol-extracts-of-thirteen-plants-against-Fusarium-oxysporum-f-sp-Lycopersici-and-Phytophthora-infestans-Mont-de-Bary-as-major-tomato-pathogens-in.pdf>. Acesso em: 13 out. 2019. ISSN 2250-1770.

CHEN, R.-S. et al. First report of papaya scab caused by *Cladosporium cladosporioides* in Taiwan. **Plant disease**, v. 93, n. 4, p. 426-426, 2009. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-4-0426C>>. Acesso em: 01 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-4-0426C>.

COSTA, A.R.T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.2, p. 240- 245, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000200018>. Acesso em: 05 nov. 2018. DOI: 10.1590/S1516-05722011000200018.

CRAVEIRO, A. A; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993. Disponível em: <[http://submission.quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/1993/vol16n3/v16_n3_%20\(9\).pdf](http://submission.quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/1993/vol16n3/v16_n3_%20(9).pdf)>. Acesso em: 21set .2019.

DA SILVA, V. A **Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies florestais** 67 p. (Mestrado em Engenharia Florestal) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

DI STASI L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, E. UNESP, 1996. 230p.

DOLWITSCH, C.B. et al. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: um estudo envolvendo extração, perfil químico, antioxidante e atividade biológica. **Pesquisa de Produtos Naturais**, p. 1-6, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2019.1710703>>. Acesso em 28 mar.2020.

DOS SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. **Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.

DUBEY, N. K. et al. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 567-569, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X00002069>>. Acesso em: 21 out. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00206-9](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00206-9).

DUGAN, F. M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. **Check-list of *Cladosporium* names.** Institut für Geobotanik und Botanischer Garten, 2004. Disponível em: <<https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H208/checklist.pdf>>. Acesso em: 22 set.2019.

EBADI, M.T. et al. Packaging methods and storage duration affect essential oil content and composition of lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.). **Food science & nutrition**, v. 5, n. 3, p. 588-595, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.434> >. Acesso em: 14 dez 2019.

ESPINOSA-GARCIA, F. J.; LANGENHEIM, J. H. Effect of some leaf essential oil phenotypes in coastal redwood on the growth of several fungi with endophytic stages. **Biochemical systematics and ecology**, v. 19, n. 8, p. 629-642, 1991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030519789190079F>>. Acesso em: 14 dez 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(91\)90079-F](https://doi.org/10.1016/0305-1978(91)90079-F).

FERREIRA, B. W. et al. Esclarecimento taxonômico de duas espécies de *Cercospora* spp. causando manchas nas folhas de *Neomarrubium* spp. no Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 2, p. 697-705, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-019-01805-z>>. Acesso em: 25 out 2019.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, p.1039-1042, 2009.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa: UFV, SIF, 570 p., 1989.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**. n. 23, p. 213-226, mai., 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.1875>>. Acesso em: 18 out. 2019. DOI: doi.org/10.1002/ffj.1875.

- FISCHER, I. H. et al. Effect of conventional and alternative products on postharvest disease control in avocados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, 2018. Disponível em : <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010029452018000100301&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 26 dez. 2019.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 44, p. 406-490, 2006.
- FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria, Ed. UFSM, 2016. 424p.
- GATTO, D. A. et al. Características tecnológicas das madeiras de *Luehea divaricata*, *Carya illinoensis* e *Platanus x acerifolia* quando submetidas ao vergamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 121- 131, 2008. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/516>>. Acesso em 10 out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/19805098516>.
- GILMAN, E. F.; WATSON D. G. *Carya illinoensis* pecan. **Fact Sheet St-122**. Nov. 1993. 3 p. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/trees/CARILLA.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2019.
- GONCALVES, R. et al. Aspectos epidemiológicos da antracnose-foliar da seringueira no Acre, Brasil. In: **Embrapa Acre-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 5., 2017, Goiânia. Anais... Goiânia: APROB-GO/TO, 2017., 2017.
- GREGORY S. **Royal Botanic Gardens Kew**. Reino Unido, 2020. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:452969-1>>. Acesso em 26 fev. 2020
- HAN, Y. Z. et al. First Report of *Cladosporium tenuissimum* Associated with Leaf Spot of Alfalfa (*Medicago sativa*) in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1778-1778, 2019. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-12-18-2295-PDN>>. Acesso em: 12 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2295-PDN>.
- HAN, X. B. et al. Essential oil of *Chrysanthemum indicum* L.: Potential biocontrol agent against plant pathogen *Phytophthora nicotianae*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 7013-7023, 2019.
- HORST, R. K.; Leaf Spots. In: **Westcott's Plant Disease Handbook**, 8 ed. Ed. Springer. p. 201-236, 2013.
- HU, F. et al. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110821, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519306118>>. Acesso em: 26 fev. 2020.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, **PAÍSES**. Disponível em: <<https://paises.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 21 set. 2019.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Naturally occurring bioactive compounds**, v. 3, p. 29-44, 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572557X06030029>>. Acesso em: 20 dez. 2019. DOI: [doi.org/10.1016/S1572-557X\(06\)03002-9](https://doi.org/10.1016/S1572-557X(06)03002-9).

JUNIOR, G. J. da S.; BEHLAU F. Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 1, 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2017. 572p.

KÉITA, S. M. et al. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. **Flavour and fragrance journal**, v. 15, n. 5, p. 339-341, 2000. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-1026\(200009/10\)15:5%3C339::AID-FFJ922%3E3.0.CO;2-H?casa_token=rtUKmrP82fcAAAAA:YzP4HPi4o8InO5u7jQbmvzfJJbgy3uJlKX_JGgMTqVmNb4NLEVaP-TcZKg3vucrKIoXUpbpv1xP9dUvdqA](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-1026(200009/10)15:5%3C339::AID-FFJ922%3E3.0.CO;2-H?casa_token=rtUKmrP82fcAAAAA:YzP4HPi4o8InO5u7jQbmvzfJJbgy3uJlKX_JGgMTqVmNb4NLEVaP-TcZKg3vucrKIoXUpbpv1xP9dUvdqA)>. Acesso em: 21 set. 2019. DOI: [doi.org/10.1002/1099-1026\(200009/10\)15:5<339::AID-FFJ922>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200009/10)15:5<339::AID-FFJ922>3.0.CO;2-H)

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 16-23, 2006. Disponível em:

<<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PD-90-0016>>. Acesso em: 01. out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0016>.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-132. 2010.

KOC, S. et al. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* PH Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari:

Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 316-319, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401712005936>>. Acesso em 13 out 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.010>.

KUMAR, A. et al. Delineation of *Ocimum gratissimum* L. complex combining morphological, molecular and essential oils analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 139, 2019. Disponível em

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019303255>>. Acesso em 12 nov. 2019. Acesso em: 19 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111536>

LAGO, J. H. G. et al. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. D C. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96-98, 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874390009000202>>. Acesso em: 14 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.01.001>.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. 156 p. (Doutorado em Engenharia Florestal) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

LAZAROTTO, M et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 440-448, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2014000600440&script=sci_arttext&tlng=pt . Acesso em: 10 out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000600005>.

LAZAROTTO, M. et al. First report of *Fusarium equiseti* associated on pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 6, p. 847-847, jun. 2014. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-13-0976-PDn> >. Acesso em: 03 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0976-PDn>.

LEE, H. C.; CHENG, S.S; CHANG, S.T. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 12, p. 2047-2053, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.2216?casa_token=u6gQN2IoBbMAAA%3AIsqppHZg9ee5CoKGBbDT0D6mPLm_PS1u9M4VRkiiKK5Tf1MrZYgQKpnymZ394cbJe2teuWE_3HqmTzP4IA> .Acesso em 11 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2216>.

LESINA, E. Cultivo da noz-pecã se expande e ganha espaço no Rio Grande do Sul. **Jornal do Comércio**. Porto Alegre, 10 fev. 2020. Disponível em: <https://www.jornaldocomercio.com/_conteudo/economia/2020/02/724121-cultivo-da-noz-pecã-se-expande-e-ganha-espaco-no-rio-grande-do-sul.html>. Acesso em 25 fev. 2020.

LIMA, R. K.; Cardoso M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3 n.3s et 2007, 24 p.

LINARD, C. F. B. M. **Estudo do efeito antinociceptivo do eugenol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2008.

LIU, Y. L. et al. First Report of Castor Leaf Spot Caused by *Cladosporium tenuissimum* in Zhanjiang, China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 103, n. 2, p. 375, fev. 2019. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-18-1382-PDN>. Acesso em 11 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1382-PDN> .

LONDHE, A. M.; KULKARNI, A. S.; LAWAND, R. V. *In-Vitro* Comparative Study of Antibacterial and Antifungal Activities: A Case Study of *Ocimum kilimandscharicum*, *Ocimum tenuiflorum* and *Ocimum gratissimum*. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n.1, 2015. Disponível em: <<http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/7/IJPPR,Vol7,Issue1,Article15.pdf>>. Acesso em: 08 nov. 2019. ISSN: 0975-4873

LUAN, Y. S. et al. First report of a *Pestalotiopsis* sp. causing leaf spot of blueberry in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 1, p. 171-171, jan. 2008. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-1-0171A>>. Acesso em: 15 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0171A>.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 95-

129, 2012. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-012-0198-1>>. Acesso em 21 dez. 2019.

MADJOUKO, M. A. et al. Inhibitory effects of essential oils from *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* on *Colletotrichum musae*: The causal agent of bananas anthracnose. **Jornal de Fitopatologia**, v. 167, n. 5, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jph.12793>>. Acesso em: 18 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12793>.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 121-186, 2014. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000116>>. Acesso em 21 dez. 2019.

MANTZ, R. J. et al. Occurrence of scab disease of pecan caused by *Cladosporium caryigenum* in Argentina. **Plant Pathology**, v. 58, 2009. Disponível em: <<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/82692>>. Acesso em 16 out 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02035.x>.

MARTINI, M. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural product communications**, v. 6, n. 7, p1-4. 2011. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1100600726>>. Acesso em 14 out 2019.

MARTINS, C. R. et al. Cultura da noz-pecã para uma agricultura familiar. In: WOLFF, L. F.; MEDEIROS, C. A. B. **Alternativas para a Diversificação da Agricultura Familiar de Base Ecológica**. EMBRAPA, 74p, 2017.

MARTINS, C. R. et al. **Situação e Perspectivas da noqueira-pecã no Brasil**. EMBRAPA, 31p. 2018.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cagro/v31n1/v31n1a13.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2019.

MISHARINA, T. A. et al. Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 311-316, 2003. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023592030874>>. Acesso em 21 fev. 2020.

MITH, H. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum* and *Ocimum gratissimum* in function of harvesting time. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 6, p. 1413-1425, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.890076>>. Acesso em: 21. out 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.890076>

MOHR, F. B. M. et al. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/7797/2fb88d56a233d8b579766003683430d68ac6.pdf>>. Acesso em 12 nov. 2019.

MOREIRA, G. T. S. Identificação e caracterização morfológica de fungos na mancha-de-alternaria em plantas de Hevea spp. no Acre. In: **Embrapa Acre-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFAC, 26, 2017. Rio Branco. Anais... Rio Branco: Ufac, 2018.

NASCIMENTO, J. M. et al. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu-SP**, v. 15, n. 4, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Ademar_Serra/publication/262439309_Inhibition_of_the_mycelial_growth_of_Cercospora_calendulae_Sacc_by_medicinal_plants_extracts/links/0c96053b6a5d7151cd000000.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2019.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p. 1451-1474, 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>>. Acesso em: 30 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.

OBREGÓN, V. G. et al. First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina. **Plant Disease**, v. 102, n. 9, p. 1856-1856, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>>. Acesso em 11 out 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511-523, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Gleilton_Sales/publication/305694469_Atividade_antifungica_e_possivel_mecanismo_de_acao_do_oleo_essencial_de_folhas_de_Ocimum_gratissimum_Linn_sobre_especies_de_Candida/links/57a9af8d08ae659d182494c8.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2019.

PHONGPAICHIT, S, et al. Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. **Songklanakarinn Journal Science Technology**, v. 26, n. 5, p. 741-48, 2004. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.628.913&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 01 nov. 2019.

PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (benth.) epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. 2014. (Mestrado em Engenharia Florestal) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 2, p. 139-141, 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1996.9700581>>. Acesso em: 21 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700581>.

POLTRONIERI, L. S. et al. The first registration of *Exserohilum rostratum* (anamorph of *Setosphaeria rostrata*) causing leaf spots on Euterpe oleracea in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, 2008.

PRAKASH, B. et al. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, v. 44, n. 1, jan 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996910003637>. Acesso em 29 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.002>.

REYES-VÁZQUEZ, N. C.; URREA-LÓPEZ, R. Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la nuez pecanera en México. **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco**, Guadalajara, México, 2016.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2506-2509, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240901520X>>. Acesso em: 12 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.016>.

ROLIM, J. M. **Caracterização morfofisiológica e molecular de *Fusarium* spp., agente causal da murcha em *Carya illinoensis* k.74 p.** (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

ROLIM, J. M. et al. Antagonism and Effect of Volatile Metabolites of *Trichoderma* spp. on *Cladosporium* spp. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872019000200138&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 nov. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.059417>.

ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14219?casa_token=6PUGEDcuBxMAAAA%3ALupmcCzzNklTvf8_9l0JxXt4Qi4BJTDM9myACudDLbxWyw_9m0eWRAI63edxcrPX9IIfv6-LUvXLo3Kn>. Acesso em 28 mar. 2020.

SAMPAIO T. S. et al. Antifungal activity of essential oils of *Myrcia ovata* chemotypes and their major compounds on phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal**, v.36, n.2. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/42315/28086>>. Acesso em 28 mar. 2020.

SANTOS, C. C. et al. First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Leaf Spot on Macadamia in Brazil. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 103, n.7, jul. 2019. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-19-0108-PDN>>. Acesso em 11 out 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0108-PDN>.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SEAPDR. **SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**. Porto Alegre, RS, 2019.

SEIFY, Z. et al. Essential Oil Composition of *Rosa damascena* Mill. Produced With Different Storage Temperatures and Durations. **원예과학기술지**, v. 36, n. 4, p. 552-559, 2018.

Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Essential-Oil-Composition-of-Rosa-damascena-Mill.-Seify-Yadegari/ca51f78fc47453663091b837724c67e71961d3b3>>. Acesso em 14 mar. 2020.

SEZIK, E.; TÜMEN, G.; BAŞER, K. H. C. *Ziziphora tenuior* L., a new source of pulegone. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 6, n. 1, p. 101-103, 1991. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.2730060116>>. Acesso em 14 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730060116>.

SHUKLA, R. et al. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 165-170, 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160509003894>>. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.002>

SILVA, L. de L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-62252013000200443&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em 14 jan 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252013000200014>.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

SIMON, J. E. et al. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. **Perspectives on new crops and new uses**, v. 16, p. 499-505, 1999. Disponível em: <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/pdf/v4-499.pdf>. Acesso em: 13 out 2019.

SINGH, H. N. P.; PRASAD, M. M.; SINHA, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 269-271, 1993. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01463.x>>. Acesso em: 16 out 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01463.x>

SIRIPORNVISAL, Sirirat. Antifungal activity of ajowan oil against *Fusarium oxysporum*. **CURRENT APPLIED SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 10, n. 2, p. 45-51, 2010. Disponível em: <<https://www.tci-thaijo.org/index.php/cast/article/view/136510>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

SOUZA, E. M. et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of two essential oils. **Boletim. Instituto da Pesca**, v. 1, p. 1-4, 2018.

SOYLU, E. M.; et al., *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International journal of food microbiology**, v. 143, n. 3, p. 183-189, 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160510004757>>. Acesso em 23 mar. 2020.

SUKCHAROEN, O.; SIRIROTE, P.; THANABORIPAT, D. Potential of *Melodorum fruticosum* Lour. essential oil against aflatoxigenic *Aspergillus* strains. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 2 abr. 2018. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=c2b72725-45fa-4304-8249-5b860ec19b82%40sessionmgr4006>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

SUTILLI, F. J **ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS FÁRMACOS CONVENCIONAIS NA PRODUÇÃO DE PEIXES**. 62 f. (Doutorado em Engenharia Florestal) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.

TAIZ, L ZIEGLER E.; MASSIMO, M. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2017. 888 p.

TIAN, J. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1992-1999, 2011. Disponível em : <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511002192>>. Acesso em: 06 jan 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.018>.

TZORTZAKIS, G. N.; Ekonomakis C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856407000045>>. Acesso em 27 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.002>.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008. <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pub/article/view/498/5617>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 3, p. 287-304, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197800000624>>. Acesso em 13 out 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00062-4)

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; ZEVALLOS, L. C. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, Texas, v. 102, n. 4, Jul. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606005796%20L>>. Acesso em: 10 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.024>

VON POSER, G. L. et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950653c>>. Acesso em 12 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf950653c>.

WALKER, C. et al. First report of species in the *Cladosporium cladosporioides* complex causing pecan leaf spot in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 98, n. 12, 2016. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3514> >. Acesso em: 22 out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V98I2.012>.

WALKER C. et al., Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, 2016.

ZHANG, Y. et al. A novel species of *Pestalotiopsis* causing leaf spots of *Trachycarpus fortunei*. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, n. 3, p. 311-319, 2012. Disponível em: <https://bioone.org/journals/Cryptogamie-Mycologie/volume-33/issue-3/crym.v33.iss3.2012.311/A-Novel-Species-of-Pestalotiopsis-Causing-Leaf-Spots-of-Trachycarpus/10.7872/crym.v33.iss3.2012.311.short>. Acesso em: 22 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.7872/crym.v33.iss3.2012.31>