

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIA RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA

Simone Bernardes da Fontoura

**Avaliação da atividade fungitóxica de extrativos de *Cupressus lusitanica*
contra *Alternaria porri***

Curitibanos
2019

Simone Bernardes da Fontoura

**Avaliação da atividade fungitóxica de extrativos de *Cupressus lusitanica*
contra *Alternaria porri***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Agronomia
do Centro de Curitiba da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do Título de
Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Soldi

Coorientador: Engenheiro Agrônomo André Luiz Graf Junior

Curitiba
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Fontoura, Simone
Avaliação da atividade fungitóxica de extrativos de
Cupressus lusitanica contra Alternaria porri / Simone da
Fontoura ; orientador, Cristian Soldi, coorientador,
André Luiz Graf Junior, 2019.
34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

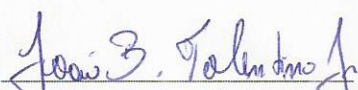
1. Agronomia. 2. Controle Alternativo. 3. Óleo
essencial. 4. Produtos Naturais. 5. Extrato hidroalcoólico.
I. Soldi, Cristian . II. Luiz Graf Junior, André. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. IV. Título.

Simone Bernardes da Fontoura

**Avaliação da atividade fungitóxica de extrativos de *Cupressus lusitanica*
contra *Alternaria porri***

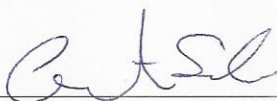
Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Agronomia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitiba, 22 de novembro de 2019



Prof. Dr. Joao Batista Tolentino Junior
Subcoordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Cristian Soldi
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.a. Dra. Adriana Terumi Itako
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Dilma Budziak
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos astros, que me guiaram e me iluminaram para alcançar meus objetivos de viver e conquistar tudo que tenho sem que eu perdesse a esperança.

À UFSC, pela oportunidade de aprendizado, crescimento profissional e pessoal.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cristian Soldi por ter me orientado e sempre estar disposto a me ajudar.

As minhas amigas Kristem Silva, Jhennifer Moraes Dias, Laura Vezzani e ao meu amigo Erick Santos Machado que me acompanharam nessa caminhada.

Em especial André Luiz Graf Junior, que me ajudou na elaboração e execução deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de química, que sempre estiveram à disposição para me auxiliar.

Aos colegas Saimom Poczapski Noro Ribeiro e Paula Rodrigues

Em especial ao meu amigo Geraldo Paulino Filho que sempre me incentivou a buscar e realizar meus sonhos.

"Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça." (Cora Coralina)

RESUMO

A *Alternaria porri* é o patógeno causador da doença mancha púrpura, apontada como uma das principais doenças da parte aérea do alho, em condições ideais pode provocar perdas de até 60% da produção. O uso excessivo de agrotóxicos vem aumentando nos últimos anos, causando risco na saúde dos agricultores e contaminação do meio ambiente, além disso o uso indiscriminado provoca resistência do patógeno aos fungicidas. Atualmente busca-se alternativas para o controle de doenças fúngicas que sejam mais seguras e de baixo custo. Uma opção de controle é o uso de extrativos de plantas com potencialidade antifúngica. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de extrativos de *Cupressus lusitanica* sobre o crescimento da *A. porri*, fungo causador de doença no alho. Para os ensaios, foram utilizados o extrato hidroalcoólico bruto e o óleo essencial, ambos obtidos da madeira seca de *C. lusitanica*. Para obtenção do extrato hidroalcoólico o material vegetal triturado em moinho de Wiley foi macerado exaustivamente em etanol 92 INPM obtendo-se 1,74% de rendimento. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, com rendimento de 0,073%, em extrator Clevenger modificado durante 6 horas, utilizando material seco e moído. Os componentes químicos do óleo essencial foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CGEM). Foi observado que o óleo essencial da madeira seca de *C. lusitanica* é composto por 76,4% da substância aromática carvacrol. Para os ensaios de atividade fungitóxica *in vitro*, foram utilizados o extrato hidroalcoólico bruto (EHB), o óleo essencial e o carvacrol (padrão comercial) nas concentrações de 0, 100, 250 e 500 ppm. Para a avaliação dos resultados, foi analisado o crescimento micelial da colônia fúngica. Um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições para cada bioensaio foi adotado. Para avaliar a inibição do crescimento de *A. porri*, foram realizadas duas medidas opostas do diâmetro do crescimento do fungo. A avaliação iniciou após 24h da montagem do experimento. O extrato EHB inibiu o crescimento micelial (AACCM) do fungo em 50% e apresentou índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de 0,02 cm/h, na dosagem de 500 ppm. Quanto ao teste realizado com o óleo de *C. lusitanica* nas concentrações (100, 250 e 500 ppm) apresentaram resultados diferentes estatisticamente, a AACCM mostrou um crescimento de 72, 37 e 27% em relação a testemunha. Já o IVCM 0,02, 0,01 e 0,01 cm/h, respectivamente, assim como o componente majoritário carvacrol nas mesmas dosagens teve AACCM de 56%, 27% e 21% e quanto ao IVCM teve crescimento de 0,02, 0,008 e 0,005 cm/h em relação ao fungo *A. porri*.

Palavras-chave: Controle alternativo. Óleo essencial. Produtos naturais. Extrato hidroalcoólico bruto.

ABSTRACT

The *Alternaria porri* is the pathogen that causes the purple spot disease, pointed as one of the main diseases of garlic shoot, under ideal conditions can cause losses of up to 60% of production. Excessive use of pesticides has increased in recent years, causing risk to farmers' health and environmental contamination, and indiscriminate use causes resistance of the pathogen to fungicides. Currently, alternatives are being sought for safer and lower cost fungal disease control. One control option is the use of plant extracts with antifungal potential. The objective of this work is to evaluate the in vitro effect of *Cupressus lusitanica* extracts on the growth of *A porri*, fungus that causes disease in garlic. For the tests, the crude hydroalcoholic extract and the essential oil, both obtained from *C lusitanica* dry wood, were used. In order to obtain the hydroalcoholic extract the plant material crushed in a Wiley mill was thoroughly macerated in 92 INPM ethanol yielding 1.74% yield. The essential oil was obtained by hydrodistillation in 0.073% yield on modified Clevenger extractor for 6 hours using dry and ground material. The chemical components of the essential oil were characterized by gas chromatography coupled to the mass spectrometer (CGEM). It was observed that the essential oil of *C lusitanica* dry wood is composed of 76.4% of the carvacrol aromatic substance. For in vitro fungitoxic activity assays, crude hydroalcoholic extract (EHB), essential oil and carvacrol (commercial standard) at concentrations of 0, 100, 250 and 500 ppm were used. To evaluate the results, mycelial growth of the fungal colony was analyzed. A completely randomized design with 4 treatments and 5 replications for each bioassay was adopted. To evaluate the inhibition of *A. porri* growth, two opposite measurements of fungal growth diameter were performed. The evaluation began 24 hours after the experiment was set up. EHB extract inhibited mycelial growth (AACCM) of the fungus by 50% and presented mycelial growth rate index (IVCM) of 0.02 cm / h at a dosage of 500 ppm. Regarding the test performed with *C lusitanica* oil at concentrations (100, 250 and 500 ppm) showed statistically different results, the AACCM showed a growth of 72, 37 and 27% in relation to the control. While the IVCM 0.02, 0.01 and 0.01 cm / h, respectively, as well as the major component carvacrol at the same dosages had AACCM of 56%, 27% and 21% and for IVCM had growth of 0.02, 0.008 and 0.005 cm / h in relation to the fungus *A porri*.

Keywords: Alternative control. Essential oil. Natural products. Crude hydroalcoholic extract.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	JUSTIFICATIVA.....	8
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	Objetivo geral.....	9
1.2.2	Objetivos específicos	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	PRODUÇÃO DE ALHO NO BRASIL.....	10
2.2.2	Mancha púrpura (<i>Alternaria porri</i> (Ellis) Ciff).....	11
2.2.3	Controle alternativo de doenças em plantas	12
2.2.4	<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	MATERIAL VEGETAL	16
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATIVOS DA MADEIRA SECA DE <i>Cupressus lusitanica</i>	16
3.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CGMS.....	16
3.3.1	Isolamento do fungo <i>Alternaria porri</i>	17
3.3.2	Avaliação da ação do extrato sobre <i>Alternaria Porri</i>	17
3.3.3	Avaliação da ação dos óleos do <i>Cupressus lusitanica</i> e do Carvacrol sobre o fungo <i>Alternaria porri</i>	18
3.3.4	Análise de dados.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL	20
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATIVOS SOBRE <i>Alternaria porri</i>	23
5	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, onde se pratica a agricultura em grande escala, o manejo de pragas e doenças é realizado com produtos químicos. Por causa disso a segurança alimentar é uma preocupação indispensável tanto para o consumidor final como para a indústria alimentícia, uma vez que o número de casos de intoxicação associadas aos alimentos vem aumentando (KIMATI, 2005). A utilização racional de defensivos agrícolas em curto período pode apresentar resultados positivos na produção de alimentos, assim como na saúde do agricultor. Porém deve se pensar na utilização de alternativas mais sustentáveis, que venham a ser empregadas no manejo de pragas e doenças de plantas (BETTIOL, 2009). No cenário mundial, grupos de produtores tem cultivado alimentos de um modo alternativo e sustentável, estimulando a investigação de medidas de proteção das plantas contra doenças e pragas (ZADOKS, 1992).

O cultivo sustentável é uma opção, sendo definida como aquela agricultura que emprega recursos naturais com sensatez, focando nas necessidades das gerações presentes e futuras, inclui a utilização de compostos químicos presentes nas plantas e que são resultantes do metabolismo primário e secundário (CRUZ *et al.*, 2013). Assim, uma mudança de produtos químicos sintéticos para agentes antimicrobianos de ocorrência natural tem ganhado notoriedade devido à segurança ambiental e o modo de ação bioracional (LAZAROTTO *et al.*, 2009).

Um dos métodos alternativos que podemos explorar são os metabólitos secundários de espécies vegetais, aparecendo como uma opção viável e eficiente, tanto do ponto de vista econômico como ambiental (RODRIGUES *et al.*, 2009). O controle alternativo aos pesticidas tóxicos, é interessante aos produtores rurais pela facilidade de obtenção, uma vez que as plantas podem ser cultivadas nas pequenas propriedades agrícolas (CUNICO *et al.*, 2006).

Neste contexto, óleos essenciais, extratos e compostos isolados de plantas têm sido pesquisados como uma alternativa para controlar o crescimento fúngico. Já está bem estabelecido que as plantas contem compostos bioativos que inibem o crescimento microbiano e em função disto, grandes esforços têm sido direcionados, na busca de métodos alternativos, seguros e de baixo custo, para o controle de doenças em plantas (YAMAMOTO, 2013).

Uma estratégia que vem sendo adotado é a exploração de compostos provenientes de extratos brutos ou óleos essenciais de plantas que podem ativar a resistência das plantas de forma sistêmica ou então apresentar efeito tóxico diretamente sobre o patógeno.

Devido a relevância da dificuldade de controle do fungo *Alternaria porri* na cultura de

alho, o uso de produtos naturais, como forma de controle alternativo, poderá auxiliar os pequenos agricultores no manejo de doenças de plantas sem colocar em risco a saúde de sua família e do ambiente.

1.1 JUSTIFICATIVA

Para controlar o agente fúngico *A. porri*, umas das alternativas sugeridas por pesquisadores é o uso de variedades resistentes, combinado com o manejo e tratos culturais da cultura. Atualmente existem 27 fungicidas registrados para o controle da doença na cultura do alho. As aplicações podem ser feitas preventivamente com fungicidas a base de dicarboximida, (captana, iprodiona e procimidiona), ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe), estrobirulinas (azoxistrobina e praclostrobin), inorgânicos (oxicloreto de cobre), isoftalonitrilas (clorotalonil), triazois, (bromoconazol, difeconazol, metconazol, propiconazol, tebuconazol e tretaconazol) (AMORIM, 2016).

Devido ao crescimento do agronegócio no Brasil, desde 2008 o uso dos agrotóxicos vem aumentando, e em 2018 conforme relatório do IBGE o Brasil é o país que mais consome agrotóxico no mundo. Um dos mais importantes problemas é a resistência de fungos fitopatogênicos causada pela seleção natural que é ocasionada pelo uso contínuo de um mesmo produto. Justificando assim, o aumento do número de aplicações para o controle do patógeno. O uso indiscriminado de produtos químicos e a exposição diária dos agricultores intensifica o risco de contaminação ambiental e da saúde dos agricultores.

Conforme levantamento do instituto nacional do câncer INCA, (2019) morrem cerca de 20 mil pessoas por ano por causa do consumo de agrotóxico. Jobim *et al.* (2007), realizaram uma associação entre a mortalidade por câncer com o uso de agrotóxico, os resultados obtidos foram que a exposição da população aos defensivos agrícolas ocasionou uma crescente incidência desta doença em agricultores que utilizam o controle químico.

Por esse motivo as plantas surgem como uma alternativa frente a necessidade de produzir fungicidas menos agressivos. Os compostos secundários de plantas como extratos e os óleos essenciais, apresentam propriedades antifúngicas, podendo ser utilizados com sucesso no controle de fitopatógenos, pois os compostos presentes nessas plantas têm em sua composição substâncias que não trazem riscos ao ambiente, quando comparada ao controle químico. Desta forma surge uma demanda para atender os avanços de sistemas de produção orgânica. Em vista disso, as plantas com propriedades antagônicas se tornam uma opção relevante para o manejo associado ao controle alternativo.

Neste sentido, a investigação proposta neste trabalho visa mostrar uma alternativa mais sustentável que seja menos agressiva ao homem e ao meio ambiente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Obtenção de extrativos da madeira de *Cupressus lusitanica* e avaliação da atividade antifúngica sobre o fungo *Alternaria porri*.

1.2.2 Objetivos específicos

Extração do óleo essencial da madeira seca de *Cupressus lusitanica* e caracterização química por CGEM;

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do extrato bruto e do óleo essencial obtidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUÇÃO DE ALHO NO BRASIL

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça originária da Ásia central, utilizado no mundo todo como condimento e como planta medicinal. Geralmente é consumido cozido, mas pode ser usado desidratado ou seco (ALMEIDA, 2006). O alho apresenta folhas alongadas, estreitas, sendo que, a parte mais importante comercialmente são os bulbos formados por bulbilhos que são ricos em compostos aromáticos com propriedades terapêuticas. Seu cultivo é de bem importante, pois tem uma exigência considerável de mão de obra e por consequência a geração de emprego, por isso se configura como uma das mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil (MOTA *et al.*, 2005).

O Brasil é um dos países que mais consome alho no mundo, em torno de 1,5 Kg/habitante/ano. No entanto, a produção no país em 2017 foi de aproximadamente 120,9 mil toneladas, correspondendo apenas um terço do que é consumido internamente, insuficiente para atender a demanda interna. O Brasil importa grandes quantidades da China e Argentina para suprir o abastecimento interno (MAPA, 2017). Os estados de destaque na produção de alho são o Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás e Bahia, que juntos correspondem por 90% da produção.

Em Santa Catarina a microrregião de Curitibanos se destaca pelo seu potencial para o cultivo de alho. A região apresenta condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da cultura, além de ser produzido basicamente pela agricultura familiar. Em 2017 o estado de Santa Catarina, segundo dados da CONAB participou com 22% da área de produção do Brasil, mas houve uma redução de 3,9% de área plantada. A produtividade entre 2012/2016 obteve uma taxa de crescimento de 7,7% (CONAB, 2017).

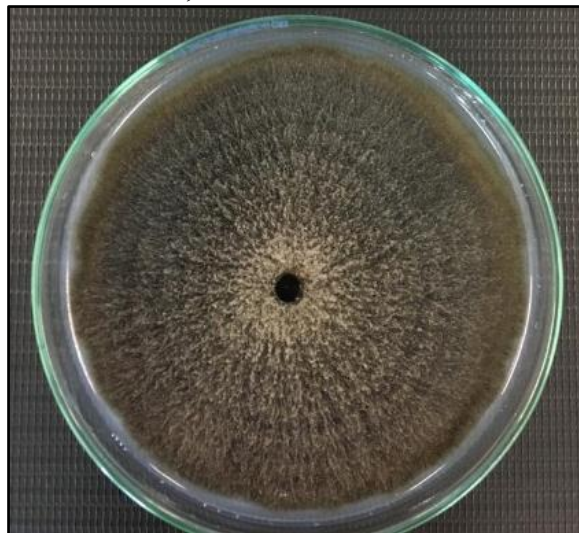
O alto custo de produção e a grande gama de doenças que geralmente atacam a cultura do alho, tem causado a diminuição da sua área de plantio. Conforme dados a produtividade de 2017 teve uma redução de 13,9% em relação a 2016 (CONAB, 2017).

Desta forma, existe a necessidade de variar o manejo de doenças, alternando o controle químico com o uso de produtos naturais e outras práticas agrícolas que podem minimizar os danos causados pela mancha púrpura (SOUZA *et al.*, 2012).

2.2.2 Mancha púrpura (*Alternaria porri* (Ellis) Ciff)

Alternaria porri (Ellis) Ciff é o agente fúngico causador da doença conhecida popularmente como mancha púrpura. Pertencente ao filo Ascomycota, classe dothideomycetes de ordem pleosporales, família pleosporaceae e gênero *Alternaria* (AMORIM, *et al.*, 2016). Apresenta formação de conidióforos individuais, septados, que carregam conídios com formato clava. Os conídios têm coloração variadas, podendo ir do palha ao marrom-claro, exibem septos longitudinais e transversais (AMORIM, *et al.*, 2016).

Figura 1 - Placa de Petri contendo a *Alternaria porri*, que foi inoculada em câmara de crescimento com temperatura e fotoperíodos controlados, cultivada em meio BDA.



Fonte: O Autor, 2019.

A mancha púrpura é apontada como uma das principais doenças da parte aérea do alho. As pústulas de cor amareladas ficam recobertas pela cutícula das folhas, que mais tarde se rompem liberando os esporos do fungo. As folhas, conforme demonstrado na Figura 2, ficam lesionadas de coloração palha a púrpura com o centro esbranquiçado. Após a esporulação do patógeno as lesões podem adquirir cor acinzentadas. O crescimento da doença provoca a murcha e o enrugamento das folhas, ocasionando uma diminuição da área foliar tendo como consequência a diminuição do desenvolvimento dos bulbos que é a parte mais comercializada (MASSOLA, *et al.*, 2005).

Figura 2 - Plantas de alho afetada pela mancha púrpura (*Alternaria porri* (Ellis) Ciff)



Fonte: Embrapa, 2000.

No Brasil a mancha púrpura do alho, se manifesta em todas as regiões produtoras de alho. É uma das doenças que mais comprometem o rendimento da cultura. Ataca de modo bem agressivo, causando danos à produção e conservação de bulbos. Em áreas de clima úmido e quente ela se torna mais severa, provoca perdas na produção que podem alcançar de 50% a 60% (ZAMBOLIM *et al.*, 2014).

2.2.3 Controle alternativo de doenças em plantas

No Brasil a procura por alimentos mais saudáveis, sem uso de agroquímicos tem impulsionado o crescimento do consumo de alimentos orgânicos. A população de uma maneira mais consciente está à procura de produtos e alimentos que estejam sendo produzidos de uma maneira mais sustentável, destacando os alimentos com certificação que atestam a não utilização de agrotóxicos no processo produtivo (BETTIOL, 2009).

Um levantamento realizado pelo ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019) relata que o registro de produtos orgânicos triplicou nos últimos dez anos e a tendência é de crescimento constante, tanto na produção quanto no consumo. Em 2019 os registros de produtores orgânicos já estavam na marca de 17,7 mil, um aumento de 200% em relação ao período de 2012 (MAPA, 2019).

O principal objetivo deste sistema orgânico é a sustentabilidade econômica e ecológica do ecossistema, para isso é importante o desenvolvimento de técnicas e métodos culturais, em contraposição ao uso de agroquímicos (DECRETO n 6.323 Brasil, 2007).

Muitos dos pesticidas têm facilidade de permanecer nos ecossistemas e acumular nos organismos vivos, além de apresentar potencial mutagênico e carcinogênico. Desta maneira é

relevante pensarmos em alternativas sustentáveis, tanto para o meio ambiente, como para a saúde humana. Na tentativa de substituir os compostos sintéticos pelos naturais, os produtos naturais oriundos de plantas vêm sendo progressivamente estudadas (MICHEREFF, 2001).

Sousa *et al.*, (2012), realizaram uma pesquisa sobre os tipos de controle alternativo de pragas e doenças em hortaliças cultivadas em sistemas orgânicos, e uma das opções encontradas pelos agricultores, foi a utilização de extratos das plantas no controle de doenças fúngica. Os agricultores relatam que umas das maiores dificuldades encontradas no momento da elaboração das doses ideal de aplicação, mas que mesmo assim a eficiência no controle tem sido satisfatória. Além disso, a preparação das caldas e dos extratos são realizados pelos agricultores, com matéria prima proveniente da própria propriedade e por isso não se tem uma técnica padrão. Citar legislação

O uso de metabólitos secundários de plantas, através dos extratos e óleos essenciais, é uma opção no manejo de fitopatógenos em sistemas orgânicos, pois possui aptidão ecológica e sustentável (VENTUROSOSO *et al.*, 2011). Os metabolitos secundários das plantas, em princípio, não são essenciais para a vida, mas contribuem significativamente para a adaptação das espécies e sua sobrevivência.

Compostos secundários está restrito a processos químicos únicos para uma dada espécie ou família, portanto, não é universal, ou seja, pode variar conforme a espécie. É através da química desses compostos que são formados os extratos, óleos e os produtos naturais (FRANZENER *et al.*, 2007). O metabolismo secundário das plantas apresenta uma ampla diversidade de estruturas, por exemplo os taninos, flavonóides, alcalóides, glicosinolatos, pigmentos, ceras, etc. Alguns tem atividade biológica e podem ser utilizados para o desenvolvimento de medicamentos. Neste mesmo sentido, para a proteção de doenças de plantas, estes mesmos produtos do metabolismo secundário também podem ser aplicados em atividades agrícolas (NETO, 2007).

O potencial das plantas no controle de fungos fitopatogênicos na indução de mecanismos de defesa das plantas é descrito em vários trabalhos, assim como a capacidade fungitóxica das plantas quando aplicados diretamente sobre o fungo, induzindo mecanismos de defesa. Com a confirmação da eficiência dos usos dos extratos e de óleos,

No experimento realizado por Costa *et al.*, (2011) efetuando observações dos micélios dos fungos tratados com óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*), perceberam diversas alterações morfológicas como a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares; diminuição na nitidez da parede celular; intensa fragmentação das hifas, além de menor turgência das mesmas, sendo considerado indício de degeneração celular. E ainda,

foram avaliados os crescimentos miceliais de fungos como: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. Já os tratamentos com óleo de cravo tiveram 100% de inibição do crescimento micelial, exceto para *Macrophomina phaseolina*. Resultados semelhantes encontrados por Lorenzetti *et al.*, (2011), corroboram com os estudos citados, pois a utilização do óleo de cravo na concentração de 125pp inibiu em 31 % o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinérea*. Em outro exemplo, o uso de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* utilizado nas pesquisas de Itako *et al.*, (2013) demonstraram que, em doses crescentes, retarda o desenvolvimento do fungo *Alternaria solani* induzindo a atividade das enzimas.

Conforme citado, as pesquisas comprovam o potencial fungitóxico das plantas quando utilizadas diretamente sobre o fungo e que são capazes de induzir os mecanismos de defesa da planta, por isso seria relevante que mais pesquisas sejam realizadas para auxiliar os agricultores nas aplicações e na correta formulação das doses (SCHWAN; ESTRADA *et al.*, 2005).

2.2.4 *Cupressus lusitanica* Mill.

O *Cupressus lusitanica* Mill. Figura 3 é uma espécie conífera pertencente à família Cupressaceae. É uma planta monóica, perenifólia, resinosa e aromática com origem nas regiões montanhosas do México, Guatemala, El Salvador e Honduras podendo atingir mais de 30 m de altura (XAVIER *et al.*, 2012).

Figura 3- Povoamento do *Cupressus lusitanica*



Fonte: NaturDate

Esta espécie tem uma grande amplitude de adaptação climática. Recomenda-se cultivar *C. lusitanica* em altitudes entre 1500 a 2500m (Chaves,1991), sendo que as melhores condições climáticas e de relevo concentram se nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (SHIMIZU *et al.*, 2006). É uma planta utilizada em projetos paisagístico, corta vento e na implantação de cerca viva, pode ser aproveitada na construção civil, naval, na fabricação de moirões e na produção de móveis. (PEREIRA, 2003). Popularmente as folhas *C. lusitanica* são utilizadas como repelente de insetos, no tratamento de doenças de pele e no alívio da gripe (BETT, *et al.*,2016). Em outras pesquisas, foi mencionado que o óleo essencial apresenta ação antibacteriana contra *Bacillus cereus* e atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (HASSANZADEH *et al.*, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos no laboratório de química, entre 2015 a 2018.

As amostras de madeira de *C. lusitanica* foram fornecidas pelo professor Dr. Mario Dobner Junior da UFSC – Campus de Curitibanos, já em condição seca e cortada em ripas. As amostras foram obtidas de exemplares cultivados na fazenda da Empresa Florestal Gateados, no município de Campo Belo do Sul, SC.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATIVOS DA MADEIRA SECA DE *Cupressus lusitanica*.

Para a preparação do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), a madeira seca de *C. lusitanica* foi picada e moída em moedor do tipo Wiley (~40 mesh). Então, 364,67g deste material foi submetido à extração exaustiva em etanol 92 INPM. O solvente foi evaporado para a obtenção de 6,37g (1,74%) do extrato na forma de uma pasta marrom. O extrato obtido foi estocado em freezer para posterior análise da atividade antifúngica.

Para a extração do óleo da madeira, o material moído foi extraído por hidrodestilação, em extrator Clevenger modificado durante 6 horas, utilizando 100g de material seco e moído. O óleo foi separado da fase aquosa, seco sob sulfato de sódio anidro e obtido com 0,073% de rendimento. Para a obtenção de quantidade de óleo suficiente para os testes de atividade fungitóxica, o procedimento de extração foi repetido diversas vezes até a obtenção de aproximadamente 1 mL de óleo. O óleo foi então estocado em freezer até a realização das análises testes.

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CGMS

As análises químicas dos componentes do óleo essencial de *C. lusitanica* foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Instrumentais (LAMAI) na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos. Para as análises, foi preparada uma solução com 20 µL de amostra de óleo em 1,0 mL de hexano. Desta solução, 1 µL foi injetado em cromatógrafo gasoso Agilent (Agilent 7890A) equipado com espectrômetro de massas (MS 5975C) e injetor automático Combipal (GC sampler 80). Foi utilizada coluna

capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) com fluxo de gás Hélio de 1,0 ml min⁻¹.

Para a separação cromatográfica, foi utilizado programa de temperatura de 40 °C até 280 °C à uma taxa de 10 °C por minuto. A temperatura do injetor e da interface foram ajustadas para 300 °C. A fonte de íons foi mantida em 230 °C e os espectros foram obtidos por impacto de elétrons (IE) a 70 eV.

Para determinação da porcentagem relativa, os picos foram integrados manualmente em software G1701EA GC/MSD Chemstation. A identificação dos componentes foi realizada através da análise comparativa dos espectros de massas referente a cada pico com os espectros de massas de padrões autênticos e do índice de Kovats para cada substância (Adams, 2011). Os índices de retenção de Kovats foram obtidos através da injeção de uma mistura de n-alcenos (C7-C32; Sigma Aldrich) sob as mesmas condições utilizadas para o óleo essencial.

3.3.1 Isolamento do fungo *Alternaria porri*

O experimento foi realizado no laboratório de Fitopatologia, entre 2018 a 2019. O fungo *A. porri* que estava armazenado na micoteca da UFSC, foi replicado em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As placas foram incubadas em fotoperíodo de 12 horas a 25°C por 15 dias.

3.3.2 Avaliação da ação do extrato sobre *Alternaria Porri*.

Para a avaliação da atividade fungitóxicas *in vitro* do extrato bruto (EHB), foi preparado soluções aquosas nas concentrações de 100, 250 e 500 ppm. As soluções foram misturadas ao meio de cultura BDA fundente, que foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Na preparação das placas acrescentamos o antibiótico (Estreptomicina + Penicillina) 500 mg L⁻¹ para evitar contaminação por bactérias. Após a solidificação do meio, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) foi repicado no centro das placas de Petri. As placas foram vedadas com filme plástico, incubadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações do crescimento micelial iniciaram 24 horas após a instalação do experimento. Utilizamos duas medidas opostas do diâmetro da colônia fúngica. A avaliação foi realizada até que o tratamento testemunha (somente BDA) atingisse 80% do crescimento radial

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com extrato em 4 doses crescentes (0, 100, 250 e 500 ppm) com 5 repetições. Cada placa de Petri foi considerada uma repetição.

3.3.3 Avaliação da ação dos óleos do *Cupressus lusitanica* e do Carvacrol sobre o fungo *Alternaria porri*.

Para a avaliação da atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais, foram preparados concentrações de 0, 100, 250 e 500 ppm, em meio BDA fundente. Na preparação das placas acrescentamos o antibiótico (Estreptomicina + Penicillina) 500 mg L⁻¹ para evitar contaminação por bactérias. Após a solidificação do meio, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) foi repicado no centro das placas de Petri. As placas foram vedadas com filme plástico, incubadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações do crescimento micelial iniciaram 24 horas após a instalação do experimento. Utilizamos duas medidas opostas do diâmetro da colônia fúngica. A avaliação foi realizada até que o tratamento testemunha (somente BDA) atingisse 80% do crescimento radial

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com os óleos em 4 doses crescentes (0, 100, 250 e 500 ppm) com 5 repetições, para *C. lusitanica* e Carvacrol. Cada placa de Petri foi considerada uma repetição.

3.3.4 Análise de dados

Após a tabulação dos dados de crescimento *in vitro*, foi realizado o cálculo da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e o índice da velocidade do crescimento micelial do fungo (IVCM). A equação utilizada foi a proposta por CAMPBELL & MADDEN (1990):

$$\text{AACCM} = \sum \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

em que y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas, t_{i+1} e t_i são os períodos das avaliações.

Para o IVCM, o cálculo foi realizado pela fórmula de Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1992):

$$\text{IVCM} = \frac{\sum \frac{(y_{i+1} - y_i)}{(t_{i+1} - t_i)}}{(n - 1)}$$

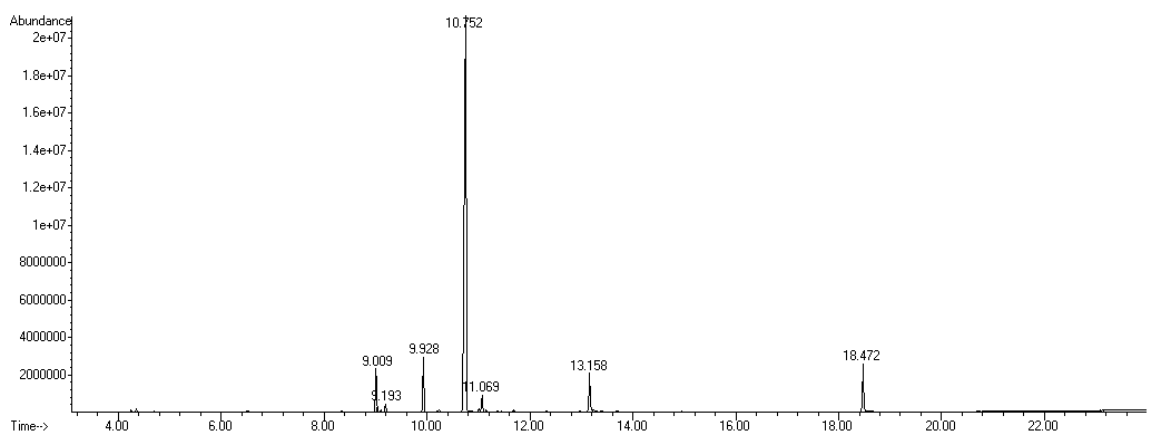
Sendo os cálculos realizados no dia em que se observou a estagnação do crescimento do fungo. Após, os dados foram submetidos ao teste de média Tukey a 5% de probabilidade através do software estatístico R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL

Os componentes voláteis do óleo essencial da madeira seca de *Cupressus lusitanica* foram caracterizados por técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. No Cromatograma de íons totais (Figura 3) foram observados apenas 7 componentes. Para a identificação dos componentes, foi realizada injeção de amostra de alcanos lineares para a determinação do índice de retenção linear de Kovats e comparação com dados da literatura. Dos sete picos, apenas uma substância, com tempo de retenção (TR) de 11,069 minutos, deixou dúvidas sobre sua identidade. No entanto, o espectro de massas indica que a estrutura química é derivada do carvacrol ou do timol. Todos os outros componentes foram identificados.

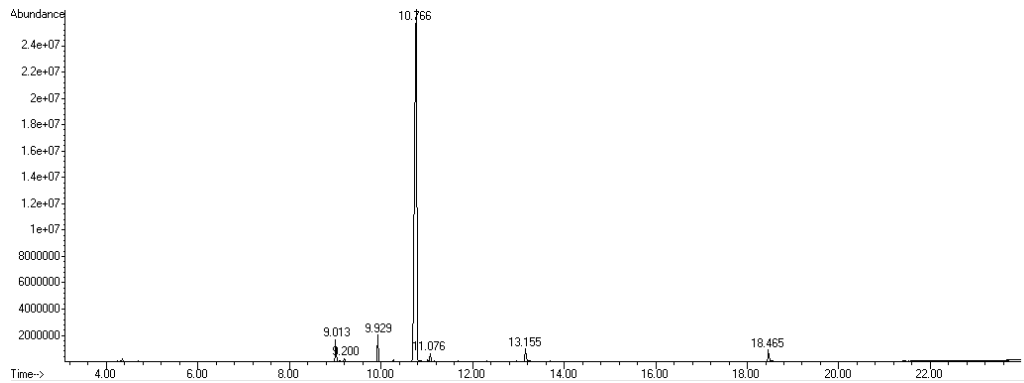
Figura 3 – Cromatograma de íons totais do óleo da madeira seca de *C. lusitanica*.



Fonte: Cristian Soldi, 2019

O componente majoritário, além de ser identificado por comparação do índice de kovats e do espectro de massas com dados da literatura de Adams (2007), foi submetido à coinjeção do óleo extraído com padrão comercial de carvacrol (sigma-aldrich), confirmando assim a identidade deste componente mais abundante conforme mostra a Figura 4.

Figura 4 – Cromatograma de íons totais da coinjeção do padrão comercial carvacrol com o óleo da madeira seca de *C. lusitanica*



Fonte: Cristian Soldi, 2019

A caracterização química completa é mostrada na Tabela 1, junto com a porcentagem relativa de cada componente. O componente majoritário, com 76,4% do total, foi identificado como carvacrol, o qual já foi citado em trabalhos que mostraram resultados antifúngicos contra diversas espécies de fungos, como o *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae* e bactéria como a *Erwinia psidii* causadores de doenças em diferentes culturas de importância econômica (ROMERO *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Componentes voláteis do óleo essencial extraído da madeira seca de *Cupressus lusitanica*

Pico	Substância	TR (min)	KI _{exp}	KI _{teórico}	%
1	terpinen-4-ol	9,009	1185	1177	5,2
2	α -terpineol	9,123	1192	1189	0,9
3	carvacrol, methyl ether	9,928	1249	1245	5,5
4	Carvacrol	10,752	1307	1299	76,4
5	NI	11,069	1331	-	1,8
6	γ -thyjaplicin	13,158	1492	1484	4,6
7	Nootkatin	18,472	1979	1960	5,7

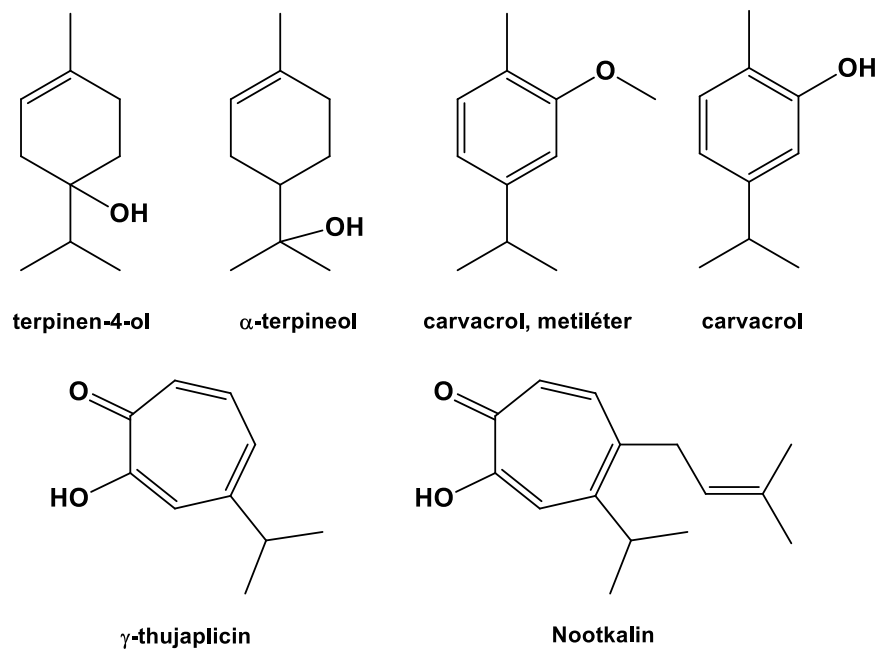
TR: tempo de retenção; KI_{exp}: índice de kovats experimental; KI_{teórico}: índice de kovats teórico; NI: não identificado Fonte: O autor

Os demais componentes são derivados de terpenos oxigenados. Poucos trabalhos relatam a caracterização dos componentes voláteis das folhas e da madeira seca de *C. lusitanica*. Mohareb *et al.*, (2010) descreveram sobre a caracterização de componentes voláteis de um extrato tolueno/etanol da madeira seca de *C. lusitanica* neste trabalho, os autores não relatam a presença de carvacrol, porem citam que o sedrol é o componente majoritário. As diferenças na composição do mesmo óleo essencial podem ser explicadas através das condições climáticas e

do solo onde a planta foi cultivada, indicando que os fatores externos modificam o metabolismo secundário das plantas (CHERAIF *et al.*,2007).

As estruturas químicas dos componentes encontrados no Cromatograma de íons totais óleo da madeira seca de *C. lusitânica*, são mostradas na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química dos componentes encontrados nos extrativos do *Cupressus lusitânica*

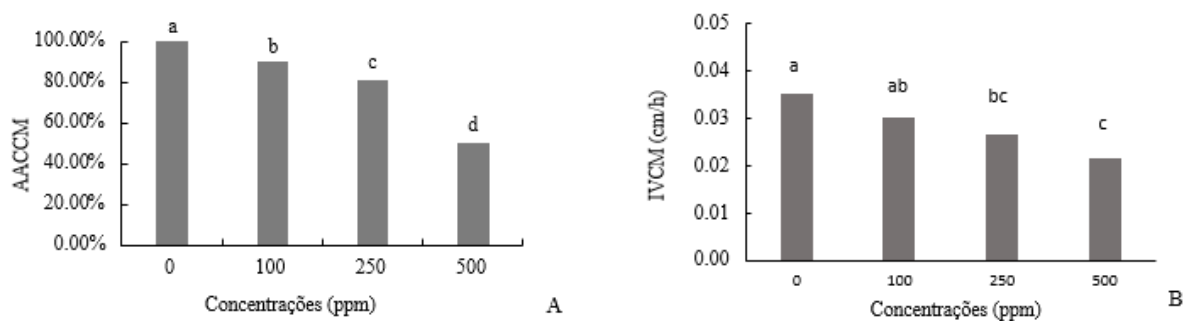


Fonte: Cristian Soldi, 2019

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATIVOS SOBRE *Alternaria porri*.

Na Figura 6 está representado o resultado obtido quanto a atividade antifúngica em relação a AACCM e do IVCM do extrato do *C. lusitanica* em diferentes concentrações (0, 100, 250, 500 ppm). Verificou-se que o extrato apresentou atividade inibitória contra a *A. porri*. O melhor resultado para a redução da AACCM foi obtido na dose de 500 ppm, com um efeito inibitório de 50%, quando comparado com a testemunha. A partir dos dados foi possível calcular o IVCM nas diferentes doses, constatou que houve uma redução na velocidade de crescimento micelial com a dose de 500 ppm do extrato em 61%.

Figura 6 - Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) da *Alternaria porri*, tratada com o extrato do *C. lusitanica* nas concentrações (0, 100, 250, 500 ppm). (A). Índice de velocidade micelial (IVCM) (cm/h) da *A. porri* tratada com o extrato nas mesmas concentrações. (B).



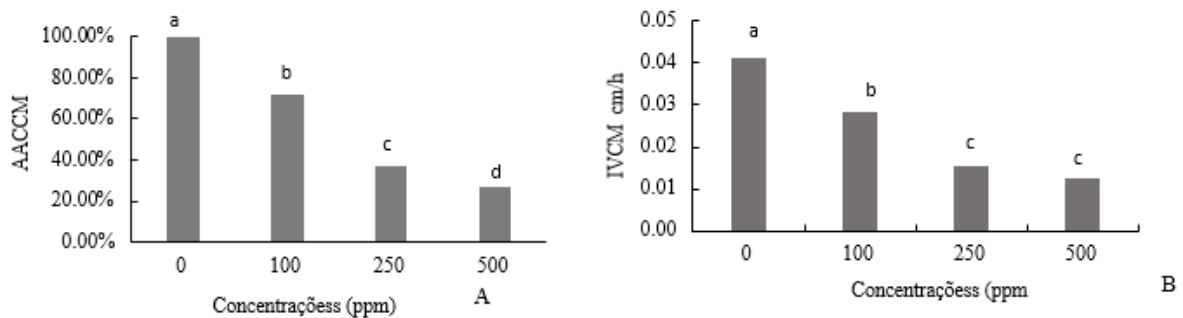
A pouca atividade antifúngica do extrato *C. lusitanica* pode estar relacionada com as doses utilizadas. Viana *et al.* (2008) ressaltam que atividade antifúngica de extratos de plantas também pode ser modificada pelos diferentes métodos de extração, pH, temperatura, e na utilização de diferentes doses. As diferentes concentrações podem interferir nos resultados obtidos em experimentos onde foram utilizadas a mesma espécie vegetal (FRIAS, 2009). No experimento a inibição começou a ser notada a partir da dose de 250 ppm que apresentou um pequeno efeito quando comparada com a dose de 500 ppm. Com isso percebemos que se aumentarmos a dose o efeito inibitório será mais efetivo.

Além da atividade antifúngica demonstrada pelo extrato hidroalcoólico, foram observadas alterações na coloração da colônia fúngica, quando adicionado em meio BDA assumindo a mesma coloração igual do extrato. Bianchi *et al.* (1997) informam que essas alterações podem ser consequência da modificação na atividade enzimática envolvida na

membrana e na formação da parede celular, resultando em desenvolvimento anormal do patógeno. Quando o óleo foi testado houve uma acentuada redução do diâmetro do micélio quando comparado com o extrato, pois tanto o AACCM o quanto o IVCM tiveram seu crescimento reduzidos.

Conforme a Figura 7, verificou se que o óleo essencial do *C. lusitanica* das três concentrações testadas a mais eficiente foi a dose de 500 ppm, que inibiu o crescimento micelial em 73%. Enquanto que na dose de 250 ppm a inibição foi de 63% e na dose de 100 ppm inibiu apenas 28%, com isso constatou se que existe um efeito dose dependente na atividade antifúngica do óleo do *C. lusitanica* conforme o aumento das concentrações utilizadas. O desenvolvimento fúngico foi reduzido na presença do óleo no meio de cultura, quando comparado com o meio (BDA) sem adição do mesmo. Houve diferenças estatísticas quanto a eficiência do óleo nas diferentes concentrações. O fungo apresentou um crescimento menor a partir da dose 250 ppm, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) da *Alternaria porri*, tratada com o óleo do *Cupressus lusitanica* nas concentrações (0, 100, 250, 500 ppm). (A). Índice de velocidade micelial (IVCM) (cm/h) da *Alternaria porri* tratada com o óleo nas concentrações. (B).



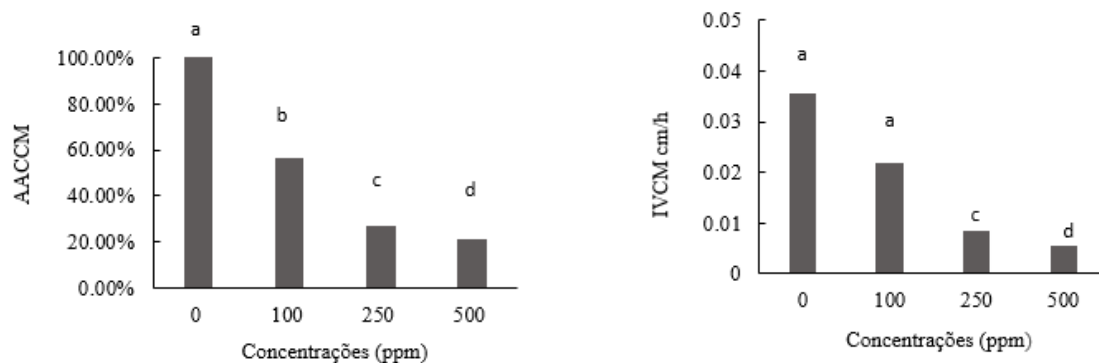
A eficiência de óleos essenciais de plantas na redução do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos já foi comprovada e descrita em diversas pesquisas. O óleo essencial *Schinus terebinthifolius* foram estudados por Santos *et al.* (2010) que dissolvidos com o auxílio de Tween 80 e espalhados na superfície do meio de cultura sobre os fungos *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. e *Fusarium* spp., os quais observaram redução significativa do diâmetro micelial dos fitopatógenos.

Os ensaios também foram realizados com o componente majoritário presente no óleo essencial da madeira seca de *C. lusitanica*, o carvacrol. Esta substância aromática tem sido estudada quanto ao seu potencial antimicrobiano exibindo excelentes resultados contra amplo

espectro de microrganismos. No entanto, nenhum relato foi encontrado sobre os efeitos desta substância contra *A. porri*, fungo causador da mancha púrpura na cultura do alho. Mas no trabalho de Zanandrea *et al.*, (2004) foram testados a ação da folha de orégano (*Origanum vulgare*) no crescimento do micélio de fungos patogênicos do arroz, e todos os fungos testados tiveram seu crescimento reduzido e isso foi atribuído ao carvacrol, composto químico abundante no óleo testado, corroborando com os resultados encontrados no trabalho.

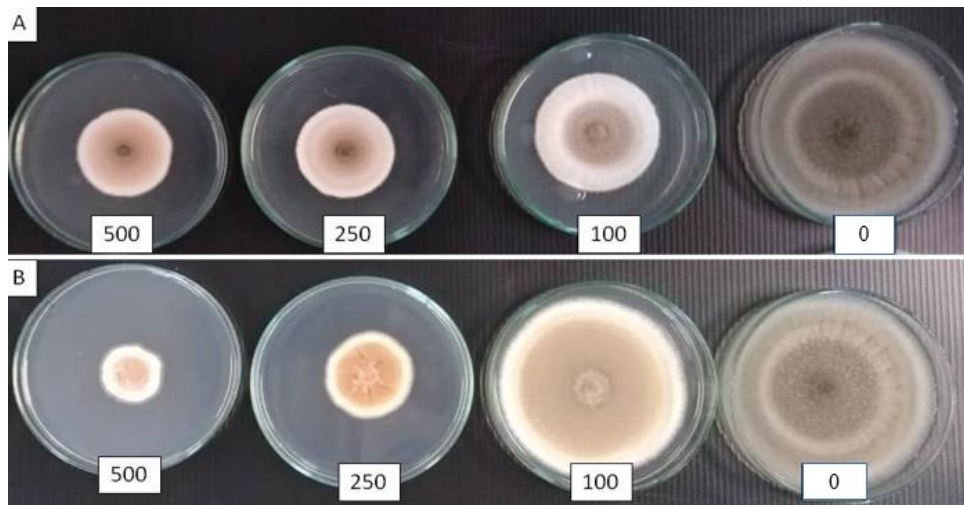
Sabendo que o óleo essencial extraído da madeira seca de *C. lusitanica* apresenta o carvacrol como componente majoritário, uma amostra do padrão comercial também foi submetida a avaliação da atividade antifúngica contra *A. porri* (Figura 8), para que fosse possível verificar se a ação desse componente ia ser a mesma que a do óleo do *C. lusitanica*.

Figura 8 - Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) da *Alternaria porri*, tratada com o carvacrol nas concentrações (0, 100, 250, 500 ppm). (A) e Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) (cm/h) da *Alternaria porri* tratada com o carvacrol (B).



Observou-se diferença significativa para as três concentrações do carvacrol sobre a inibição do crescimento micelial do fungo estudado. O efeito do carvacrol sobre a inibição do fungo é demonstrado na figura 9 (B). De acordo com a análise estatística do AACCM (A) as concentrações de 250 e 500 ppm apresentaram comportamento parecidos não diferindo estatisticamente entre o óleo e o carvacrol conforme a figura 8 (B) ambas permaneceram acima de 70% no controle do crescimento micelial.

Figura 9: Crescimento micelial do fungo *Alternaria porri* tratados com óleo do *Cupressus lusitanica* (A) e com o componente majoritário Carvacrol (B), em diferentes concentrações (ppm)



Em estudos realizados por Romero *et al.* (2009), foi descoberto que os compostos carvacrol e o timol expressam a aptidão em provocar danos a membrana citoplasmática, provocando a morte do fungo. Os danos causados na membrana foram explicados por Juven *et al.* (1994) discutem sobre as ligações que o carvacrol e o timol realizam através de suas hidroxilas com o grupo de amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas.

5 CONCLUSÃO

Óleo essencial extraído da madeira seca de *C. lusitanica* foi mais ativo que o extrato hidroalcoólico bruto;

Foi o primeiro trabalho realizado sobre a caracterização química do óleo de *C. lusitanica* onde foi encontrado o carvacrol como componente majoritário;

O óleo essencial da madeira seca de *C. lusitanica* tem grande potencial para o controle da mancha púrpura do alho;

São necessários estudos a campo para avaliar a dose mais adequada *in vivo* e ainda avaliar se atua melhor na prevenção ou na remediação da doença.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured, 2007. 800 p.
- ALMEIDA, A; BONAVENTURA, C; LIMA, A. D; AZAR, L. **Alho**, tecnologia em gastronomia: Nutrição, 2006.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia. Volume 2-Doenças de plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino - Mg: Agronômica Ceres, 810 p, 2016.
- BETT, P.K.; DENG, A.L.; OGENDO, J.O.; KARIUKI, S.T.; Kamatenesi-Mugishac, M.; Mihale, J.M., Tortoe B. *Industrial Crops and Products*, p 51–62, 2016.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B: Controle biológico de plantas no Brasil. Métodos alternativos de controle fitossanitário. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 1- 9, 2009.
- BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D’AULERIO, A.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease**, v.81, n.11, p.1241-1246, 1997.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, Laurence V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York:Ed. J. Wiley, 1990.
- CHAVES, E.; FONSECA, W. Cipres: *Cupressus lusitanica* mill. Species de arbol de uso multiple en America Central. Turrialba: Catie, 1991. 70 p. (Série Técnica. Informe Técnico, 168).
- CONAB. **Conjuntura mensal: dezembro 2017**. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-alho> Acesso 09 outubro de 2019.
- COSTA, A.R.T. AMARAL, M. F. Z. J; MARTINS, P.M; PAULA, J. A. M; FIUZA, T.S; TRESVENSOL, L.M.F; BARRA, M. T. F. 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.
- CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CLEMENTE, E.; ITAKO, A. T.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. J. S. Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 727-733, 2013.
- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; et al. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miq. Piperaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, n. 7, p. 15-24, 2006.
- DECRETO n 6.323, **Brasil**, 2007Disponível em

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm acessado 25-out-2019.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. Seminário: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.11 no.2 Botucatu 2009.

INCA. **Ministério da saúde. Agrotóxico**. Disponível em <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos> acesso em 5 de outubro, 2019

ITAKO, A.T; JUNIOR, J. B. T; Schwan-Estrada, K. R. F. Cymbopogon citratus essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. **Idesia** (Arica. Impresa), v. 31, p. 11-17, 2013.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I. B. M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência: Saúde coletiva** 2010, vol.15, n.1, pp.277-288. Disponível http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-1232010000100033&script=sci_abstract&tlng=pt Acessado 23-10-2019

KIMATI, H; AMORIM, L; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. 4 Ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., v. 2, 2005. 666p.

LAZAROTTO, M.; GIRARDI, L. B.; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Tratamentos alternativos para o controle de patógenos em sementes de cedro (*Cedrela fissilis*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p.75-78, 2009.

LORENZETTI, E. R; MONTEIRO. F. P; SOUZA. O. E; SCALICE, H. K; DIOGO JR, R; PIRES, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 1, n. 13, p.619-627, dez. 2011.

MAPA. **Produção e comércio mundial do alho** Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/noticias/em-sete-anos-triplica-o-numero-de-produtores-organicos-cadastrados-no-mapa> > acesso em 12 outubro de 2019.

MASSOLA JUNIOR, N. S; JESUS JUNIOR, WE; KIMATI, H. 2005. Doenças do Alho e da Cebola (*Allium sativum* e *A. cepa*). In: KIMATI, H; AMORIM, L; REZENDE, JAM; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, LEA. (eds). **Manual de fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres. p.53-63.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Imprensa Universitária, 2001. 368p.

MOHAREB. A; SIRMAH. P; DESHARNAIS. L; Dumarcay. S; PETRISSANS. M; GERARDIN. P. **Effect of extractives on conferred and natural durability of *Cupressus lusitanica* heartwood.** ANNALS OF FOREST SCIENCE_ Volume: 67 Edição: 5 Número do artigo: 504 Publicado: JUL-AUG 2010

MOTA, J.H.; NOCE, R.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J.; Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho, no Brasil e regiões (1991 a 2000). **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.23, n.2, p.238-241, abr-jun 2005.

NETO, L. G.; NORBERTO P. L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Departamento de Física e Química, Faculdade de **Ciências Farmacêuticas** de Ribeirão Preto, v. 30, 374-381, 2007.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, p. 42-47, 1992.

PEREIRA, J. C. D.; HIGA, R. C. V. **Propriedades da Madeira de *Cupressus lusitânica* Mill.** **Embrapa Florestas**, Colombo, 2003. 5 p. (Comunicado técnico, 107).

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Maringá, v. 13, p. 21-24, 2003.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, jan.- mar, 2006.

RODRIGUES, L. BERNARDES, P. M; SOUZA, J. L. H. PEREIRA, V. A. **Alternativas para controle e prevenção de incidência da mancha púrpura em alho** Disponível em <https://www.grupocultivar.com.br/artigos/alternativas-para-controle-e-prevencao-de-incidencia-da-mancha-purpura-em-alho> acesso 02-nov-2019.

ROMERO, A. L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, S. P. S. S. **Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Contra Fungos Fitopatogênicos:** Ciências Biológicas. Saúde. 2009, p:15-8

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYANA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGALIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. *In*: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: Fealq, 2005. p. 125-138.

SHIMIZU, J. Y.; RIBAS JÚNIOR, U.; CANCELA, K. C.; MAIOCHI, R. A. **Cedrinho como**

Alternativa para Produção de Madeira em Pequenas Propriedades Rurais. Embrapa Florestas, Colombo, PR, dez. 2006. 3p. (Comunicado Técnico, 172).

SOUSA, M. F.; SILVA, L. V.; BRITO, M. D, F; MEDEIROS, D. C. Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos no estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia** v. 7, 1, p 132-138, fev, 2012

SOUZA, A. E.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 465-471, nov.-dez, 2007.

SOUZA, R. J. D.; MACÊDO, F. S. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 651-654, jul.-set., 2004.

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Antifungal activity of plant extracts on the development of plant pathogens. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, jan, 2011.

VIANA, M.G; ALBUQUERQUE, C. C; MEDEIROS, F. A. V; SILVA, K. M. B. S. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monoscaraspus cannonballus*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.32, n.5, p.1387-1393, Set. /Out 2008.

XAVIER, S. A; FUKAMI, J; MIOTTO, L. C. V; SOBOTTKA, R. P; NAKATANI, S. H; TAKAHASHI, L. S. A; MACHADO, M. H. **Superação da dormência de sementes de *Cupressus lusitanica* Mill.** Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 3, p.1041-1046, maio/jun. 2012.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M; GRESPAN, R; KOHIYAMA C.Y; FERREIRA F. D; MOSSINI S. A; SILVA E. L; FILHO B. A; MIKCHA J. M; MACHINSKI, M. J. R. **Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production.** Food Chemistry, v. 141, n. 3, p. 3147-3152, may-jun., 2013.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, n. 9, p. 151-159, 1992.

ZAMBOLIM, L., JESUS JUNIOR, W. C. de, RODRIGUES, F. Á. O essencial da fitopatologia: **Controle de doenças de plantas.** 1 ed. Viçosa, UFV, 2014, p.576.