



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS

Laura Vezzani

**Uso dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) no controle de fungos de pós-colheita em nozes Pecã**

Curitibanos

2023

Laura Vezzani

**Uso dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) no controle de fungos de pós-colheita em nozes Pecã**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Terumi Itako

Coorientador: Prof. Dr. João Batista Tolentino Júnior

Curitiba

2023

Ficha de identificação da obra

Vezzani, Laura

Uso dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) no controle de fungos de pós-colheita em nozes Pecã / Laura Vezzani ; orientadora, Adriana Terumi Itako, coorientador, João Batista Tolentino Junior, 2023.

103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. *Carya illinoensis*. 3. Fungos de pós-colheita. 4. Óleos essenciais. I. Terumi Itako, Adriana. II. Batista Tolentino Junior, João. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.

Laura Vezzani

**Uso dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) no controle de fungos de pós-colheita em nozes Pecã**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Terumi Itako  
Instituição UFSC

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elis Borcioni  
Instituição UFSC

Prof. Dr. Cristian Soldi  
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Terumi Itako  
Orientadora

[Curitiba], [2023].

Este trabalho é dedicado ao meu quintal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, Sergio, Marizabel e Lucas Vezzani, que me dedicaram amor, suporte e condições para que eu chegasse até aqui e este trabalho pudesse ser concluído.

Às minhas amigas Aleixa Mendes e Micheli Sehn Santos, que não somente formaram uma sólida rede de apoio, como me auxiliaram sempre que possível durante os experimentos e desenvolvimento de ideias.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado, que me ajudaram em todos os processos, não importasse o horário ou a indagação - à futura doutora e já excelente professora Danielle Ortiz, e aos mestres Juliana Teixeira Stank Bireahls e Tarcísio Camargo.

Ao meu mais que amigo e companheiro, que me acompanhou, amparou e auxiliou não importasse a hora e o processo, o agrônomo Hellycson Dias Barros.

Agradeço à todos os meus colegas de mestrado, por todo o apoio emocional e de desenvolvimento como pesquisadora, em especial às queridas amigas Emeli Suzane Gomes, Gabriela Alves e Simone Fontoura, e ao querido amigo Borges Marfrann Melo.

Aos técnicos de laboratório da UFSC do Campus de Curitibanos: Flavia da Silva Krechemer, Gabriel Felip Gomes Olivo, Cláudio da Cunha Torres Júnior, Natan Filippi e Ketlin Schneider, por todo o suporte e acolhimento que recebi de um laboratório à outro.

Agradeço ao extensionista da Epagri Glauco Lindner, que cultivou e disponibilizou as nozes Pecã para o estudo e ao Prof. Dr. Tales Poletto, pelo incentivo e disponibilidade quando precisei.

Por fim, agradeço à todos os professores do programa PPGEAN: minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Terumi Itako e coorientador Prof. Dr. João Batista Tolentino Jr., pelo incentivo ao ingresso no programa; ao Prof. Dr. Mauricio Sedrez dos Reis pelos 4 pontos cardeais que apontou; ao Prof. Dr. Cristian Soldi que gentilmente me auxiliou; ao Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Elis Borcioni pelas sugestões de desenvolvimento do trabalho, que me guiaram até o momento final.

“Que a importância de uma coisa não se mede com fita métrica nem com balanças nem barômetros etc. Que a importância de uma coisa há que ser medida pelo encantamento que a coisa produza em nós.” (BARROS, 2003)

## RESUMO

A noqueira Pecã (*Carya illinoensis*) é uma frutífera de clima temperado originária da América do norte e central, crescendo em área de cultivo no Brasil principalmente na região sul do país. Apesar da espécie mostrar boa adaptação às condições edafoclimáticas, estas também propiciam o surgimento de fungos fitopatogênicos. Na pós-colheita, as nozes são expostas a alterações fisiológicas causadas principalmente por doenças fúngicas que dependem de tecnologias para a armazenagem apropriada, para manter a qualidade das nozes, como o controle de umidade e de temperatura, sendo um desafio para pequenos e médios produtores. Com a crescente demanda por produtos menos tóxicos, vêm aumentando o uso de plantas medicinais com potenciais fungitóxicos a fim de se desenvolver alternativas para o controle de doenças. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o uso dos óleos essenciais (OEs) de *Laurus nobilis* e de *Rosmarinus officinalis* no controle de fungos em nozes durante a armazenagem. Os óleos essenciais utilizados foram obtidos por hidrodestilação em extrator Clevenger. Foram isoladas 4 espécies fúngicas de interesse presentes em um lote de nozes Pecã da região de Santa Catarina, sendo *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Os óleos essenciais foram testados por incorporação em meio de cultura BDA *in vitro* em diferentes concentrações para o controle de cada fungo, sendo 0, 200, 500 e 1000 ppm para as espécies *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp.; 0, 200, 750 e 1000 ppm para *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Ensaio também foram realizados por volatilização dos óleos puros *in vitro*, utilizando alíquotas de OE de alecrim de 0, 100, 140 e 180 µL para o fungo *Pestalotiopsis* sp. e 0, 50 e 100 µL para as demais espécies. O OE de louro foi testado em alíquotas de 0, 40, 80 e 100 µL para *Pestalotiopsis* sp.; 0, 40, 80 e 100 µL para *Cladosporium* sp. e 0, 50 e 100 µL para as demais. Após o encerramento de todos os ensaios, foi realizada a contagem de conídios produzidos com o auxílio de câmara de Neubauer. Três diferentes formas de aplicação dos OEs foram testadas diretamente nas nozes e realizada a contagem diária de colônias fúngicas desenvolvidas nas nozes, sendo por imersão, pulverização e volatilização. O teor de umidade das nozes e o volume de solução utilizado foi determinado antes e após os tratamentos. O rendimento de OE para ambos os óleos foi de aproximadamente 1,8%. A porcentagem de inibição de crescimento para todos os fungos foi mais alta com a incorporação de 1000 ppm dos OEs. Houve 100% de inibição dos fungos com alíquotas de 140 µL para *Pestalotiopsis*, 50 µL de OE de louro para *Cladosporium* e 50 µL de ambos os OE para os demais. Os métodos de aplicação demonstraram grande variação no número de colônias, sendo imersão o mais eficiente com inibição de 36,8%, porém com maior consumo de OE e teor de umidade final nas nozes de 11,7%. Os resultados encontrados entre os tratamentos e formas de aplicação dos óleos foram significativos, mostrando potencial na área.

**Palavras-chave:** *Carya illinoensis*. Óleos essenciais. Fungos de pós-colheita.



## ABSTRACT

The Pecan tree (*Carya illinoensis*) is a temperate climate fruit tree native to North and Central America, growing in cultivated areas in Brazil, mainly in the southern region of the country. Despite the species showing good adaptation to edaphoclimatic conditions, these conditions also promote the emergence of phytopathogenic fungi. In post-harvest, the nuts are exposed to physiological changes mainly caused by fungal diseases that depend on technologies for proper storage to maintain nut quality, such as moisture and temperature control, posing a challenge for small and medium-sized producers. With the growing demand for less toxic products, the use of medicinal plants with fungitoxic potential has been increasing to develop alternatives for disease control. Thus, the objective of this study is to evaluate the use of essential oils from *Laurus nobilis* and *Rosmarinus officinalis* in controlling fungi in nuts during storage. The essential oils used were obtained by hydrodistillation in a Clevenger extractor. Four fungal species of interest were isolated from a batch of Pecan nuts from the Santa Catarina region, including *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., and *Penicillium* sp. The essential oils were tested by incorporation into *in vitro* PDA culture medium at different concentrations for the control of each fungus, with 0, 200, 500, and 1000 ppm for *Pestalotiopsis* sp. and *Cladosporium* sp.; 0, 200, 750, and 1000 ppm for *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. Tests were also conducted by volatilization of pure oils *in vitro*, using aliquots of rosemary essential oil ranging from 0, 100, 140 to 180  $\mu\text{L}$  for *Pestalotiopsis* sp. and 0, 50, and 100  $\mu\text{L}$  for the other species. Bay laurel essential oil was tested in aliquots of 0, 40, 80, and 100  $\mu\text{L}$  for *Pestalotiopsis* sp.; 0, 40, 80, and 100  $\mu\text{L}$  for *Cladosporium* sp., and 0, 50, and 100  $\mu\text{L}$  for the others. After completing all the tests, conidia count was performed using a Neubauer chamber. Three different application methods of essential oils were tested directly on the nuts, and daily counting of fungal colonies developed on the nuts was conducted, including immersion, spraying, and volatilization. The moisture content of the nuts and the volume of solution used were determined before and after the treatments. The yield of essential oil for both oils was approximately 1.8%. The percentage of growth inhibition for all fungi was highest with the incorporation of 1000 ppm of essential oils. There was 100% inhibition of fungi with aliquots of 140  $\mu\text{L}$  for *Pestalotiopsis*, 50  $\mu\text{L}$  of bay laurel essential oil for *Cladosporium*, and 50  $\mu\text{L}$  of both essential oils for the others. The application methods showed significant variation in the number of colonies, with immersion being the most efficient with a 36.8% inhibition, but with higher consumption of essential oil and a final moisture content in the nuts of 11.7%. The results between treatments and application methods of oils were significant, demonstrating potential in the field.

**Keywords:** *Carya illinoensis*. Essential oils. Post-harvest fungi.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pomar de noqueiras Pecã em período de senescência. ....	18
Figura 2 – Nozes Pecã em ponto de maturação fisiológica para colheita .....	19
Figura 3 - Pomar de noqueiras-Pecã implantado sob manejo planejado no estado do Rio Grande do Sul. ....	20
Figura 4 - Nozes pecã com sintomas típicos da sarna ( <i>Venturia effusa</i> ) à esquerda e sintomas típicos de antracnose ( <i>Glomerella cingulata</i> ) .....	22
Figura 5 - Folhas de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) de matriz utilizada para extração de óleo essencial. ....	29
Figura 6 - Árvore de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ) e folhas utilizadas para a extração do óleo essencial.....	31
Figura 7 - Folhas de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ) à esquerda e de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) à direita, selecionadas para a extração dos óleos essenciais. ....	33
Figura 8 - Pesagem (a) e moagem (b) das folhas de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ) para produção de óleo essencial. ....	34
Figura 9 - Aparato de Clevenger utilizado para a extração dos óleos essenciais. ....	35
Figura 10 - Amostragem 1 e 2 de folhas de louro para secagem e posterior cálculo de rendimento de óleo essencial.....	36
Figura 11 - Pranchas ilustrativas do crescimento fúngico em fragmentos de nozes-Pecã cultivadas em placas de Petri. Onde: R <sub>x</sub> = repetição; N <sub>x</sub> = noz-Pecã.....	37
Figura 12 - Preparo de material pelo método Castellani para preservação dos fungos utilizados.....	38
Figura 13 - Ilustração esquemática de sistema utilizado em Câmara de Neubauer para contagem de conídios, cada quadrado representa diferentes quadrantes para cálculo de quantidade de conídios por mililitro. ....	41
Figura 14 - Aplicação pelo método de imersão das nozes em solução. ....	43
Figura 15 - Secagem das nozes-Pecã em câmara de fluxo com corrente de ar. ....	44
Figura 16 - Aplicação dos óleos essenciais por volatilização. ....	44
Figura 17 - Aplicação dos óleos essenciais por pulverização. ....	45
Figura 18 - Armazenamento das nozes Pecã após os tratamentos em sacos de polietileno para posterior avaliação após 15 e 30 dias dos tratamentos. ....	46
Figura 19 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100 x) de conidiósforos (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de <i>Aspergillus</i> sp. ....	49

Figura 20 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de conidióforos (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de <i>Penicillium</i> sp.....	50
Figura 21 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de micélios (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de <i>Cladosporium</i> sp.....	51
Figura 22 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de conídios (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de <i>Pestalotiopsis</i> sp. ....	52
Figura 23 - - Crescimento micelial do fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp. com a incorporação de 250, 500 e 1000 ppm de óleo essencial de Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de Louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda. ....	54
Figura 24 - Crescimento micelial do fungo <i>Cladosporium</i> sp. com a incorporação de 250, 500 e 1000 ppm de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda. ....	56
Figura 25 - Crescimento micelial do fungo <i>Penicillium</i> sp. com a incorporação de 500, 750 e 1000 ppm de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda. ....	58
Figura 26 - Crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus</i> sp. com a incorporação de 200, 500 e 1000 ppm de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda. ....	61
Figura 27 - Crescimento micelial do fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp. com as alíquotas de 100, 140 e 180 µL de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e 40, 80 e 100 µL de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 ul) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs. ....	62
Figura 28 - Crescimento micelial do fungo <i>Cladosporium</i> sp. com as alíquotas de 50 e 100 µL de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e 50, 100 e 150 µL de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados ao tratamento controle (0 µL) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs. ....	64
Figura 29 - Crescimento micelial dos fungos <i>Aspergillus</i> sp. (à esquerda) e <i>Penicillium</i> sp. (à direita) com as doses de 50 e 100 µL de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), comparados aos tratamentos controle respectivos (0 µL) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs. ....	66
Figura 30 - Crescimento micelial dos fungos <i>Aspergillus</i> sp. (a esquerda) e <i>Penicillium</i> sp. (a direita) com as doses de 50 e 100 µL de OE de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), comparados aos	

tratamentos controle respectivos (0 µL) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs. .... 69

Figura 31 - Prancha ilustrativa do crescimento final das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação por imersão, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes de tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições “R<sub>x</sub>” ..... 73

Figura 32 - Número de colônias que se desenvolveram diariamente por noz, após 15 (a) e 30 (b) dias de aplicação por imersão das nozes, de acordo com o tratamento controle com 0 ppm, com 3000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de louro (*Laurus nobilis*). .... 75

Figura 33 - Prancha ilustrativa do crescimento final das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por imersão, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>). .... 77

Figura 34 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação dos óleos essenciais por pulverização, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>). .... 79

Figura 35 - Número de colônias que se desenvolveram por dia após 15 (a) e 30 (b) dias de aplicação por pulverização, de acordo com o tratamento controle e com 3000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de 3000 ppm de OE de louro (*Laurus nobilis*). .... 80

Figura 36 - – Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por pulverização, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>). .... 82

Figura 37 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação por volatilização de 200 µL de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 200 µL de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>). .... 84

Figura 38 - Número de colônias que se desenvolveram por dia após 15 e 30 dias de aplicação por volatilização, de acordo com o tratamento controle com 0 µL e com 200 µL de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*). ..... 86

Figura 39 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por volatilização de 200 µL de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 200 µL de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>). ..... 88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e louro ( <i>Laurus nobilis</i> ) utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> por incorporação, de acordo com a espécie fúngica. ....	39
Tabela 2 – Aliquotas utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> por volatilização dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), conforme a espécie fúngica. ....	40
Tabela 3 – Rendimento médio obtido de OE de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ), conforme a quantidade de massa fresca, massa seca e o tempo de extração. ....	47
Tabela 4 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição encontrados para o fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp., por incorporação dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). ....	55
Tabela 5 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectivas aos índices para o fungo <i>Cladosporium</i> sp. em relação à incorporação dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). ....	57
Tabela 6 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectiva aos índices para o fungo <i>Penicillium</i> sp. em relação a incorporação dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). ....	59
Tabela 7 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectiva aos valores para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. em relação a incorporação dos óleos essenciais de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). ....	60
Tabela 8 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) e de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). ....	63
Tabela 9 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição	

destes para o fungo *Cladosporium* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*). ..... 65

Tabela 10 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Aspergillus* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*). ..... 67

Tabela 11 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Penicillium* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*). ..... 68

Tabela 12 – Porcentagem de inibição de produção de conídios para os fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. conforme o aumento da concentração de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*). ..... 71

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AACCM: Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial

BDA: Batata-Dextrose-Ágar

IVCM: Índice de Velocidade de Crescimento

OE: Óleo essencial

TU: Teor de Umidade



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>18</b>
2.1	NOGUEIRA-PECÃ ( <i>Carya illinoensis</i> [WANGEHN.] K. KOCH) E SEU CONTEXTO NO BRASIL.....	18
2.1.1	<b>Importância dos fungos fitopatogênicos e principais doenças da noqueira-pecã.....</b>	<b>21</b>
2.1.2	<b>Pós-colheita, armazenamento e conservação das nozes para consumo .....</b>	<b>22</b>
2.2	O PAPEL DOS DEFENSIVOS A BASE DE PLANTAS MEDICINAIS.....	24
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
2.3.1	<b>ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (ALECRIM) NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....</b>	<b>28</b>
2.3.2	<b>ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Laurus nobilis</i> L. NO CONTROLE DE FUNGOS.</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1	EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
3.2	OBTENÇÃO DOS FUNGOS PRESENTES NAS NOZES PECÃ .....	36
3.3	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DO EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OS FUNGOS.....	38
3.3.1	<b>Avaliação por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura .....</b>	<b>39</b>
3.3.2	<b>Avaliação por meio de volatilização sobre os fungos.....</b>	<b>40</b>
3.4	Contagem de conídios .....	41
3.5	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE AS NOZES .....	42
3.5.1	<b>Aplicação dos óleos essenciais por Imersão.....</b>	<b>43</b>

3.5.2	Tratamento por volatilização dos óleos essenciais .....	44
3.5.3	Tratamento por pulverização .....	45
4	Resultados e discussão .....	47
4.1	Rendimento dos óleos essenciais.....	47
4.2	Diversidade e obtenção dos fungos no lote de nozes pecã .....	48
4.3	Inibição do crescimento micelial dos fungos <i>in vitro</i> .....	54
4.3.1	Avaliação do crescimento micelial dos fungos por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura .....	54
4.3.2	Avaliação do crescimento micelial dos fungos por volatilização dos óleos essenciais	62
4.4	Contagem de conídios.....	69
4.5	Métodos de aplicação e Tratamento com os óleos essenciais das nozes-pecã .....	71
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A noqueira-Pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.)K. Koch) é uma árvore frutífera de clima temperado originária dos Estados Unidos e da região do México, pertencente à família botânica Juglandaceae. O cultivo de pomares desta espécie no Brasil está localizado principalmente nos três estados da região sul. A madeira da noqueira pode ser utilizada na marcenaria e sua casca na confecção de materiais madeireiros compensados, mas o principal objetivo do cultivo no país está na produção de nozes, que possuem elevado valor no mercado nacional e internacional, podendo chegar a até 190 reais o quilo (DE MARCO; LIMA; MARTINS, 2018; TERABE; MARTINS; HOMECHIN, 2008).

No Brasil, a pecanicultura vêm sendo desestimulada por conta da falta de pesquisas em relação a implantação e manejo da espécie, principalmente nas condições edafoclimáticas do país que diferem significativamente das condições do Estados Unidos, principal produtor mundial de nozes. Um dos problemas mais urgentes está no ataque de patógenos, em especial dos fungos fitopatogênicos, facilitado pelo clima frio e úmido das regiões de cultivo (RIBEIRO; BOTH; WAGNER, 2020).

As principais doenças fúngicas que acometem a espécie são a sarna (*Venturia effusa*), a antracnose (*Glomerella cingulada*), fumagina (*Capnodium* sp.) e a mancha de pestalótia (*Pestalotiopsis* sp.). Todas elas são capazes de diminuir e até inviabilizar a produção de nozes quando mal manejada. Apesar do ataque recorrente por fungos à espécie, segundo a plataforma de registros de produtos químicos Agrofit (2023), apenas quatro fungicidas se encontram registrados para a cultura, principalmente para o controle da antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (*G. cingulada*) e bactérias. Outro desafio produtivo está na pós-colheita, uma vez que a espécie vem sendo indicada para a diversificação produtiva para pequenos e médios produtores e seu armazenamento exige cuidados tecnológicos a fim de garantir sua qualidade e comercialização (MARTINS, 2019; PANAGOU *et al.*, 2005).

Na pós-colheita e no armazenamento, as nozes ficam expostas a condições que podem causar alterações fisiológicas resultando na deterioração destas. Dentre os principais fatores, está a ocorrência de fungos, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Para que o controle da qualidade durante a estocagem seja eficiente, é necessário que haja o armazenamento em ambiente com umidade relativa inferior a 65%, com as nozes em umidade inferior a 7% e temperatura abaixo de 21°C. A

colheita das nozes se estende entre os meses de abril a junho (TERABE; MARTINS; HOMECHIN, 2008; BONINE, 2020).

O ambiente controlado se torna um desafio para o pequeno e médio produtor que não tem acesso à tecnologia específica ou que tem sua propriedade afastada de locais propícios ao armazenamento. Já foram testados diversos métodos e produtos voltados para o auxílio na preservação de nozes na pós-colheita, mas o desafio está em se encontrar métodos que possam ser aplicados em diferentes realidades nas quais se encontram os produtores (DE MARCO; LIMA; MARTINS, 2018).

Óleos essenciais são compostos metabólitos secundários produzidos naturalmente pelas plantas para diferentes fins, dentre eles para a defesa contra o ataque de fitopatógenos, os quais vêm sendo testados no controle de doenças de pós-colheita para diferentes culturas e produtos. São compostos químicos complexos, geralmente aromáticos e voláteis, formados por diferentes combinações de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Por conta destas características, a grande maioria apresenta ações biológicas como fungicidas, bactericidas, antivirais, inseticidas, dentre outros (MORAIS, 2009; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013).

O uso de óleos essenciais e suas propriedades fungitóxicas vêm sendo cada mais visado no país por conta da sua baixa toxicidade, maior degradabilidade e aceitação do público consumidor. Os óleos de louro (*L. nobilis*) e de alecrim (*R. officinalis*) já mostraram potencial no controle de fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Alternaria* e *Fusarium*, também encontrados nas nozes Pecã (PORTE; GODOY, 2001; SANTOS, 2018; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013)

Espera-se por meio deste trabalho analisar o potencial de óleos essenciais no controle de fungos que acometem a noz Pecã na pós-colheita, além de diferentes formas de aplicação destes, para futuramente auxiliar os produtores durante o armazenamento e a comercialização.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial fungitóxico *in vitro* dos óleos essenciais de alecrim (*R. officinalis*) e louro (*L. nobilis*) no controle de quatro dos principais fungos que afetam as nozes Pecã na pós-colheita e durante o armazenamento, sendo estes o *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Extrair e verificar o rendimento dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*).
- Avaliar diferentes concentrações dos óleos essenciais no controle de fungos de pós-colheita da noz Pecã: *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. *in vitro*.
- Avaliar diferentes formas de aplicação dos óleos essenciais diretamente nas nozes, sendo por volatilização, pulverização e imersão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NOGUEIRA-PECÃ (*Carya illinoensis* [WANGEHN.] K. KOCH) E SEU CONTEXTO NO BRASIL

Espécie nativa dos Estados Unidos e do México, a *C. illinoensis* (Figura 1) tem se adaptado bem às condições edafoclimáticas do Brasil, sendo uma árvore frutífera de clima temperado e cultivada no país principalmente na região Sul para comercialização de suas nozes. Pertencente à família Juglandaceae, suas nozes (Figura 2) possuem alto valor nutricional, além de apresentarem propriedades medicinais utilizadas como chá das cascas contra má digestão, febre, gripe, hepatite, malária e doenças estomacais. Além dos frutos, sua madeira também é utilizada na marcenaria para a confecção de móveis e suas cascas na composição de compensados. (DE MARCO; LIMA; MARTINS, 2018; BORGES; DE MEDEIROS, 2020)

Figura 1 – Pomar de nogueiras Pecã em período de senescência.



Fonte: Autora (2023)

Segundo o IBPecan (2023), a produção no Brasil em 2019 foi de aproximadamente 3,5 mil toneladas, sendo o país o quarto maior produtor do mundo. Estimativas apontam que em 2022 houve uma produção de 4,2 mil toneladas e em 2023 pode atingir até 7 mil toneladas. De 2004 para 2019, o crescimento em área cultivada no Brasil passou de 930 ha para cerca de 10 mil ha, sendo que 70% estão localizada no estado do Rio Grande do Sul, 22% em Santa Catarina e 8% no Paraná. Estima-se que o crescimento da cultura em área de pomar siga de forma exponencial nos próximos anos.

Figura 2 – Nozes Pecã em ponto de maturação fisiológica para colheita



FONTE: MARTINS (2021).

A noqueira Pecã necessita de um acúmulo de 400 a 800 horas de frio com temperaturas inferiores à 7,2°C para a produção, variando conforme a cultivar utilizada. Pode ter diminuição da sua produção com a ocorrência de estiagens de 15 a 20 dias durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, podendo causar a queda de seus frutos, nozes mal preenchidas ou mal desenvolvidas. O tipo de solo mais adequado para a espécie é aquele eutrófico, com pedregosidade de 0-3%, declividade de 0-13%, de textura média ou argilosa (1:1), com drenagem forte, acentuada ou boa (MARTINS *et al.*, 2019).

A espécie é considerada uma ótima alternativa para o aproveitamento de áreas de difícil cultivo agrícola e para diversificação produtiva especialmente de pequenas propriedades familiares (Figura 3), por ser altamente adaptável, ter seu período de colheita durante o mês de junho diferente da maioria das outras culturas, pela facilidade de transporte de seus frutos e por ser uma espécie perene com baixa demanda por mão de obra em comparação com a maioria das frutíferas. Seu porte é grande, atingindo até 50 metros de altura e também vem chamando atenção para seu potencial em sistemas de consórcio com culturas anuais, outras espécies arbóreas, pastagens e sistemas agroflorestais (DE MARCO; LIMA; MARTINS, 2018).

Figura 3 - Pomar de noqueiras-Pecã implantado sob manejo planejado no estado do Rio Grande do Sul.



FONTE: MARTINS *et al.* (2019)

Além de diversificar a fonte de renda de pequenos produtores, a pecanicultura traz suprimento alimentar e medicinal de uso próprio para as famílias. Suas nozes podem ser consumidas *in natura* ou processados e a planta ainda pode ser utilizada para sombreamento de pastagens, chiqueiros e galinheiros, como ornamental pelas belas folhas e porte, além da exploração madeireira (DE MARCO; LIMA; MARTINS, 2018; BORGES; DE MEDEIROS, 2020).

A noqueira-Pecã pode produzir por entre 30 e 60 anos, com baixo custo de manejo. Inicia a produção de seus frutos a partir do quarto ano de implantação, dependendo da idade das mudas, do manejo adotado e da cultivar utilizada. Suas nozes, após colhidas, secas e armazenadas de forma correta, podem ser estocadas por até 12 meses em condições ideais de temperatura e umidade para serem comercializadas nas épocas de maior interesse econômico, como entressafras de outras culturas ou de maior demanda pelos consumidores (BORGES; DE MEDEIROS, 2020).

No Brasil a espécie vem sendo desestimulada em seu cultivo por conta da escassez de informação que ainda existe em relação ao manejo e implantação de pomares nas condições climáticas do país, que favorecem ataques por patógenos, em destaque por fungos. A maior parte do cultivo hoje se restringe principalmente à região sul e sudeste (FILIPPINI-ALBA *et al.*, 2020).

Existem hoje poucos produtos ou medidas de controle para as doenças fúngicas que acometem a noz Pecã, além do acesso à locais que propiciem o controle de temperatura e



umidade, situação que dificulta a produção da espécie no país. É necessário que se conheça as resistências naturais que variedades da noqueira apresentam e diferentes formas de manejo que auxiliem no controle fitossanitário (MARTINS; LAZZAROTO, 2019).

### **2.1.1 Importância dos fungos fitopatogênicos e principais doenças da noqueira-pecã**

A ocorrência de fungos pode reduzir tanto a capacidade germinativa de um lote de sementes, como causar a morte de plântulas ou transmitir doenças para plantas adultas. Para que possamos controlar uma doença, descobri-la o quanto antes é de extrema importância, mas para isso é necessário conhecer os agentes, as causas e as consequências da contaminação por fungos patógenos (CORDER *et al.*, 2001).

Os fungos são organismos heterotróficos unicelulares ou pluricelulares. O segundo tipo é caracterizado pela formação de estruturas filamentosas ou hifas, cujo conjunto constitui o micélio. Na fase reprodutiva, o micélio pode formar estruturas sexuadas e/ou assexuadas que vão dar origem aos esporos, responsáveis pela propagação das espécies, como as fitopatogênicas. (AGRIOS, 2005).

A principal doença que atinge plantios de noqueiras pecã no Brasil é a sarna, do agente causal *V. effusa* e a antracnose, causada pelo patógeno *G. cingulata* (Figura 4). Dependendo das condições ambientais, a infecção pode ocorrer em qualquer época do ciclo da planta e conforme a severidade do ataque pode causar a perda total da produção de nozes. Ocorre especialmente em condições ambientais de altas temperaturas, com alta umidade relativa do ar e com a presença de uma lâmina d'água sobre o material vegetal (MARTINS; LAZZAROTO, 2019).

Figura 4 - Nozes pecã com sintomas típicos da sarna (*Venturia effusa*) à esquerda e sintomas típicos de antracnose (*Glomerella cingulata*)



FONTE: MARTINS e LAZZAROTO (2019).

Os principais fungos que afetam as nozes na pós-colheita são o *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea*, *Phomopsis castanea*, *Fusarium* sp., entre outros, além de microrganismos capazes de produzir micotoxinas como os das espécies *Penicillium crutosum*, *Penicillium glabrum* e *Penicillium discolor*. A ocorrência destes leva a perdas de qualidade do produto e conseqüentemente a diminuição do tempo de armazenagem para comercialização posterior das nozes (PANAGOÜ *et al.*, 2015).

Associada ainda ao pulgão amarelo nos folíolos, a doença fumagina, causada pelo fungo *Capnodium* sp., produz uma espessa camada sobre as folhas, reduzindo a incidência solar sobre estas e diminuindo a capacidade de desenvolvimento da planta. A pestalótia também é uma doença com grande importância para a espécie, causada pelo fungo *Pestalotiopsis* spp., sendo bastante comum nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Pode causar danos significativos principalmente em pomares onde se encontram cultivares suscetíveis (MARTINS; LAZZAROTO, 2019)

### 2.1.2 Pós-colheita, armazenamento e conservação das nozes para consumo

Apesar de não ser recomendado que a colheita das nozes seja feita sob o solo, este método é empregado pela maioria dos pequenos produtores. Após a maturação fisiológica destas, ocorre a abertura da cápsula carnosa que as envolve, o que faz com que caiam naturalmente. Porém, o contato das nozes com a umidade do solo e com as fontes de propágulo presentes na matéria orgânica causa a contaminação destas principalmente por fungos, que posteriormente afetam a qualidade e o tempo de prateleira destas (BONINE, 2020).

O armazenamento após a colheita das nozes as expõe à alterações fisiológicas que levam a perda de qualidade, principalmente por conta de doenças fúngicas que comprometem o valor agregado ao produto final, em destaque as causadas por fungos emboloradores como o *Penicillium* spp., *Cephalothecium roseum* e o *Aspergillus flavus*, que além de danificar as nozes, podem produzir aflotoxinas prejudiciais à saúde quando ingeridas com frequência ou em grandes quantidades (TERABE; MARTINS; HOMECHIN, 2008).

Segundo Terabe *et al.* (2018), foram encontrados tanto nas cascas quanto nas amêndoas de nozes Pecã, os fungos: *Alternaria* sp.; *Aspergillus ochraceus*; *A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp.; *Fusarium* sp.; *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. em diferentes proporções conforme as cultivares analisadas (RIBEIRO *et al.*, 2020).

A conservação da noz no período de pós-colheita pode ser problemática por conta do seu alto teor lipídico, principalmente de ácidos graxos insaturados com propensão à oxidação. Durante o processo de armazenamento, pode ocorrer o escurecimento destas, perda de crocância, formação de sabor rançado e redução de suas qualidades nutricionais, dificultando a sua comercialização. Apesar de sua importância econômica e nutricional, existem poucas pesquisas e metodologias sobre as condições ideais de armazenamento e vida de prateleira das sementes para se evitar perdas comerciais (BONINE, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2020)

As condições de armazenamento que mais influenciam na qualidade e no tempo de estocagem são a temperatura, a umidade do ar e o teor de umidade das nozes, além da concentração de oxigênio no ambiente. Quanto menor a temperatura utilizada, mais qualidade na manutenção destas. Um dos indicadores utilizados para avaliação da qualidade das nozes é pela coloração, onde a cor mais escura está relacionada com o sabor rançoso, assim como a perda de massa e umidade (RIBEIRO; BOTH; WAGNER, 2020).

Diferentes métodos já foram utilizados como tratamento para o armazenamento de nozes estocadas para desaceleração de sua deterioração. O branqueamento térmico ou não térmico com aquecimento rápido e uniforme é uma das formas utilizadas a fim de se manter características visuais e desinfetar a casca das nozes, porém é um método que pode causar a perda de nutrientes no produto e que exige quantidades grandes de água e de energia. Outros métodos aplicados em diferentes espécies de nozes são a espectroscopia, plasma atmosférico frio, congelamento, embalagens com atmosfera modificada, diferentes métodos de assepsia e micro-ondas (COSTA; KLUCZKOVSKI, 2021; TERABE; MARTINS; HOMECHIN, 2008).

A secagem hoje é a mais utilizada para a espécie a fim de se aumentar o tempo de prateleira e evitar a proliferação de microrganismos. Esta tem o objetivo de se retirar a umidade

das nozes por meio da evaporação ou por sublimação através de condições controladas. Para a noz Pecã, o método de secagem mais eficiente consiste na secagem ao ar assistida por micro-ondas, nas temperaturas de 25-85°C, para redução de umidade relativa das nozes de 19 a 6% (COSTA; KLUCZKOVSKI, 2021).

A pós-colheita é uma etapa que deve ser planejada conforme as condições do produtor, uma vez que no Brasil a realidade de produção da espécie vem crescendo entre pequenos e médios produtores, que muitas vezes não tem acesso à infraestrutura e tecnologia para o armazenamento apropriado ou realizam os plantios em locais distantes para escoamento rápido da produção. Se vê necessária a pesquisa na área de conservação das nozes na pós-colheita a fim de se permitir a adaptação às diferentes condições produtivas do país (BOTH; THEWES, 2020).

## 2.2 O PAPEL DOS DEFENSIVOS A BASE DE PLANTAS MEDICINAIS

A partir do início do século XX, novos produtos começaram a surgir a base de princípios ativos tóxicos, substituindo os produtos naturais gerados a base de plantas que foram mais utilizados até metade do século XIX. Os principais produtos naturais que eram usados no controle de pragas e fungos eram produzidos a partir das espécies *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Chrysanthemum roseum*, *Chrysanthemum coccineum* (fontes de piretro), *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (fontes de rotenona) e *Nicotiana* (fonte de nicotina) (FONSECA *et al.*, 2015; OOTANI *et al.*, 2013).

Com o início da Segunda Guerra Mundial, a maior parte das grandes áreas de cultivo destas espécies utilizadas como defensivos naturais foram destruídas e se iniciou a busca por novos princípios ativos para o controle fitossanitário, começando então a fase de desenvolvimento de químicos sintéticos que hoje ofuscou o uso de produtos naturais (FONSECA *et al.*, 2015a; MORAIS, 2009; OOTANI *et al.*, 2013;).

Uma grande parte das plantas medicinais aromáticas, medicinais e condimentares possuem propriedade antimicrobianas, além de causarem menos danos ao meio ambiente por serem geralmente mais biodegradáveis e menos tóxicas do que os produtos químicos usualmente utilizados na agricultura (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Um dos óleos essenciais mais difundido e utilizado hoje é a base da árvore de origem indiana Nim (*Azadirachia* sp.), o qual apresenta ser bastante efetivo contra pragas e é

amplamente comercializado na forma de óleo ou extratos para aplicação. Além do óleo de Nim, os óleos essenciais de alho e de casca de laranja já foram patenteados por empresas voltadas à produção de defensivos agrícolas de baixo impacto ambiental. A agência Fapesp (2023), está desenvolvendo hoje um fungicida a base de linalol, composto encontrado em diferentes espécies medicinais e aromáticas, para o combate da ferrugem da soja (ANDRADE, 2023).

Apesar do uso de defensivos sintéticos ter mostrado inicialmente um aumento na produção e eficiência nas áreas de cultivo, inúmeros problemas passaram a surgir ao longo do tempo, como o fim de práticas agrícolas com rotação de cultura e do consórcio de espécies, redução do número de trabalhadores no campo e principalmente a incapacidade destes produtos em manter o controle de pragas e doenças ao longo do tempo, pela criação de resistência destes (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O uso contínuo de sintéticos passou a causar a eliminação de inimigos naturais benéficos, como insetos e microrganismos, além da seleção de organismos maléficos resistentes e a necessidade de aumentar as doses ou de buscar por novos produtos. Este ciclo que vemos até hoje em ação causa não só problemas ambientais graves, mas gera desequilíbrio no ecossistema como um todo e leva a prejuízos para os próprios produtores (MORAIS, 2009).

O interesse pelo resgate de substâncias naturais para o controle de pragas e doenças passou a tomar força a partir da década de 1970, quando os próprios agrotóxicos passaram a se tornar mais seletivos, visando um menor espectro de ação e um menor tempo de persistência no ambiente para o controle. Observou-se que era de maior importância controlar insetos e microrganismos patógenos durante a época de maior ocorrência do que buscar a eliminação total destes, buscando-se então diminuir o desequilíbrio que vinha sendo gerado (OOTANI *et al.*, 2013).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os metabólitos secundários produzidos por algumas plantas, ou seja, substâncias geradas pelo metabolismo secundário que oferecem vantagens para sua sobrevivência e adaptações à diferentes ambientes, são aqueles que podem ser utilizados no desenvolvimento de produtos fitossanitários naturais. Como as espécies vegetais coevoluem com as pragas e doenças, tais compostos podem ocorrer em diferentes concentrações e tipos conforme a planta, as condições climáticas e local de ocorrência (MARANGONI *et al.*, 2012).

Apesar dos compostos majoritários presentes em cada espécie vegetal não variar de forma significativa entre os indivíduos, existem diversos fatores que influenciam na composição dos óleos essenciais, como a concentração e os tipos de metabólitos que são encontrados. Alguns dos fatores mais significativos são as condições edafoclimáticas em que o indivíduo se desenvolveu, o estágio de desenvolvimento da planta, o período da coleta e as condições fitossanitárias (BELASI *et al.*, 2020; NASCIMENTO, 2021).

A origem dos metabólitos secundários é proveniente de três principais precursores - i) do ácido chiquímico ou chiquimato, que dá origem aos compostos aromáticos, às ligninas e cumarinas; ii) dos aminoácidos, que originam alguns alcalóides; iii) do acetato. O acetato pode originar derivados de vias mistas quando em ligação com o chiquimato, gerando uma rota sintética mista que produz os flavonóides, alguns taninos e as antraquininas (MORAIS, 2009).

Quando designado para outras três vias, o acetado ainda pode seguir pelas vias da condensação, do ácido cítrico e do mevalonato. A condensação gera os ácidos graxos e as acetogeninas e a via do ácido cítrico gera outros tipos de alcalóide. A via do mevalonato dá origem a síntese dos isoprenóides, que geram os terpenos, os principais componentes dos óleos essenciais. Quem controla a síntese destes metabólitos secundários são as informações genéticas contidas em cada um dos vegetais, que são desencadeadas conforme as plantas passam por estresse ou são submetidas a diferentes condições por fatores abióticos (como umidade, temperatura, luminosidade etc.) ou fatores bióticos, como microrganismos, outras plantas e insetos (MARANGONI *et al.*, 2012; MORAIS, 2009).

Somente no início do século XX estes metabólitos secundários passaram a ser difundidos e utilizados para fins medicinais, mas até então não eram considerados produtos que seriam extraídos com alguma utilidade para os próprios vegetais. A partir da década de 1960 que pesquisadores passaram a estudar as funções que estes compostos apresentavam para as próprias plantas, mas até os dias de hoje muitos dos metabólitos ainda não tem suas funções conhecidas. A atração de polinizadores, proteção contra os raios ultravioleta, alelopatia, a atração de dispersores de sementes e de inimigos naturais são alguns dos efeitos conhecidos causados por estes compostos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; MARANGONI *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais se diferenciam dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas, normalmente oriundas de sementes, por se apresentarem em estado oleoso em temperatura ambiente, com alta volatilidade. São compostos complexos de substâncias lipofídicas, com baixo peso molecular, líquidas e normalmente odoríferas e constituídas por

moléculas de natureza terpênica, mas alguns óleos essenciais são derivados dos fenilpropanóides (MORAIS, 2009).

As formas de extração dos óleos essenciais mais comuns são por arraste com vapor d'água, hidrodestilação ou por expressão de pericarpo de frutos cítricos. Ainda menos utilizados, é possível realizar a extração por métodos chamados de enfloração, por extração por CO<sub>2</sub> supercíticos (método industrial) e por solventes orgânicos apolares (MARANGONI *et al.*, 2012; MORAIS, 2009).

Em um estudo recente, dados apontam que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que 49% dos agrotóxicos vendidos no país são considerados extremamente tóxicos e proibidos em diversos países do mundo. A busca por medidas alternativas e menos agressivas ao meio ambiente e à saúde se faz cada vez mais necessária, considerando principalmente o controle de doenças que trazem danos econômicos e culturais (FONSECA *et al.*, 2015; INCA, 2023; MARANGONI *et al.*, 2012).

Apesar dos efeitos diversos que os óleos essenciais possuem contra os fungos fitopatogênicos não serem totalmente conhecidos, autores ressaltam que diferentes substâncias presentes nos óleos essenciais afetam a permeabilidade da parede celular das células, podendo ainda interromper vias metabólicas dos fungos, causar o vazamento de elementos essenciais à sobrevivência das células, assim como afetar organelas, levando-as a distúrbios de desenvolvimento e até a morte (CAVANAGH, 2009; HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2010)

Substâncias químicas de origem natural voltadas para o controle de patógenos, como os óleos essenciais, tem sua eficácia comprovada quando apresentam alto potencial de controle em baixas concentrações, não são tóxicas aos animais e ao meio ambiente, são de fácil obtenção, de fácil manipulação e de aplicação, além de possuir boa viabilidade econômica e custo-benefício (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016).

Diversos autores apontam os potenciais fungitóxicos de óleos essenciais extraídos de diferentes partes de plantas medicinais, condimentares e aromáticas, principalmente pelo método de extração por hidrodestilação. Além do uso em si de diferentes óleos essenciais no controle de doenças fúngicas, ainda é extremamente necessário se determinar a melhor forma de aplicação destes, conforme o objeto de interesse (FONSECA *et al.*, 2015b; SZCZERBANIK *et al.*, 2007).

Autores demonstram que o uso de óleos essenciais por contato, seja por pulverização ou imersão, além de consumirem uma quantidade até 13 vezes maior de produtos e insumos,

como emulsionantes e água, podem deixar resíduos de odor e sabor no produto para fins alimentícios. Porém, algumas pesquisas também indicam que apesar da aplicação direta dos OEs por volatilização em ambiente controlado apresentar efeitos mais agressivos contra os fungos, a amplitude do seu efeito dentro do material que está sendo aplicado dependerá de diversos fatores, como da capacidade de penetração dos compostos voláteis (LORINI; BONALDO; MENDES, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2021).

### **2.3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* (ALECRIM) NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

O alecrim (Figura 5) é uma espécie pertencente à família das Lamiaceae e conta com aproximadamente 2800 espécies por todo o mundo, com 150 gêneros, sendo que a maioria destes possuem seu maior centro de dispersão na região do Mediterrâneo. É amplamente utilizado pelo mundo por suas propriedades terapêuticas, medicinais e alimentícias. É considerado um arbusto perene que pode atingir até 1,5 metros de altura (PORTE e GODOY, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Em 2019 se iniciou um projeto no Rio Grande do Sul de fomento ao plantio de plantas medicinais bioativas para extração dos seus óleos essenciais, dentre as mais visadas está o alecrim. Além do estado, também crescem as áreas de cultivo da espécie em Santa Catarina e no Paraná, com o apoio de empresas interessadas no setor de extração do óleo para fins medicinais, cosméticos e gastronômicos (AGROLINK, 2021).



Figura 5 - Folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) de matriz utilizada para extração de óleo essencial.



FONTE: Autora (2023).

A planta pode produzir flores brancas ou azuis, sendo que o nome “alecrim” deriva do latim e significa “orvalho do mar”, por conta da origem da espécie. Seu óleo essencial é utilizado na culinária, medicina e em cosméticos, sendo um dos óleos com menor custo, de aproximadamente 4 reais por ml, encontrados no mercado por possuir alto rendimento quando comparado à outras espécies, além da planta ser de fácil manutenção e propagação (PORTE e GODOY, 2001; SENNA *et al.*, 1993).

Entre suas inúmeras propriedades medicinais, o alecrim é utilizado como estimulante por dilatar vasos e tecidos do organismo, além de ser benéfico ao estômago, ser antiespasmódico, emenagogas e cicatrizante. Também é uma planta muito utilizada na produção de “mel verde”, considerado um mel com sabor e propriedades medicinais superiores ao mel tradicional, com o plantio da espécie no entorno de apiários (PORTE e GODOY, 2001).

O óleo é composto predominantemente por hidrocarbonetos, linalol, verbinol, terpineol, 3- octanona e acetato de isobornila, entre outros. Assim como em todas as espécies vegetais, mudanças de ambiente e de manejo podem alterar as concentrações de cada um destes compostos encontrados e assim mudanças no seu potencial antimicrobiano. A presença dos compostos cânfora (14,9%),  $\alpha$ -pineno (9,3%) e 1,8-cineol conferem ao óleo essencial de alecrim um alto potencial contra fungos (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Segundo Hillen *et al.* (2012), o óleo essencial de alecrim foi capaz de inibir em 100% o crescimento das espécies fúngicas *R. solani*, assim como para a *Alternaria* sp., com redução do seu potencial inibidor conforme concentrações menores de 100, 40 e 20  $\mu\text{L}$ . A partir de 100  $\mu\text{L}$ , também reduziu em 100% o crescimento micelial do fungo *A. carthami*. Ainda em outro estudo, o óleo se mostrou eficiente no controle direto contra o crescimento do fungo *Plasmopara viticola* na videira, tanto *in vitro* quanto a campo (GARCIA *et al.*, 2017).

### **2.3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *Laurus nobilis* L. (LOURO) NO CONTROLE DE FUNGOS**

Popularmente chamado de Louro ou Loureiro (Figura 6), o *L. nobilis* é uma espécie pertencente à família das Lauraceae, a qual compreende uma grande gama de plantas com propriedades medicinais. Originária do sul da Europa e da região Mediterrânea, é cultivada em vários países do mundo por conta dos seus diversos usos medicinais e gastronômicos que datam os primeiros registros de usos de plantas como remédio na medicina popular (BELASLI *et al.*, 2020; SANTAMARINA *et al.*, 2016).

Possui propriedades antimicrobianas, antifúngicas, auxilia em problemas gastrointestinais, dores reumáticas, atua como estimulante e na medicina Iraniana tradicional ainda é usada no tratamento de epilepsia, dores de cabeça e doença de Parkinson (BALLEN *et al.*, 2019; BLÁZQUEZ, 2014; DE CORATO, 2010; ROSS, 2001; SANTAMARINA *et al.*, 2016).

Figura 6 - Árvore de louro (*Laurus nobilis*) e folhas utilizadas para a extração do óleo essencial.



Fonte: Autora (2023).

Tanto as folhas quanto os frutos são ricos em óleos essenciais amplamente utilizados na gastronomia, na confecção de cosméticos e na indústria farmacêutica. A planta pode atingir até 10 metros de altura ou se desenvolver na forma de arbusto, possui o tronco liso e seu fuste é rico em folhas e ramificações (Figura 6). Suas inflorescências são amarelas pálidas e pouco aromáticas, se desenvolvendo em frutos pequenos e globosos de coloração acastanhada quando maduros (ROSS, 2001).

A extração destes compostos é geralmente realizada por hidrodestilação, com solventes orgânicos, ou água e soluções hidroalcoólicas para a confecção de extratos vegetais. Diversos estudos vêm sendo realizados com o uso desta espécie como alternativa aos conservantes sintéticos, para a conservação de alimentos e o controle de doenças transmitidas por estes (BALLEN *et al.*, 2019; FIORINI *et al.*, 1997).

Pesquisas demonstram que os principais compostos presentes nas folhas do louro são fenilpropanóides, além de hidrocarbonetos, monoterpenos e sesquiterpenos, como o geraniol, cineol, eugenol e linalol. O potencial antifúngico do óleo essencial de louro foi comprovado em diversos estudo *in vitro*, especialmente para a conservação de produtos alimentícios, por não apresentar toxicidade aos seres vivos. Foi testado e apresentou atividades antifúngica contra os fungos *Alternaria alternata*, *Eurotium herbariorum*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* e *Penicillium*

*digitatum*, entre outros (DE CORATO *et al.*, 2010; FIORINI *et al.*, 1997; GUYNOT *et al.*, 2003; SANTAMARINA *et al.*, 2016;).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os materiais vegetais utilizados na extração dos óleos foram coletados no período da manhã, entre 7 e 9 horas. As plantas de alecrim pertencem à horta medicinal da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos (27°16'30.37"S e 50°29'48.40"O, altitude de 1022 m), sendo estes clones de apenas uma genética. As folhas de louro foram obtidas da porção inferior de um loureiro, localizado em uma propriedade rural no município de Curitibanos (27°16'30.09"S e 50°29'55.27"O), com aproximadamente 6 metros de altura.

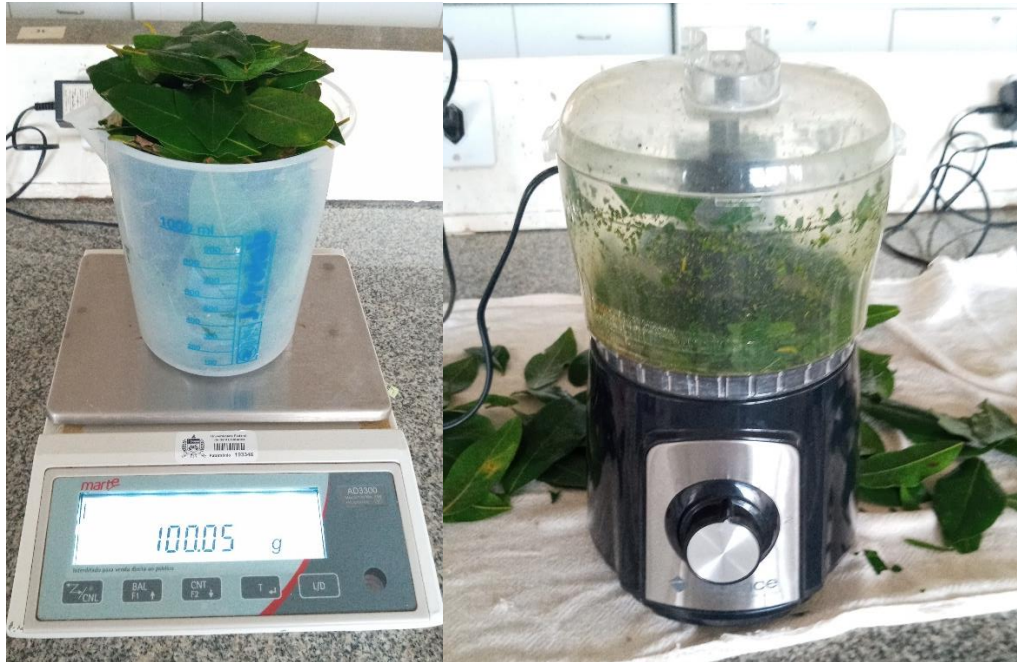
Figura 7 - Folhas de louro (*Laurus nobilis*) à esquerda e de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) à direita, selecionadas para a extração dos óleos essenciais.



Fonte: Autora (2023)

O material vegetal de ambas as espécies (Figura 7) foram selecionados, lavados e secos para retirada do excesso de água e sujidades, ao ar livre dentro do laboratório de química da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. As folhas de louro foram processadas por um processador da marca Philips Walita Power Chop 600 W (Figura 8), a fim de se aumentar a área superficial destas e aumentar-se o rendimento de óleo essencial durante a extração. As folhas de alecrim foram manualmente separadas do caule que apresentavam maior lignificação e adicionadas à um balão de fundo redondo de extração inteiras. Ambas foram previamente pesadas.

Figura 8 - Pesagem (a) e moagem (b) das folhas de louro (*Laurus nobilis*) para produção de óleo essencial.



Fonte: Autora (2023).

As coletas e extrações foram realizadas ao longo de 6 meses, com 4 extrações de OE de alecrim de junho a outubro de 2022 e 3 extrações de OE louro no período de maio a outubro de 2022, com apenas uma extração por dia. No total foram utilizadas 1585,80 g de massa fresca de folhas de alecrim e 1176,40 g de massa fresca de folhas de louro.

Os óleos essenciais das folhas de *R. officinalis* e de *L. nobilis* foram extraídos pelo método de hidrodestilação de acordo com Soldi (2006). Este método consiste na volatilização do óleo essencial com uma corrente de vapor d'água, utilizando um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 2000 mL (Figura 9). Este aparelho permite a separação do óleo em si da água, resfriando-o e evitando sua degradação (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 9 - Aparato de Clevenger utilizado para a extração dos óleos essenciais.



Fonte: Autora (2022).

A extração de ambos os óleos foi realizada por um período de aproximadamente 2,5 horas até quando se estabilizou por 30 minutos a quantidade de óleo gerada pelo aparato de Clevenger (Figura 9). Os óleos essenciais resultantes deste processo foram separados da fase aquosa com o uso de uma pipeta de Pasteur e armazenados em micro tubos de 2 mL em freezer à -18 °C até a realização dos ensaios (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013).

Para o cálculo de rendimento dos óleos, amostras em duplicatas de 10 g de massa fresca vegetal (Figura 10) no momento das extrações e foram submetidas à secagem por 24 horas em estufa com corrente de ar forçada à 50°C para posterior pesagem e cálculo de rendimento, conforme a Equação 1 (SOLDI, 2006):

$$\text{rendimento do óleo \%} = \frac{\text{massa de óleo extraído (g)} \times 100}{\text{massa folhas secas (g)}} \quad (1)$$

Figura 10 - Amostragem 1 e 2 de folhas de louro para secagem e posterior cálculo de rendimento de óleo essencial.



Fonte: Autora (2022).

### 3.2 OBTENÇÃO DOS FUNGOS PRESENTES NAS NOZES PECÃ

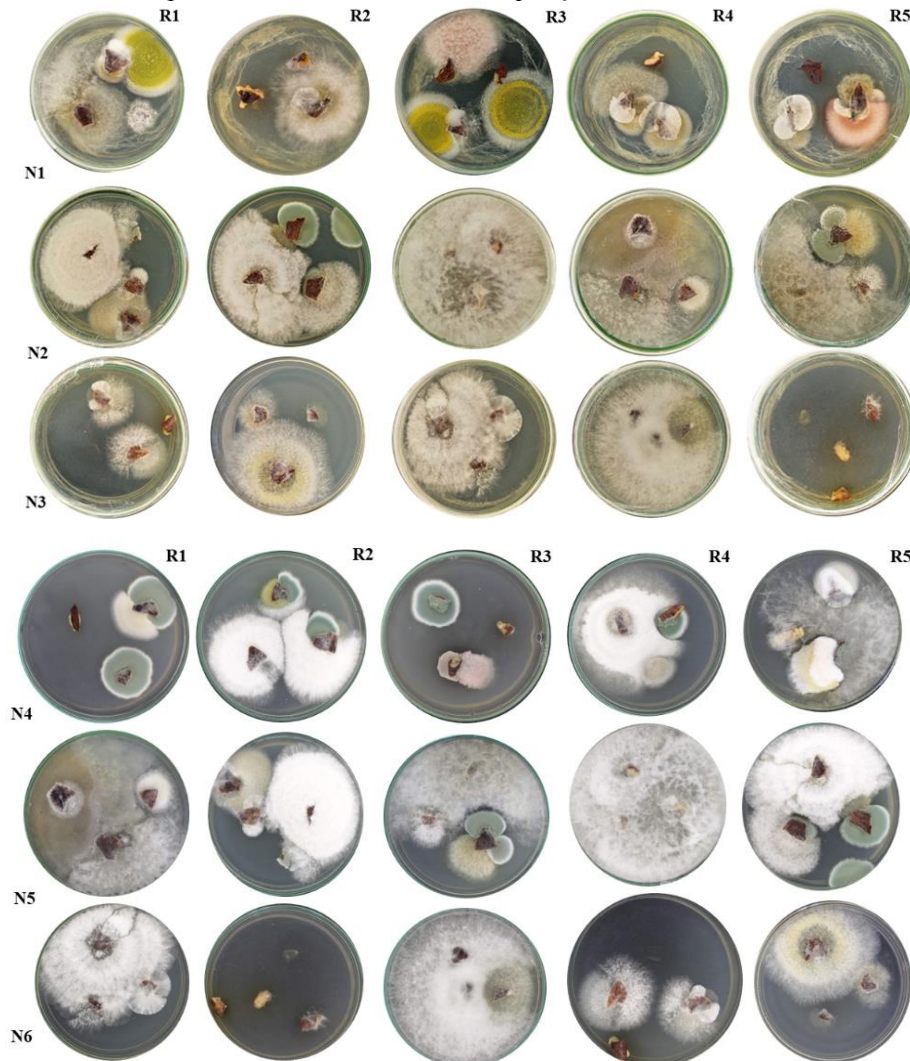
As nozes foram obtidas de um plantio orgânico familiar de um produtor residente da cidade de Rio do Sul, Santa Catarina, produzidas e colhidas em 2021. Estas foram identificadas e acondicionadas em sacos de papel tipo Kraft em geladeira no laboratório de Fitopatologia da UFSC, no Campus de Curitibanos até o momento das análises.

Para a obtenção dos fungos que foram utilizados nas análises, 20 nozes com casca foram quebradas com o auxílio de um quebra nozes comum e seus fragmentos submetidos à assepsia superficial, com imersão em solução de álcool à 98%, durante 2 minutos, em seguida imersos em solução 2,5% de hipoclorito por 2 minutos e lavados em água destilada esterilizada (TERABE *et al.*, 2018).

Após a assepsia, 5 repetições com 3 fragmentos de cada uma das 20 nozes foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), com antibióticos estreptomicina 500 mg/L e penicilina 0,5% (v/v) por 7 dias em incubadora BOD, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C. As placas contendo os fragmentos com as colônias fúngicas em desenvolvimento foram fotografadas após 8 dias conforme a Figura 11, a fim de se registrar a morfologia das colônias (PANAGOU *et al.*, 2004; TERABE *et al.*, 2018).



Figura 11 - Pranchas ilustrativas do crescimento fúngico em fragmentos de nozes-Pecã cultivadas em placas de Petri. Onde: R<sub>x</sub> = repetição; N<sub>x</sub> = noz-Pecã.



Fonte: Autora (2023).

De acordo com a importância dos gêneros fúngicos para a noqueira Pecã encontrados em literatura e a maior frequência com que se desenvolveram nas amostras, foram selecionadas 4 espécies conforme as estruturas reprodutivas identificadas em microscópio: *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Os fungos de interesse foram isolados pelo método direto, com a transferência de partes reprodutivas destes para placas de Petri contendo meio BDA + antibióticos estreptomicina 500 mg/L e penicilina 0,5% (v/v), a fim de se obter culturas puras (CAROLLO e FILHO, 2016).

As placas contendo cada fungo identificado foram seladas e armazenadas em incubadora do tipo BOD. Após 24 h, as colônias foram avaliadas quanto a ausência de microrganismos contaminantes. Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo meio BDA foram retirados das bordas de crescimento da colônia e acondicionados em

microtubos contendo 10 mL de água destilada, tampados com algodão previamente autoclavados à 120°C por 30 minutos e selados para o armazenamento em micoteca, conforme o método Castellani (Figura 12).

Figura 12 - Preparo de material pelo método Castellani para preservação dos fungos utilizados.



Fonte: Autora (2022).

### 3.3 AVALIAÇÃO *in vitro* DO EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OS FUNGOS

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e cada parcela experimental constituída por uma placa de Petri. Foram realizadas e registradas as medições dos diâmetros de crescimento das colônias fúngicas a cada 24 horas em planilhas, até que as colônias do tratamento controle atingissem 80% das placas (CAROLLO e FILHO, 2016).

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) proposto por Campbell e Madden (1990), foi calculado conforme a equação 2, assim como a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de acordo com os dados de crescimento registrados diariamente (Equação 3):

$$IVCM = \sum(x_{i+1} - x_i) \times (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

$$AACCM = \sum\left(\frac{x_{i+1} + x_i}{2}\right) \times (t_{i+1} - t_i) \quad (3)$$

Em que,

$X_{i+1}$ : Diâmetro médio atual

$X_i$ : Diâmetro médio anterior

t: Número de dias após a inoculação

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias agrupadas organizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o software R, após verificação de normalidade e homogeneidade dos dados obtidos.

### 3.3.1 Avaliação por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura

Após a obtenção dos óleos, diferentes concentrações (Tabela 1) foram definidas de acordo com estudos previamente consultados, os quais testaram os mesmos gêneros fúngicos e os mesmos óleos essenciais com metodologia semelhante ao presente trabalho (NASCIMENTO, 2021).

Tabela 1- Concentrações dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) utilizadas nos ensaios *in vitro* por incorporação, de acordo com a espécie fúngica.

Espécies fúngicas	Concentração dos óleos essenciais (ppm)	
	Alecrim	Louro
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0, 250, 500 e 1000	0, 250, 500 e 1000
<i>Cladosporium</i> sp.	0, 250, 500 e 1000	0, 250, 500 e 1000
<i>Aspergillus</i> sp.	0, 200, 750 e 1000	0, 200, 750 e 1000
<i>Penicillium</i> sp.	0, 500, 750 e 1000	0, 500, 750 e 1000

Fonte: Autora (2022).

Os óleos essenciais foram dissolvidos com o auxílio de pipetas automáticas e microtubos, onde alíquotas contendo 100  $\mu$ L de água destilada autoclavada mais 10 ppm de Tween 20, foram agitadas manualmente até que houvesse a homogeneização da solução. Cada solução foi adicionada aos frascos contendo meio de cultura BDA mais os antibióticos estreptomicina 500 mg/L e penicilina 0,5% (v / v), conforme os tratamentos com diferentes concentrações. A testemunha foi realizada da mesma maneira, sem a adição dos óleos essenciais (GARCIA *et al.*, 2017; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013).

Após a solidificação do meio de cultura, discos de 0,5 cm contendo os micélios dos fungos foram colocados no centro de cada uma das placas. Estas foram então vedadas e

guardadas em estufa BOD a temperatura de 25 °C e 12 horas de fotoperíodo. As medições dos diâmetros das colônias foram feitas a cada 24h até que os tratamentos controle atingissem 80% das placas (GARCIA *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Avaliação por meio de volatilização sobre os fungos

Para a avaliação dos efeitos dos óleos essenciais por volatilização dos seus compostos, meio de cultura BDA mais os antibióticos estreptomicina 500 mg/L e penicilina 0,5% (v / v) foi vertido em placas de Petri e discos de 0,5 cm dos fungos foram colocados no centro destas. Um chumaço de algodão foi fixado nas tampas das placas, onde foram adicionadas diferentes alíquotas dos óleos com o auxílio de pipetas automáticas (Tabela 2). Nos tratamentos controle, 100 µL de água destilada foi pipetada substituindo os óleos (GARCIA *et al.*, 2019; LORINI; BONALDO; MENDES, 2016).

Tabela 2 – Alíquotas utilizadas nos ensaios *in vitro* por volatilização dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*), conforme a espécie fúngica.

Espécies fúngicas	Dosagens dos óleos essenciais (µL)	
	Alecrim	Louro
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	0, 100, 140 e 180	0, 40, 80 e 100
<i>Cladosporium sp.</i>	0, 50 e 100	0, 50, 100 e 150
<i>Aspergillus sp.</i>	0, 50 e 100	0, 50 e 100
<i>Penicillium sp.</i>	0, 50 e 100	0, 50 e 100

Fonte: Autora (2023).

Para os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em ambos os ensaios fungitóxicos, por conta da sua abundante produção de conídios e irregularidade de crescimento das colônias, foi realizado um preparo adaptado por Colla *et al.* (2008) de uma solução de conídios. Utilizando 100 mL de água e 0,5% de ágar puro em frascos tipo Falcon, foram adicionados 3 discos contendo os micélios dos fungos, para após uma agitação manual da solução, uma gota da solução fosse pipetada no centro das placas formando discos de aproximadamente 0,5 cm.

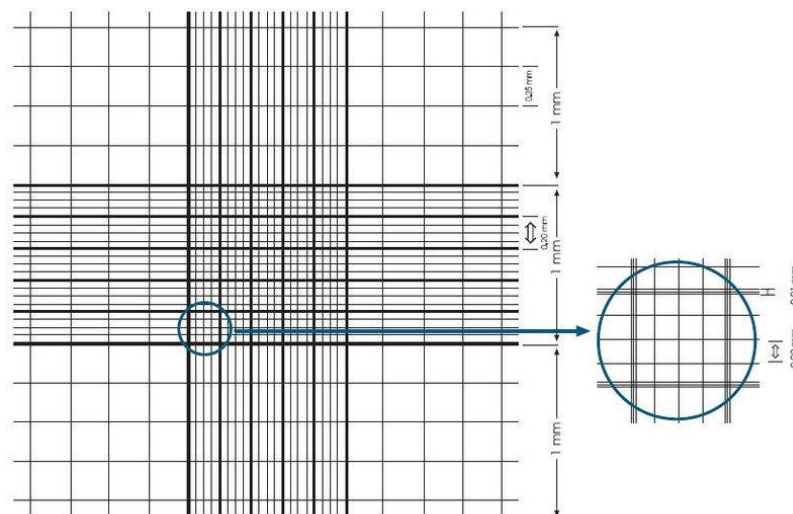
Após a repicagem dos discos e a pipetagem das gotas contendo micélios, as placas foram vedadas e incubadas à 25 °C em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas. As medições dos diâmetros foram realizadas a cada 24 horas até os tratamentos controle atingirem aproximadamente 80% das placas, quando os chumaços de algodão contendo os óleos foram retirados, com o objetivo de continuar com as medições e analisar possíveis mudanças nos índices para cada fungo (COLLA *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2019).

### 3.4 CONTAGEM DE CONÍDIOS

Após o encerramento de cada um dos ensaios fungitóxicos, foi realizada a contagem de produção de conídios dos fungos por tratamento. Para a contagem, foi adicionado 10 mL de água no meio de cultura de cada placa e feita a raspagem das colônias com o auxílio de uma alça de Drigalski. A solução foi filtrada em funil forrado com gaze para um vidro tipo Erlenmeyer. A contagem dos conídios foi realizada com a adição de aproximadamente 2 gotas desta solução previamente homogeneizada com o auxílio de uma pipeta em uma câmara de Neubauer (Figura 14) (ALFENAS; MAFIA, 2007).

As imagens da câmara de Neubauer vistas em microscópio foram capturadas por uma câmera acoplada à um computador e estas foram processadas com o pacote EBImage do Software R. O quadrante (Figura 13) utilizado para cada fungo foi definido conforme o tamanho e a quantidade de conídios visualizados em microscópio (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Figura 13 - Ilustração esquemática de sistema utilizado em Câmara de Neubauer para contagem de conídios, cada quadrado representa diferentes quadrantes para cálculo de quantidade de conídios por mililitro.



Fonte: SANTIBADIA, 2012.

### 3.5 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE AS NOZES

Foram utilizadas 4 nozes inteiras por tratamento, totalizando 24 nozes por método de aplicação: imersão, pulverização e volatilização. As nozes foram quebradas dentro de câmara de fluxo laminar e 3 fragmentos de cada, selecionados aleatoriamente, foram posicionados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA mais os antibióticos estreptomicina 500 mg/L e penicilina 0,5% (v / v). Cada tratamento foi avaliado após 15 e após 30 dias de aplicação dos métodos, e foi feito o registro do número de colônias que se desenvolveram nas placas diariamente.

Todas as nozes foram previamente submetidas à assepsia com imersão em solução de álcool à 98%, durante 2 minutos, em seguida imersas em solução 2,5% de hipoclorito por 2 minutos e lavadas em água destilada esterilizada. Estas foram então posicionadas em camada dupla de papel filtro previamente sanitizado em autoclave e secas por 5 minutos em câmara de fluxo laminar não selada (Figura 15). O lote de nozes utilizado nestas etapas foi obtido pelo mesmo produtor, produzidas pelas mesmas matrizes da etapa de obtenção dos fungos, mas na safra de 2022. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos com 4 repetições. Cada placa foi considerada uma parcela experimental.

O teor de umidade do lote de nozes antes e após a realização de cada um dos tratamentos foi determinado por uma adaptação do método básico de referência para a introdução de novas espécies pelas Regras Internacionais de Análise de Sementes da International Seed Testing Association, uma vez que a *C. illinoiliensis* ainda não se encontra inserida na metodologia das Regras para Análises de Sementes (2009).

Cinco nozes foram previamente pesadas em balança analítica e então secas em estufa a 50°C por 24 horas, para posterior nova pesagem e determinação (Equação 4) do teor de umidade, quando foram retiradas da estufa e resfriadas em dessecador com sílica gel (RAS, 2009).

$$\% \text{ de Umidade } (U) = \frac{100(P-p)}{P-t} \times 100 \quad (4)$$

Onde,

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p = peso final do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca

t = tara, peso do recipiente com sua tampa.

### 3.5.1 Aplicação dos óleos essenciais por Imersão

Para a aplicação por imersão, foram realizadas 3 soluções contendo água destilada autoclavada, 0,3% de Tween 20 e 3000 ppm de cada óleo essencial. As nozes foram imersas por 15 minutos nas soluções em um Becker de vidro (Figura 14) e agitadas para homogeneização com o auxílio de bastões de vidro dentro de câmara de fluxo. O volume de solução necessário para total imersão das nozes e a porcentagem de emulsificante Tween 20 foram previamente calculadas em um ensaio piloto. No tratamento testemunha, o óleo essencial não foi adicionado (LIMA e VILLELA, 2017; PANAGOU *et al.*, 2004).

Figura 14 - Aplicação pelo método de imersão das nozes em solução.



Fonte: Autora (2023)

Após os tratamentos, as nozes foram secas por 15 minutos em câmara de fluxo laminar não selada (Figura 16) e estocadas em embalagens plásticas de polietileno previamente esterilizadas em luz UV por 1 hora. Estas foram incubadas em estufas BOD até o momento das análises após 15 e 30 dias, quando 4 nozes foram utilizadas em cada um dos momentos por tratamento. Para a determinação do volume necessário para o método empregado, foi medido o volume total de solução pronta antes e após a absorção pelas nozes (PANAGOU *et al.*, 2004; POLLETO *et al.*, 2014);

Figura 15 - Secagem das nozes-Pecã em câmara de fluxo com corrente de ar.



Fonte: Autora (2023).

### 3.5.2 Tratamento por volatilização dos óleos essenciais

As nozes previamente desinfestadas conforme descrito anteriormente foram dispostas em uma camada única em potes de vidro com vedação hermética, esterilizados em luz UV por 1 hora. Foram fumigadas dentro das caixas com 200  $\mu$ L de cada óleo essencial, pipetados em chumaços de algodão fixados nas tampas das caixas (Figura 16), e seladas por 30 minutos. Para o tratamento controle, foi realizada a pipetagem de 200  $\mu$ L de água destilada autoclavada (FERNANDES *et al.*, 2017; HILLEN *et al.*, 2012).

Figura 16 - Aplicação dos óleos essenciais por volatilização.



Fonte: Autora (2023)



As 3 caixas contendo cada um dos tratamentos foram manipuladas em câmara de fluxo e estocadas em embalagens plásticas de polietileno previamente esterilizadas em luz UV por 1 hora. Foram incubadas em estufas BOD até o momento das análises após 15 e 30 dias (FERNANDES *et al.*, 2017; PANAGOU *et al.*, 2015).

### 3.5.3 Tratamento por pulverização

Após a assepsia das nozes conforme descrito anteriormente, estas foram submetidas à pulverização manual (Figura 17) até o ponto de escorrimento com soluções contendo água destilada autoclavada, 3000 ppm de cada óleo essencial mais 0,3% de Tween 20.

Figura 17 - Aplicação dos óleos essenciais por pulverização.



Fonte: Autora (2023)

Depois de secas por 15 minutos em câmara de fluxo laminar não selada, foram estocadas em embalagens plásticas de polietileno (Figura 18) previamente esterilizadas em luz UV por 1 hora. As embalagens contendo cada tratamento foram incubadas até o momento das análises em estufas BOD. O volume de solução utilizado para o tratamento das nozes foi medido antes e após a aplicação (PANAGOU *et al.*, 2004; POLLETO *et al.*, 2014).

Figura 18 - Armazenamento das nozes Pecã após os tratamentos em sacos de polietileno para posterior avaliação após 15 e 30 dias dos tratamentos.



Fonte: Autora (2023)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O rendimento médio para a extração do OE de Alecrim foi de 1,8% (Tabela 3), sendo uma das espécies com um dos maiores rendimentos entre as aromáticas medicinais encontradas no mercado. Teshale *et al.* (2022), em um estudo com diferentes variáveis durante a extração por hidrodestilação do óleo, como temperatura da água da extração e tempo de extração, observaram uma amplitude de rendimento de 0,54 – 2,82%, sendo o valor médio encontrado no presente estudo dentro do registrado. Em uma comparação realizada por Porte e Godoy (2001) com diferentes estudos de rendimento por todo o mundo, os valores variaram de aproximadamente 0,2% no Egito até 2,5% na Turquia.

O rendimento médio de óleo essencial de louro foi de 1,88% (Tabela 3), valor enquadrado na literatura como médio à alto para a espécie e para a forma de extração. Ballen *et al.* (2019) realizaram 4 diferentes formas de obtenção de extratos do Louro e óleo essencial, obtendo por hidrodestilação um rendimento de 1,13% (V/m). Outros autores ainda utilizando aparatos e metodologia similares, encontraram com aproximadamente 2,5 h de tempo de extração, valores de 0,22 a 1,86% de rendimento (DERWICH; BENZIANE; BOUKIR, 2009; FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Tabela 3 – Rendimento médio obtido de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*), conforme a quantidade de massa fresca, massa seca e o tempo de extração.

Rendimento médio				
	Massa fresca (g)	Massa seca (%)	Óleo obtido (g)	Rendimento (%)
<b>Alecrim</b>	1585,80	42,80	9,50	1,80
<b>Louro</b>	1176,40	46,12	7,85	1,88

Fonte: Autora (2023).

A época de coleta do material vegetal, o uso de folhas secas ou frescas, o método de extração, a localização e as condições edafoclimáticas das plantas, entre outros fatores, influenciam no rendimento e qualidade final do óleo para a espécie. Testes realizados em plantas de *L. nobilis* de diferentes locais em Marrocos mostraram uma performance de até 2,5% de rendimento de óleo. Apesar da importância em se obter maiores volumes de óleo, as qualidades organolépticas como odor e aparência e as atividades biológicas como propriedades

químicas e físicas, também são essenciais para a valorização do óleo (BELASI *et al.*, 2020; YILMAZ; TIMUR; ASLIM, 2013).

Cada composto químico é responsável por diferentes efeitos atribuídos ao OE de Louro, dentre os mais visados em estudos antimicrobianos estão na sua capacidade de inibição de crescimento de microrganismos indesejáveis e seu potencial antioxidante. O 1,8-cineole ou eucalyptol é um monoterpene eficiente no combate as substâncias produzidos por fungos, considerados majoritários no OE de louro, assim como o linalool que se destaca contra o gênero de fungos emboloradores *Aspergillus*, além de possuir propriedades antissépticas e antivirais (ADJOVI *et al.*, 2019).

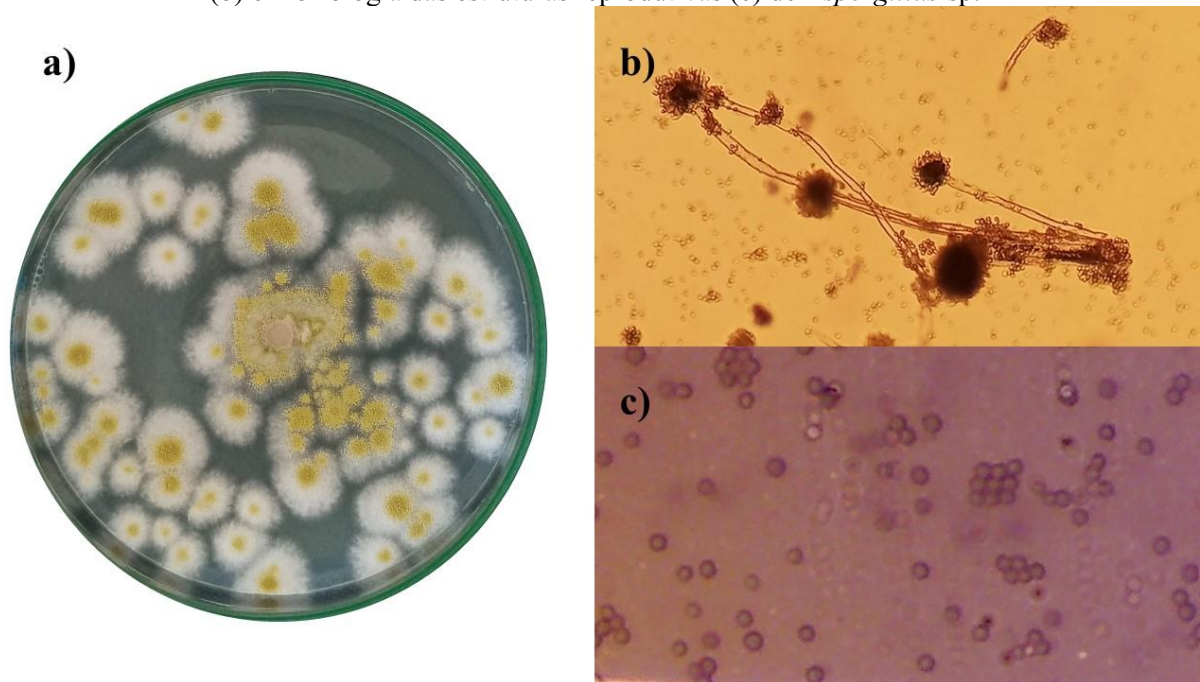
Assim como para o OE de Louro, os componentes majoritários que definem as principais propriedades atribuídas ao OE de Alecrim tendem a ser os mesmos independente das condições das matrizes utilizadas, variando assim suas porcentagens. Ambos os óleos possuem como principal componente o 1,8-cineol, constituinte relacionado ao controle de diferentes microrganismos (GARCIA *et al.*, 2017; SOLIMAN *et al.*, 1994).

Um dos desafios na comercialização e uso dos óleos essenciais está na forte interação que existe entre fatores ambientais e fisiológicos, pois a produção de metabólitos secundários responsáveis pelas características atribuídas à cada espécie varia em concentração e tipos de ativos químicos. Estudos específicos que correlacionem e padronizem a composição dos OE ainda são limitados, sendo indispensável que se expandam estas informações futuramente, de acordo com o aumento da demanda destes produtos (GONÇALVES, MANCINELLI; MORAIS, 2009; ZARONI *et al.*, 2004).

#### 4.2 DIVERSIDADE E OBTENÇÃO DOS FUNGOS NO LOTE DE NOZES PECÃ

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são da família Aspergillaceae e da classe dos Ascomicetos. Dentro do gênero, existem mais de 200 espécies. As colônias são de coloração branca no início de seu desenvolvimento, evoluindo para diferentes tonalidades de verde, amarelo, amarronzado e preto (Figura 19). A principal característica de identificação da espécie está em seu talo filamentososo que é constituído por hifas septadas distribuídas em ângulos de 45°, dando origem ao conidióforo. Seus conídios são incolores, bastante abundantes e redondos (TSANG *et al.*, 2018).

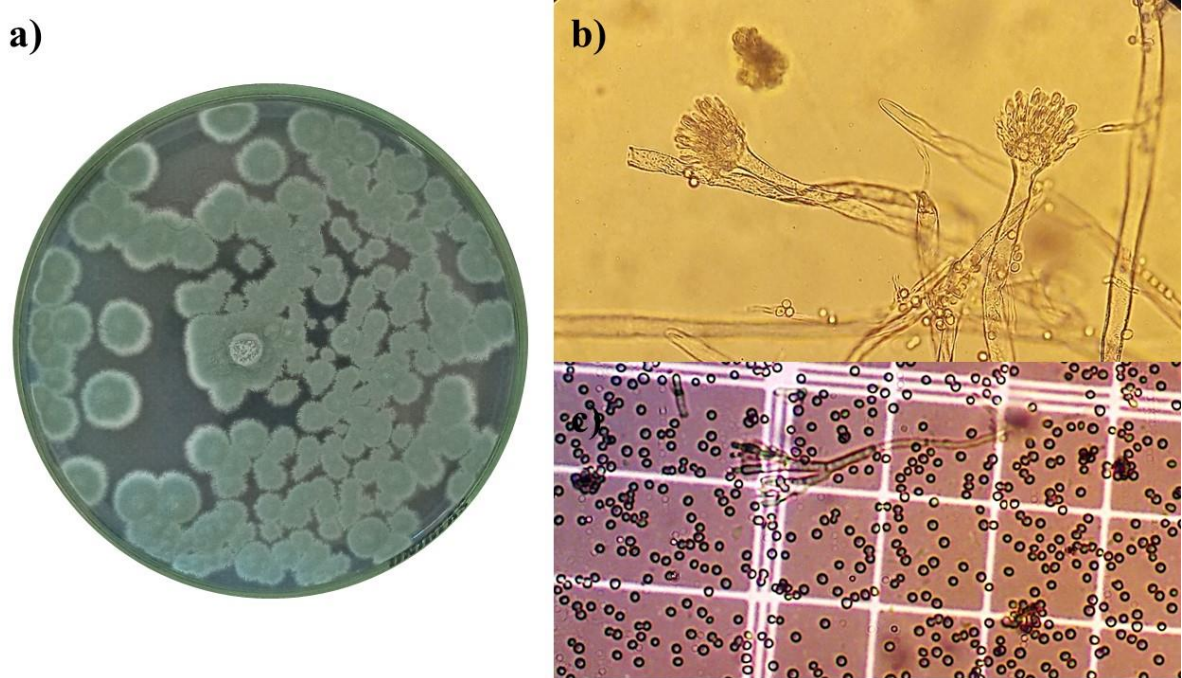
Figura 19 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100 x) de conidióforos (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de *Aspergillus* sp.



Fonte: Autora (2022)

O gênero *Penicillium* pertence à família Trichomaceae e à ordem Eurotiales. Os fungos do gênero são conhecidos como emboloradores, assim como os do gênero *Aspergillus*, e formam os comumente conhecidos bolor verde ou azul (Figura 20). Uma das características mais marcantes das espécies está em sua forma reprodutiva assexuada, com estruturas em forma de pincel, de onde se inspirou o nome do táxon “penicillus”. Suas colônias também iniciam seu desenvolvimento em cor esbranquiçada, evoluindo para uma textura pulverulenta azulada ou esverdeada, abundante em esporos e irregulares em crescimento. Seus conídios são normalmente incolores, pequenos e redondos (TSANG et al., 2018; MIRI et al., 2020).

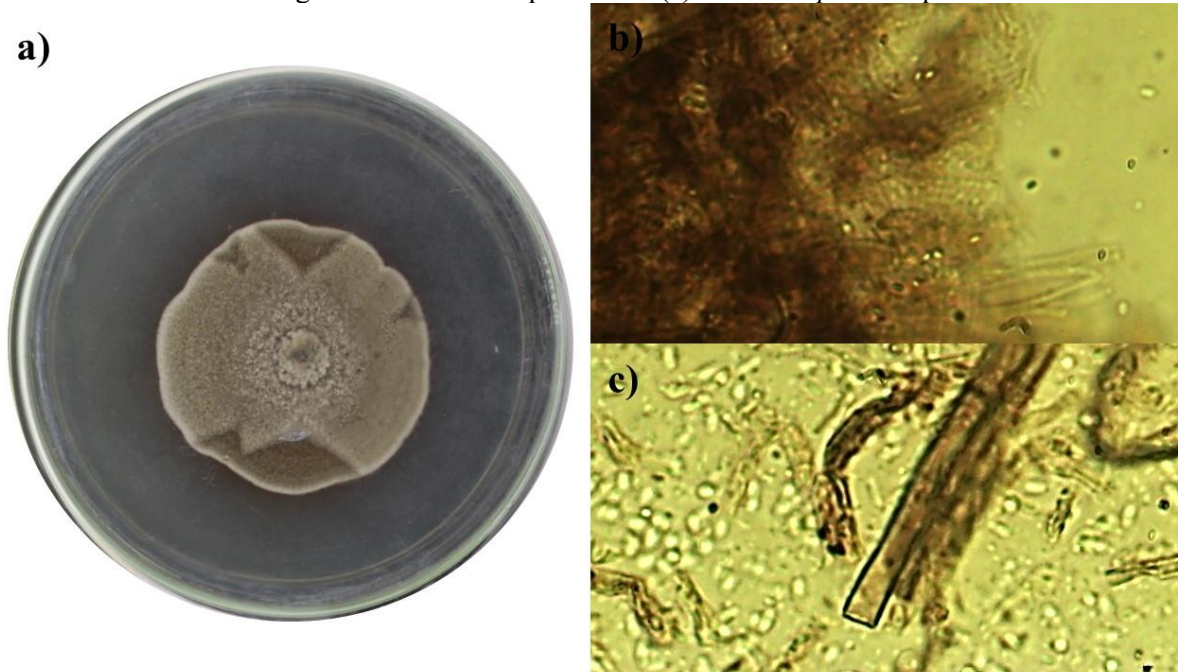
Figura 20 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de conidióforos (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de *Penicillium* sp.



Fonte: Autora (2023).

O gênero *Cladosporium* sp. pertence ao filo Ascomycota e possui hoje aproximadamente 170 espécies verdadeiras, distribuídas por todo o mundo em diferentes substratos, como em plantas, solos e outros tipos de fungos, podendo ser patógeno de animais, parasitas de fungos e plantas. Uma das características marcantes deste gênero é a presença de melanina em suas paredes celulares (Figura 21), fazendo com que tanto a colônia quanto suas estruturas reprodutivas possuam uma cor acastanhada típica. Seus conídios são pequenos e bastante abundantes, com formato ovalado (BENSCH, 2010).

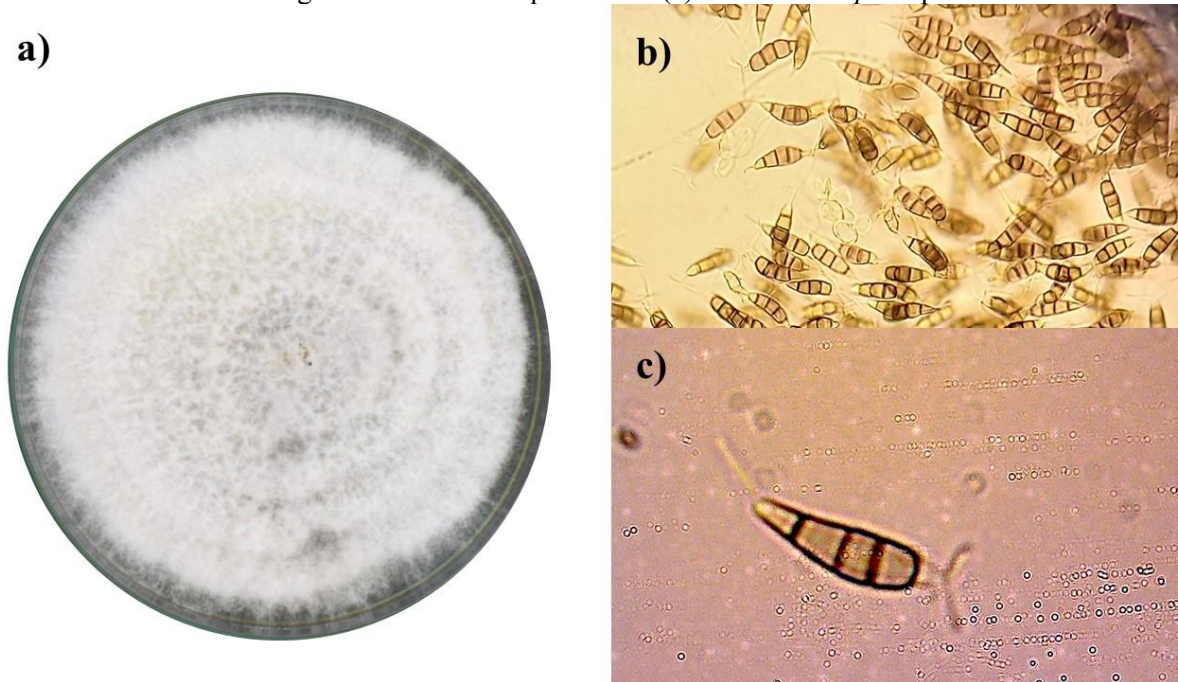
Figura 21 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de micélios (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de *Cladosporium* sp.



Fonte: Autora (2022)

O gênero *Pestalotiopsis* pertence ao grupo dos fungos Mitospóricos e ao subgrupo dos Coelomicetos, onde existem 590 espécies registradas no mundo. Possuem conidióforos hialinos, septados e formados a partir de células iniciais superiores. Seus conídios (Figura 22) são bastante característicos, encontrados principalmente dentro de agrupamentos chamados picnídios visíveis à olho nú nas colônias, sendo pequenos pontos pretos e rígidos distribuídos nas áreas mais velhas de crescimento micelial. Os conídios são fusiformes formados por 6 células, com paredes finas, sendo a célula apical cônica e com a presença de apêndices simples ou ramificados (BARNETT; HUNTER, 1998; SUTTON, 1998).

Figura 22 - Morfologia da colônia (a), imagem vista em microscópio de luz (100x) de conídios (b) e morfologia das estruturas reprodutivas (c) de *Pestalotiopsis* sp.



Fonte: Autora (2022)

Em pelo menos duas repetições dos fragmentos de cada noz cultivada em meio de cultura, pode-se observar a presença de gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, ambos com grande importância na degradação destas durante o armazenamento, além da capacidade de produção de aflotoxinas comprovadamente carcinogênicas quando ingeridas com frequência. A predominância em ocorrência destes gêneros também foi encontrada em 4 diferentes lotes de nozes vindos do Rio Grande do Sul, chegando a 100% das amostras, sendo das principais espécies: *A. wentii*, *A. ruber*, *A. pseudoglaucus* e *A. chevalieri* (GARCIA *et al.*, 2019).

Segundo Huang e Hanlin (1975), existe uma tendência exponencial no aumento da quantidade de fungos do gênero *Aspergillus* conforme o maior tempo de armazenamento das nozes Pecã e a tendência contrária para o gênero *Fusarium*. Nos 4 diferentes lotes de nozes de Garcia *et al.* (2019), o gênero *Fusarium* foi encontrado em frequências de 25% a 75% das amostras, sendo este um fungo típico de solos também capaz de produzir aflotoxinas. Durante a identificação das colônias, o gênero ocorreu em somente 2 repetições de duas diferentes nozes, fato que corrobora com a afirmação de Huang e Hanlin (1975).

Em um estudo realizado por Terabe, Martins e Homechin (2008), onde as nozes de 3 diferentes cultivares foram avaliadas conforme a incidência fúngica tanto nas cascas quanto nas amêndoas, a maior ocorrência de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi nas amêndoas, enquanto nas cascas a maior incidência foi dos gêneros *Cladosporium* e *Alternaria*. Apesar do



presente estudo ter utilizado uma avaliação aleatória da distribuição de fragmentos de casca e das amêndoas, não foram observadas diferenças entre as duas partes das nozes e as colônias fúngicas desenvolvidas.

Em pesquisa sobre possíveis tratamentos das nozes logo após a colheita para uma maior durabilidade destas, um ensaio inicial demonstrou já uma alta contaminação por diferentes gêneros, sendo todos os encontrados nos estudos citados anteriormente. Os autores ressaltam diversos fatores associados ao manejo das nozes durante e após a colheita que contribuem para a contaminação destas, como a coleta, transporte, armazenamento e secagem. O gênero *Aspergillus* também se mostrou o mais incidente antes e após os tratamentos (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Um dos fungos selecionados para os ensaios *in vitro* com o uso de óleos essenciais pertence ao gênero *Pestalotiopsis*, o qual não é frequentemente citado em literatura durante a pós-colheita, porém no presente trabalho ocorreu de forma bastante significativa entre as amostras analisadas. A incidência de mancha foliar, causada por diferentes espécies do gênero que são consideradas secundárias aproveitadoras, vem crescendo ao longo dos anos e causando perdas econômicas significativas em pomares do sul do Brasil (MARTINS; LAZZAROTO, 2019).

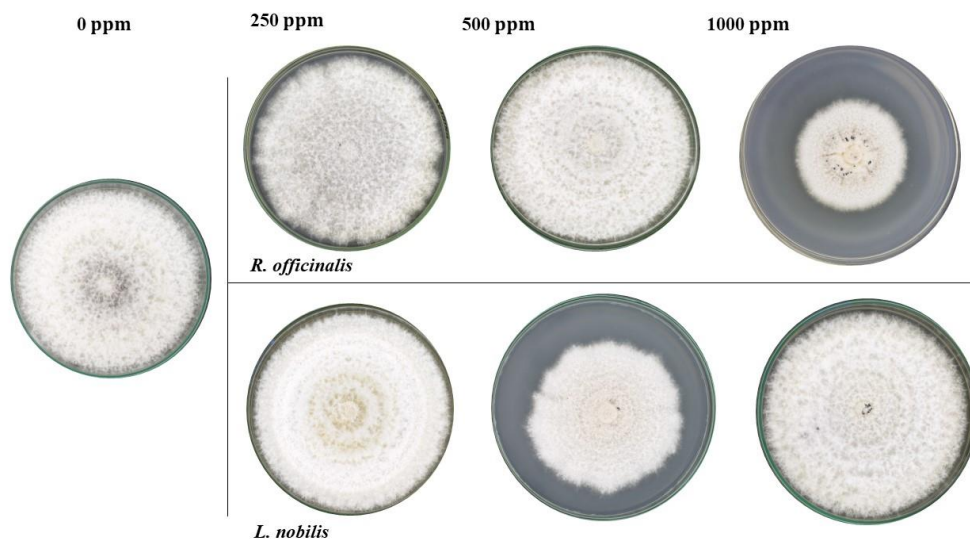
Em uma análise dos fungos fitopatogênicos presentes tanto em flores masculinas, flores femininas e nas nozes em si realizada em um lote vindo de Anta Gorda (RS), houve uma incidência de 8% do gênero *Pestalotiopsis* somente nas cascas das nozes. No presente lote estudado, a incidência foi de quase 100% das nozes, indicando que provavelmente o pomar sofreu com a doença durante o desenvolvimento das flores e nozes, tornando-as possíveis fontes de propágulos e expondo-as a uma degradação mais acelerada (POLLETO *et al.*, 2014).

### 4.3 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS FUNGOS *IN VITRO*

#### 4.3.1 Avaliação do crescimento micelial dos fungos por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura

O crescimento das colônias foi registrado diariamente e organizado em pranchas ilustrativas de acordo com o desenvolvimento destas, conforme a espécie e a concentração do óleo essencial utilizado (Figura 23). A capacidade de crescimento e alastro dos micélios é de grande importância no controle de fungos, uma vez que são estas estruturas as responsáveis pela assimilação, fixação e crescimento de cada espécie, proporcionando a sua reprodução e disseminação (YAN *et al.*, 2014).

Figura 23 - - Crescimento micelial do fungo *Pestalotiopsis* sp. com a incorporação de 250, 500 e 1000 ppm de óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de Louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda.



Fonte: Autora (2022).

A partir da Figura 24 e da Tabela 4, é possível observar que não houve diferença estatística sobre o índice AACCM entre a testemunha e a concentração de 250 ppm para o óleo essencial de louro aplicado sob o fungo *Pestalotiopsis* sp., sendo que a concentração mais eficiente em porcentagem de inibição foi no valor de 500 ppm, assim como para o índice IVCN. Já para o óleo essencial de alecrim, o valor mais eficiente de tratamento foi com 1000 ppm, com inibição de área de crescimento de 62,8% e IVCN de 20,8%, ou seja, a velocidade de crescimento do fungo foi aproximadamente 21% mais lenta em relação a testemunha.

Considerando que os óleos essenciais são compostos por misturas lipofílicas com abundantes substâncias terpenóides, agem de diferentes formas com toxicidade sobre os microrganismos, especialmente sobre as características celulares e de membrana plasmática das células. Porém a reação de cada espécie fúngica em relação a composição química de cada óleo essencial pode variar, fazendo com que possa ocorrer o estímulo tanto de crescimento quanto de esporulação, com a possível utilização dos compostos complexos glicólicos como substrato pela espécie de microrganismo em certas concentrações (GARCIA *et al.*, 2017; SILVA; SILVA, 2019).

Tabela 4 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição encontrados para o fungo *Pestalotiopsis* sp., por incorporação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*).

<b>Alecrim</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
<b>0</b>	76,67 c	0	0,72 b	0
<b>250</b>	63,16 b	17,6	0,75 c	-4,2
<b>500</b>	61,02 b	20,4	0,76 c	-5,6
<b>1000</b>	28,51 a	62,8	0,57 a	20,8
<b>P valor</b>	1,68x10 <sup>-13</sup>		4,52x10 <sup>-12</sup>	
<b>Louro</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
<b>0</b>	69,35 c	0	0,64 b	0
<b>250</b>	73,25 c	-5,6	0,75 c	-17,2
<b>500</b>	40,13 a	42,1	0,53 a	17,2
<b>1000</b>	56,81 b	18,1	0,76 c	-18,8
<b>P valor</b>	7,13x10 <sup>-8</sup>		2,28x10 <sup>-5</sup>	

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)

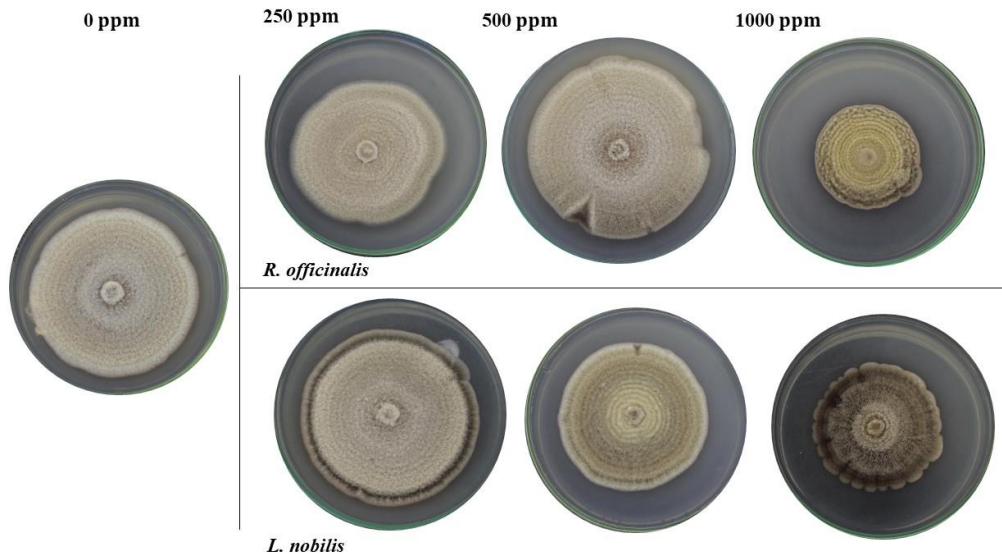
Fonte: Autora (2023).

Em um estudo realizado no Sri Lanka a fim de se avaliar o uso dos OEs de manjeriço, cravo e canela no controle de fungos, foram determinados os valores de inibição mínima e letal para o gênero *Pestalotiopsis* de 600 ppm e 600 ppm; 600 ppm e 1000 ppm; 400 ppm e 600 ppm, respectivamente (KODITUWAKKU *et al.*, 2020).

Para o fungo *Cladosporium* sp. (Figura 24), o tratamento com maior eficiência na inibição de crescimento das colônias foi com a concentração de 1000 ppm para ambos os óleos essenciais, com porcentagem de inibição de crescimento de 42,3% para o OE de alecrim e de 30,5% para o óleo essencial de louro (Tabela 5). O índice IVCM com a utilização do alecrim não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, com exceção da concentração de 1000 ppm,

com porcentagem de inibição de 34%. Para o OE de louro, a porcentagem de inibição do IVCM foi proporcional ao aumento da concentração do óleo no meio, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos, conforme também demonstra o p-valor  $> 0,05$ .

Figura 24 - Crescimento micelial do fungo *Cladosporium* sp. com a incorporação de 250, 500 e 1000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda.



Fonte: Autora (2022).

Foi estudado o uso de óleos essenciais no controle do gênero *Cladosporium* com intuito de conservação de arquivos em documentos históricos, por causar danos a acervos e coleções especialmente compostas por celulose. Foram testados os OEs de capim-limão, orégano, alecrim, eucalipto e menta. Dentre os óleos testados, o de alecrim e de eucalipto apresentaram controle fúngico moderado para o *Cladosporium*. Os demais com alto potencial de controle, foram testados em concentrações acima de 10000 ppm (TOMIĆ *et al.*, 2023).

Tabela 5 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectivas aos índices para o fungo *Cladosporium* sp. em relação à incorporação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*).

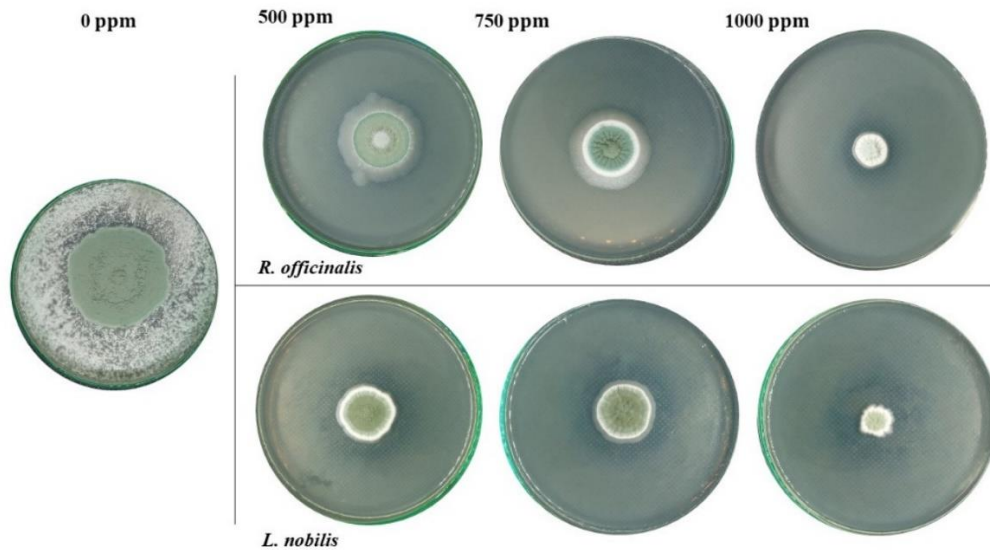
<b>Alecrim</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	58,8 c	0	0,49 c	0
<b>250</b>	51,36 c	12,7	0,45 c	8,2
<b>500</b>	55,29 b	6,0	0,52 c	-6,1
<b>1000</b>	33,93 a	42,3	0,32 b	34,7
<b>P valor</b>	3,52x10 <sup>-9</sup>		1,61x10 <sup>-5</sup>	
<b>Louro</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	53,1 c	0	0,51 a	0
<b>250</b>	51,58 c	2,9	0,47 a	3,9
<b>500</b>	43,68 b	17,7	0,44 a	7,8
<b>1000</b>	36,92 a	30,5	0,49 a	13,7
<b>P valor</b>	4,91x10 <sup>-9</sup>		0,4612	

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott ( $p > 5\%$ )  
Fonte: Autora (2023)

Para a espécie *Penicillium* sp. (Figura 25), a porcentagem de inibição para ambos os índices foi proporcional ao aumento da concentração do OE de alecrim, mas não ocorreu diferença estatística entre o tratamento com 500 ppm e a testemunha com 0 ppm. Já com o uso do OE de louro, todos os tratamentos diferiram estatisticamente nos valores de AACCM, sendo o mais eficiente com 1000 ppm, com 54,1% de inibição de crescimento e 77,1% de inibição do IVCM (Tabela 6).

Lee *et al.* (2020) avaliaram o potencial inibitório dos óleos essenciais de alecrim e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) contra diferentes espécies de fungos de pós-colheita, dentre estas, 2 espécies de *Penicillium*. No estudo, o capim-limão se mostrou mais eficiente quando comparado com o OE de alecrim para todos os fungos, com exceção das espécies do gênero *Penicillium*, onde o OE de *R. officinalis* se mostrou com maior potencial de controle de crescimento destes. O estudo ainda conclui que a porcentagem de inibição para os *Penicillium* sp. iniciou a partir de 500 ppm, sendo dependente do aumento da concentração.

Figura 25 - Crescimento micelial do fungo *Penicillium* sp. com a incorporação de 500, 750 e 1000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda.



Fonte: Autora (2022).

Dragoni e Valoni (2009) testaram o óleo de alecrim puro diretamente no crescimento de colônias fúngicas responsáveis por danos no pós-processamento de alimentos, dentre as espécies testadas, estão diferentes tipos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Com exceção do fungo *A. ochraceus* e *A. flavus*, o OE foi capaz de inibir 100% do crescimento das demais espécies.

A espécie *Penicillium digitatum* é um dos fungos de pós-colheita mais comuns encontrado em frutas, verduras e grãos, causando danos aos vegetais e diminuindo seu tempo de prateleira. Foram testadas 6 concentrações incorporadas ao meio de cultura, sendo de 1000 a 3500 ppm. Os valores de porcentagem de inibição de crescimento das colônias variaram aproximadamente 17 a 50%, enquanto os valores no presente estudo variaram de 8 à 55,1%, sendo o último para 1000 ppm. Assim como pode ser observado na Figura 26, também foi relatada a descoloração intensa dos micélios das colônias a partir dos 1000 ppm de concentração (HENDEL, LAROUS; BELBEY, 2016).

Tabela 6 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectiva aos índices para o fungo *Penicillium* sp. em relação a incorporação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*).

<b>Alecrim</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	27,15 c	0	0,49 c	0
<b>500</b>	24,99 c	8,0	0,46 c	6,1
<b>750</b>	17,62 b	35,1	0,32 b	34,7
<b>1000</b>	12,2 a	55,1	0,15 a	69,4
<b>P valor</b>	3,9x10 <sup>-10</sup>		2,58x10 <sup>-8</sup>	
<b>Louro</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	30,93 c	0,0	0,35 c	0,0
<b>500</b>	22,74 b	28,6	0,21 b	40,0
<b>750</b>	22,09 b	26,5	0,21 b	40,0
<b>1000</b>	14,19 a	54,1	0,08 a	77,1
<b>P valor</b>	0,000		0,006	

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)  
Fonte: Autora (2023).

Houve diferença estatística entre todos os tratamentos testados para o índice AACCM para o fungo *Aspergillus* sp. (Figura 26), sendo aquele com maior porcentagem de inibição de crescimento o de 1000 ppm de OE de alecrim, com 72,5% e IVCM de 87,4%. O OE de louro não demonstrou diferença entre as concentrações nos valores obtidos em relação a testemunha, mas apresentou a maior porcentagem de 67,1% de inibição na velocidade de crescimento com a concentração de 750 ppm (Tabela 7).

Bomfim *et al.* (2019) testaram diferentes concentrações com a incorporação do OE de alecrim contra a espécie *A. flavus* e determinaram um valor mínimo de controle de crescimento de 500 ppm, com porcentagem de inibição de 30,9%. Com 200 ppm do óleo no presente estudo, a porcentagem de inibição encontrada foi de aproximadamente 34,5%. Já na concentração de 1000 ppm, foi calculado um percentual de controle de crescimento de 57,9%, enquanto para o índice no mesmo valor de diluição deste trabalho, foi encontrado aproximadamente 75,2% de inibição.

Para Lee (2020), onde foram avaliadas concentrações crescentes de 0 a 2500 ppm, com aproximadamente 130 ppm ocorreu a inibição de 38% no crescimento das colônias de *A. flavus*, mas não ocorreram diferenças estatísticas para o valor mínimo de controle de crescimento e os

valores de 128, 150 e 175 ppm. O valor máximo foi de 2500 ppm, com 90% de inibição de crescimento. Apesar de vários estudos demonstrarem a capacidade antifúngica do OE de alecrim, Pereira *et al.* (2006) não relataram diferenças no desenvolvimento de duas espécies de *Aspergillus* com a incorporação do óleo nas concentrações de 0 a 2000 ppm.

Tabela 7 - Valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), p-valor e porcentagem de inibição respectiva aos valores para o fungo *Aspergillus* sp. em relação a incorporação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*).

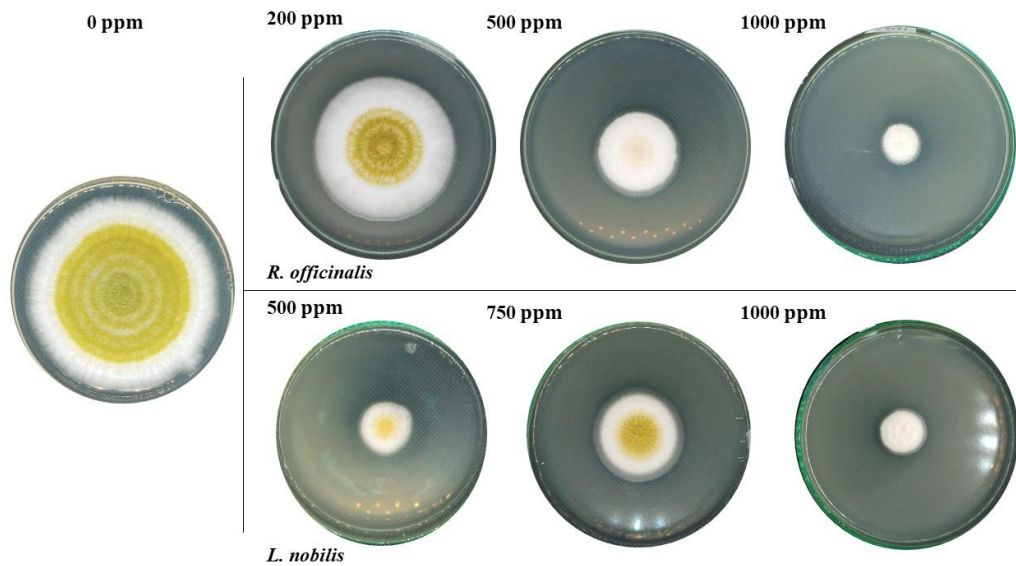
<b>Alecrim</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	42,6 d	0	0,87 c	0
<b>200</b>	34,52 c	19	0,61 b	29,9
<b>750</b>	17,96 b	57,8	0,23 a	73,6
<b>1000</b>	10,58 a	75,2	0,11 a	87,4
<b>P valor</b>	4,491 x10 <sup>-8</sup>		5,74 x10 <sup>-7</sup>	
<b>Louro</b>				
<b>Tratamento (ppm)</b>	<b>AACCM</b>	<b>Inibição (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>0</b>	43,31 c	0	0,76 c	0
<b>500</b>	23,75 b	45,2	0,38 b	50
<b>750</b>	15,6 b	64	0,25 b	67,1
<b>1000</b>	19,19 b	55,7	0,3 b	60,5
<b>P valor</b>	0,000			0,009

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)  
Fonte: Autora (2023).

O aumento da porcentagem de inibição do fungo *Aspergillus* sp. sendo proporcional ao aumento da concentração do óleo de louro em meio de cultura também é verificado em literatura, onde diferentes estudos relatam a inibição total das colônias entre 1750 e 2000 ppm (Figura 26). Em uma pesquisa onde o OE de *L. nobilis* foi utilizado a fim de se testar sua capacidade de preservação de grãos de trigo, a espécie *A. flavus* foi totalmente controlada *in vitro* com 1750 ppm. Com a incorporação de 1000 ppm, a porcentagem de inibição de crescimento foi de aproximadamente 32%, enquanto no presente estudo, com 500 ppm de OE o valor de inibição de crescimento das colônias foi de 45,2% (ALIGIANNIS *et al.*, 2001; BELASLI *et al.*, 2020).



Figura 26 - Crescimento micelial do fungo *Aspergillus* sp. com a incorporação de 200, 500 e 1000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0 ppm) à esquerda.



Fonte: Autora (2022)

Apesar dos valores de inibição para ambos os índices não terem variado estatisticamente a partir de 500 ppm de concentração do OE de louro, para Belasli *et al.* (2020), onde o óleo também foi incorporado ao meio de cultura e testado em diferentes concentrações, a porcentagem de inibição de crescimento encontrada com 1500 ppm foi de 76,1%, enquanto no presente estudo, com 750 ppm foi possível controlar o crescimento das colônias em 64%.

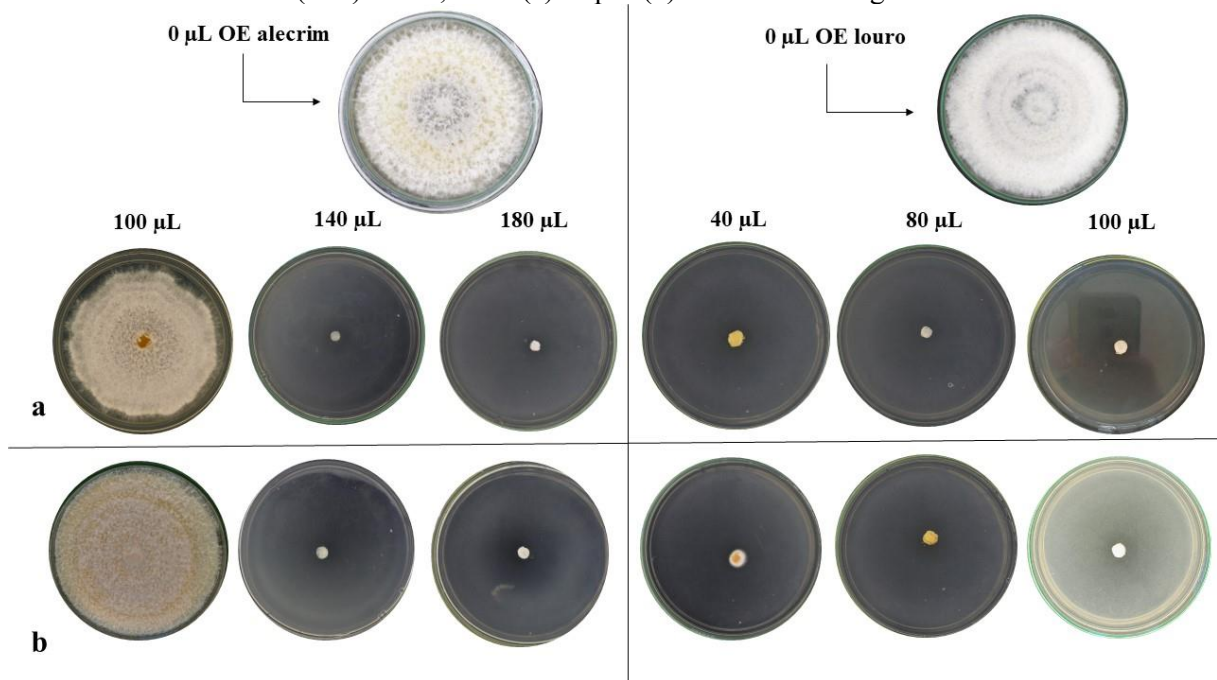
Conforme já ressaltado anteriormente, a composição química e conseqüentemente a atividade antifúngica dos óleos extraídos depende de diversos fatores, como as condições ambientais e fisiológicas da planta matriz. Porém, os compostos majoritários e suas ações conhecidas tendem a prevalecer em análises químicas de acordo com a espécie vegetal.

Foi possível observar menor sensibilidade aos compostos de ambos os óleos essenciais pelas espécies *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp., com menor porcentagem de inibição em seu crescimento. Enquanto para os fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., a variação na porcentagem de inibição de crescimento foi menor, mas ocorreram valores mais significativos, demonstrando maior potencial de controle pelos óleos.

#### 4.3.2 Avaliação do crescimento micelial dos fungos por volatilização dos óleos essenciais

Realizados os ensaios por volatilização dos óleos essenciais de alecrim e de louro, foram organizadas pranchas ilustrativas para cada fungo testado, de acordo com o óleo essencial utilizado e sua dosagem. Para cada situação, dois ensaios foram avaliados: antes (cenário “a” correspondentes às pranchas) e após a retirada dos algodões contendo os OEs (cenário “b”). A retirada dos óleos pode indicar os possíveis efeitos destes sobre os fungos, como controle de crescimento ou dano permanente à morte, conforme seu desenvolvimento ao longo da avaliação.

Figura 27 - Crescimento micelial do fungo *Pestalotiopsis* sp. com as alíquotas de 100, 140 e 180  $\mu\text{L}$  de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e 40, 80 e 100  $\mu\text{L}$  de louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0  $\mu\text{L}$ ) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs.



Fonte: Autora (2023).

Soylu *et al.* (2010) relataram em um experimento em que compararam o uso de diferentes OEs, dentre eles o de alecrim, e os efeitos destes foram mais eficientes com a aplicação por volatilização dos óleos puros do que por incorporação destes em meio de cultura.

Para o fungo *Pestalotiopsis* sp. (Figura 27), todos os tratamentos com OE de alecrim diferiram da testemunha, com exceção do IVCm após a retirada dos algodões, onde com 100  $\mu\text{L}$  houve 30% de inibição na velocidade de crescimento, não diferindo do tratamento controle, onde 140  $\mu\text{L}$  e 180  $\mu\text{L}$  foram estatisticamente iguais, com 64,3% e 100% de inibição,

respectivamente. Para AACCM, as médias também foram agrupadas em apenas 2 grupos após a retirada dos algodões, com 4,5% de inibição na área crescimento para 100  $\mu\text{L}$  e 80,3% e 81,5% para 140  $\mu\text{L}$  e 180  $\mu\text{L}$ , respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Pestalotiopsis* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

OE Alecrim								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 $\mu\text{L}$	35,58 c	0%	1,28 c	0%	67,43 b	0%	0,7 b	0%
100 $\mu\text{L}$	28,17 b	20,8%	1,02 b	20,3%	64,36 b	4,6%	0,49 b	30,0%
140 $\mu\text{L}$	4,14 a	88,4%	0,0 a	100,0%	13,26 a	80,3%	0,25 a	64,3%
180 $\mu\text{L}$	4,14 a	88,4%	0,0 a	100,0%	12,48 a	81,5%	0,0 a	100,0%
<b>P valor</b>	2,20x10 <sup>-16</sup>		5,53x10 <sup>-11</sup>		5,03x10 <sup>-10</sup>		2,24x10 <sup>-02</sup>	
OE Louro								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 $\mu\text{L}$	35,85 b	0,0%	1,34 b	0%	94,28 b	0%	0,65 b	0%
40 $\mu\text{L}$	4,14 a	88,5%	0,0 a	100%	26,92 b	71,4%	0,62 b	4,6%
80 $\mu\text{L}$	4,14 a	88,5%	0,0 a	100%	8,68 a	90,8%	0,0 a	100,0%
100 $\mu\text{L}$	4,14 a	88,5%	0,0 a	100%	8,68 a	90,8%	0,0 a	100,0%
<b>P valor</b>	2,2x10 <sup>-16</sup>		2,2x10 <sup>-16</sup>		1,6x10 <sup>-11</sup>		3,19x10 <sup>-5</sup>	

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott ( $p>5\%$ )

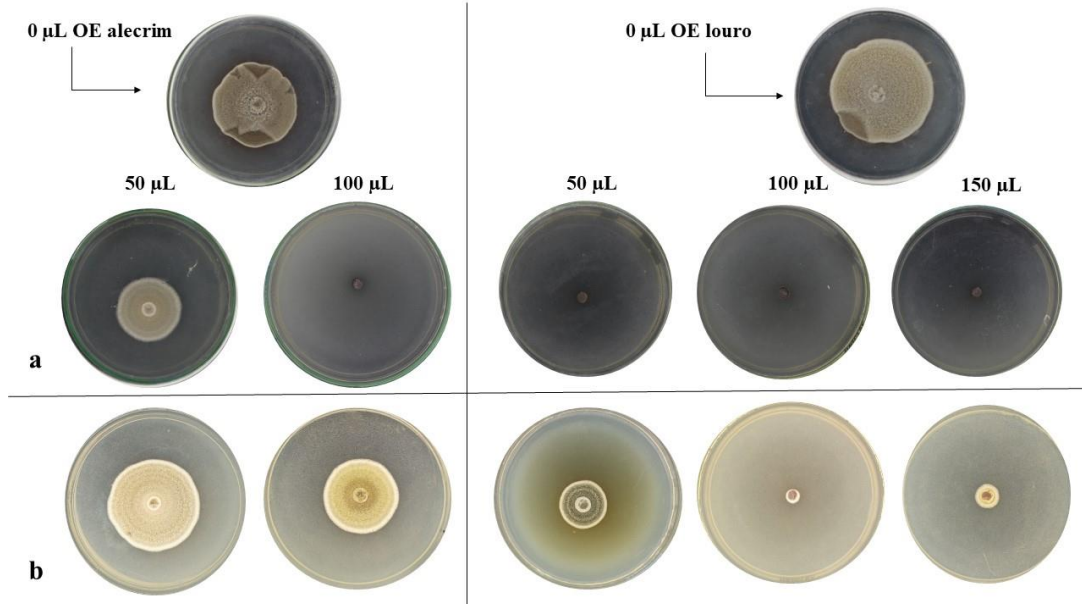
Fonte: Autora (2023).

A partir de 140  $\mu\text{L}$ , o crescimento micelial do *Pestalotiopsis* sp. foi 88,4% inibido, assim como sua velocidade de crescimento foi 100% controlada. Com 100  $\mu\text{L}$ , 20,8% foi a porcentagem de inibição. Em um estudo realizado utilizando o óleo essencial de cardamomo por volatilização em frutas de Rambutão contra o fungo, não houve diferenças significativas entre as doses de 30  $\mu\text{L}$  e 300  $\mu\text{L}$  no crescimento micelial do fungo, demonstrando alta sensibilidade deste em relação aos compostos voláteis do óleo (CHAIDECH; NATHAN, 2023).

Para o óleo essencial de louro, todos os tratamentos foram capazes de inibir em 100% o crescimento micelial das colônias. Após a retirada dos algodões contendo o OE, com a alíquota de 40  $\mu\text{L}$ , houve um percentual de 71% de inibição de crescimento e apenas 5% na velocidade de crescimento em relação a testemunha, demonstrando que a partir de 80  $\mu\text{L}$ , o

óleo essencial de louro foi capaz de controlar em 100% o desenvolvimento do fungo após 7 dias de contato.

Figura 28 - Crescimento micelial do fungo *Cladosporium* sp. com as alíquotas de 50 e 100  $\mu$ L de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e 50, 100 e 150  $\mu$ L de louro (*Laurus nobilis*), comparados ao tratamento controle (0  $\mu$ L) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs.



Fonte: Autora (2022).

O fungo *Cladosporium* sp. (Figura 28) também obteve uma inibição maior no crescimento com menores alíquotas do OE de louro, quando comparado ao de alecrim, porém todos os tratamentos difeririam da testemunha antes da retirada dos óleos. A porcentagem de inibição para AACCM e para o IVMC das doses de 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L de alecrim foram respectivamente 53,3% e 79,0%; e 47,9% e 100%. Após a retirada do OE, para o índice de crescimento não houve diferença estatística, enquanto para o IVCM, 100  $\mu$ L inibiu em aproximadamente 73% a velocidade de crescimento micelial (Tabela 9).

Para AACCM com o OE de louro, todas as alíquotas alcançaram uma porcentagem de inibição de crescimento de 79% e uma porcentagem de inibição de velocidade de crescimento de 100%. Após a retirada do OE em 11 dias de contato direto, a velocidade de crescimento em 50  $\mu$ L foi de apenas 8%, não se distinguindo da testemunha, enquanto a porcentagem de inibição para 100  $\mu$ L e 150  $\mu$ L caiu para aproximadamente 87% (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Cladosporium* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

OE Alecrim								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	32,91 c	0%	0,48 c	0%	20,83 a	0%	0,29 b	0%
50 µL	15,37 b	53%	0,25 b	48%	16,39 a	21%	0,24 b	17,2%
100 µL	6,89 a	79%	0,0 a	100%	15,92 a	24%	0,08 a	72,4%
<b>P valor</b>	1,82x10 <sup>-5</sup>		3,83x10 <sup>-4</sup>		6,66x10 <sup>-1</sup>		1,7x10 <sup>-2</sup>	
OE Louro								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	37,15 b	0%	0,44 b	0%	41,0 c	0%	0,40 b	0%
50 µL	7,92 a	78,7%	0,02 a	95%	11,1 b	73,1%	0,37 b	7,5%
150 µL	7,64 a	79,4%	0,0 a	100%	5,8 a	85,8%	0,15 a	62,5%
100 µL	7,64 a	79,4%	0,0 a	100%	4,9 a	88,0%	0,07 a	82,5%
<b>P valor</b>	2,16x10 <sup>-11</sup>		2,10x10 <sup>-10</sup>		2,16x10 <sup>-9</sup>		2,78x10 <sup>-2</sup>	

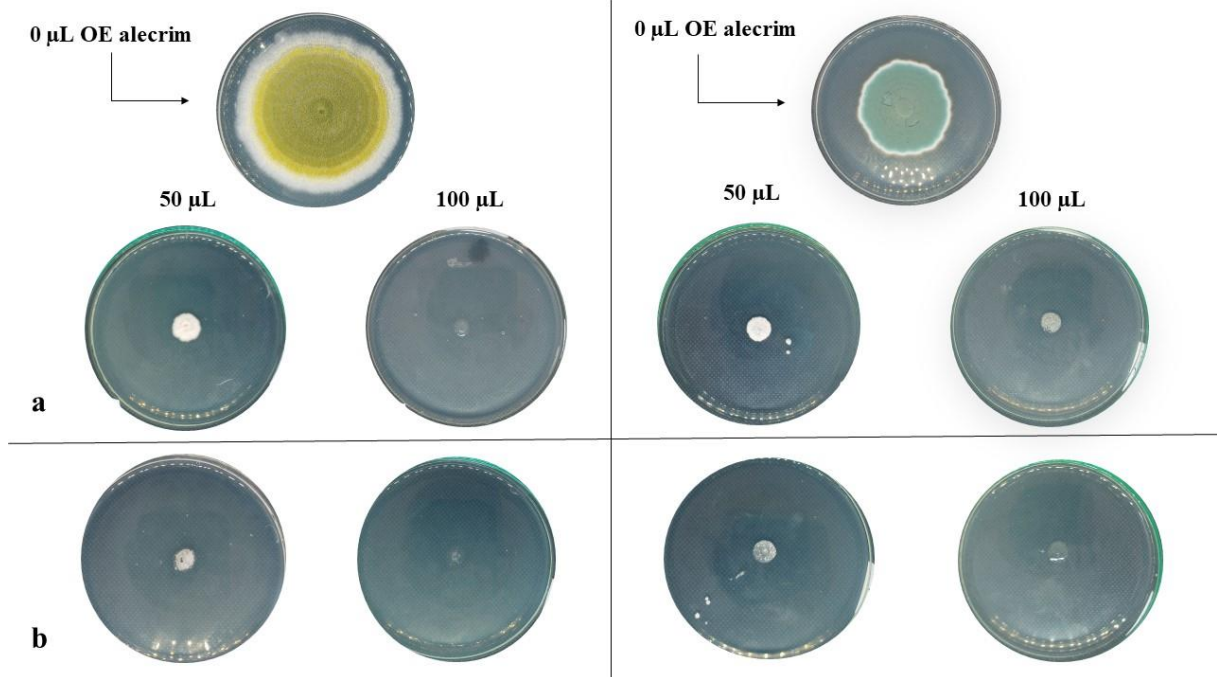
\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)

Fonte: Autora (2023)

Em um estudo onde foi testado o óleo essencial de *Ocimum micranthum* (Alfavaca-de-galinha), cujos compostos majoritários são bastante similares aos dos OEs utilizados no presente trabalho, duas espécies do gênero *Cladosporium* foram inibidas de forma proporcional ao aumento da dose. Para o óleo de *O. micranthum*, a dose mínima de inibição foi de 125 µL, considerado então com forte efeito fungicida (YAGUACHE; RADICE; SCALVENZI, 2018).

Entende-se a importância do gênero *Cladosporium* principalmente na degradação na pós-colheita de diversos produtos. Os OEs de Melaleuca, Menta e Pinheiro foram comparados em sua forma de vapor contra o *C. cladosporioides*, com os efeitos também voláteis de um óleo fungicida. No estudo, as doses variaram de 183 a 669 µL/L e foi possível observar que para esta espécie em específico, houve bastante sensibilidade e maior poder de inibição quando comparado com outros fungos de pós-colheita (SZCZERBANIK *et al.*, 2007).

Figura 29 - Crescimento micelial dos fungos *Aspergillus* sp. (à esquerda) e *Penicillium* sp. (à direita) com as doses de 50 e 100  $\mu$ L de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), comparados aos tratamentos controle respectivos (0  $\mu$ L) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs.



Fonte: Autora (2023).

O óleo essencial de louro foi o mais eficiente na inibição dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (Figuras 29 e 30), com valores de 88 a 100% de inibição para ambos os índices e sem mudanças significativas após a retirada dos algodões contendo o óleo essencial. Para o OE de alecrim, os índices variaram de 79 a 100% para o *Penicillium*, enquanto de 63 a 100% para o *Aspergillus* (Tabelas 10 e 11). Além da alta capacidade de inibição de crescimento para ambas as espécies fúngicas, já a partir da menor dose testada de 50  $\mu$ L, ocorreu a despigmentação das hifas que se desenvolveram.

Tabela 10 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Aspergillus* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

OE Alecrim								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	17,1 b	0,0%	0,49 b	0,0%	8,98 b	0,0%	0,34 b	0,0%
50 µL	6,39 a	62,6%	0,03 a	93,9%	2,49 a	72,3%	0,04 a	88,2%
100 µL	6,39 a	62,6%	0,02 a	95,9%	2,28 a	74,6%	0,0 a	100,0%
P valor	5,15x10 <sup>-10</sup>		6,24x10 <sup>-7</sup>		2,25x10 <sup>-2</sup>		3,03x10 <sup>-2</sup>	
OE Louro								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	28,49 b	0,0%	0,95 b	0%	-	-	-	-
50 µL	6,0 a	78,9%	0,0 a	100%	-	-	-	-
100 µL	6,0 a	78,9%	0,0 a	100%	-	-	-	-
P valor	2,67x10 <sup>-9</sup>		3,25x10 <sup>-9</sup>		-		-	

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)

Fonte: Autora (2023)

Testadas diferentes doses de OE de Alfavaca, o fungo *A. niger* apresentou alta sensibilidade em seu crescimento conforme o aumento da alíquota utilizada, com 63,6% de controle em seu crescimento com 100 µL do óleo. Apesar de similares os compostos majoritários do OE com os óleos testados, com 100 µL ambos os OE de louro e de alecrim obtiveram 100% de inibição no controle do fungo do gênero *Aspergillus* (YAGUACHE; RADICE; SCALVENZI, 2018).

Apesar de no presente estudo o OE de alecrim ter apresentado alta eficiência contra o fungo *Penicillium* sp., em um trabalho realizado por Valcová *et al.* (2021), onde foram testadas diversas alíquotas do mesmo OE em 3 diferentes espécies do mesmo gênero fúngico, não foram obtidos resultados positivos, ou seja, nenhuma quantidade de óleo aplicada por volatilização causou qualquer inibição no crescimento fúngico. Tal fato provavelmente se deve pelas espécies testadas, manipulação do óleo ou época e local de obtenção do óleo.

Tabela 11 - Valores dos índices de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e porcentagem de inibição destes para o fungo *Penicillium* sp., antes e após a retirada do algodão contendo os OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

OE Alecrim								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	31,9 b	0%	2,1 b	0%	21,7 b	0%	2,9	0%
50 µL	8,5 a	73,3%	0,0 a	98,1%	2,7 a	87,6%	0,1	100,0%
100 µL	6,0 a	81,2%	0,0 a	100,0%	2,0 a	90,8%	0,0	100,0%
P valor	3,35x10 <sup>-4</sup>		0,1		4,32x10 <sup>-3</sup>		0,5	
OE Louro								
Tratamento	Antes				Após			
	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)	AACCM	Inibição (%)	IVCM	Inibição (%)
0 µL	13,77 b	0%	0,51 b	0%	13,27 b	0%	0,28 b	0%
50 µL	5,05 a	63,3%	0,02 a	96,1%	3,3 a	75%	0,03 a	89,3%
100 µL	5,0 a	63,7%	0,0 a	100,0%	3,1 a	77%	0,0 a	100,0%
P valor	4,88x10 <sup>-10</sup>		1,37x10 <sup>-8</sup>		1,31x10 <sup>-9</sup>		2,73x10 <sup>-2</sup>	

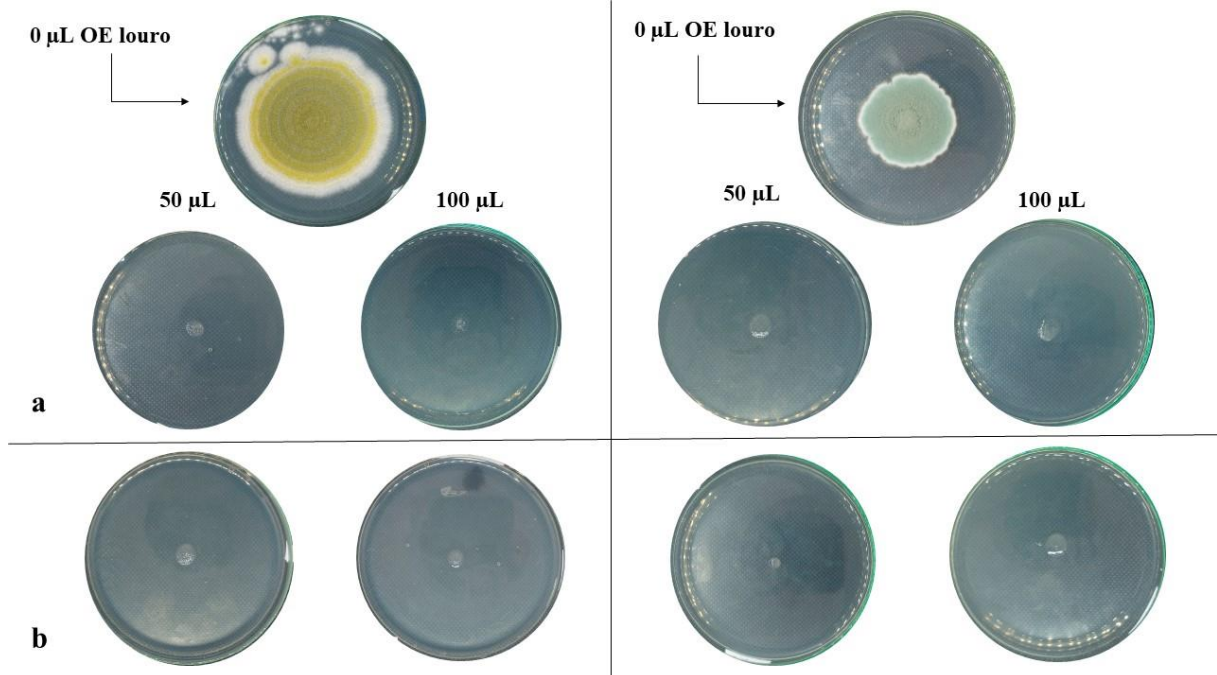
\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (p>5%)

Fonte: Autora (2023)

Yang e Clausen (2007) utilizaram diferentes OEs por volatilização para avaliar o crescimento de fungos degradadores da madeira, dentre eles o óleo de alecrim. Foi constatado que este não surtiu quase nenhum efeito sobre o aparecimento do fungo *Aspergillus* sp., porém causou 100% de inibição sobre os gêneros de *Penicillium* que foram encontrados na testemunha. Além disto, foi avaliada a capacidade de penetração dos compostos voláteis dos OEs e constatado que o tratamento destes sob a superfície não diferiu das demais camadas do material aplicado.



Figura 30 - Crescimento micelial dos fungos *Aspergillus* sp. (a esquerda) e *Penicillium* sp. (a direita) com as doses de 50 e 100  $\mu\text{L}$  de OE de louro (*Laurus nobilis*), comparados aos tratamentos controle respectivos (0  $\mu\text{L}$ ) acima, antes (a) e após (b) a retirada dos algodões contendo os OEs.



Fonte: Autora (2023).

É possível observar pelos resultados obtidos que o uso dos óleos essenciais puros em ambiente controlado por volatilização causou maior letalidade e controle de inibição em todas as espécies fúngicas, quando comparado com o método empregado por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura. Porém o volume de óleo necessário utilizado no presente ensaio foi significativamente maior em relação ao método anterior.

#### 4.4 CONTAGEM DE CONÍDIOS

Logo após o encerramento dos ensaios por volatilização e por incorporação dos óleos essenciais, foi realizada a contagem dos conídios de cada placa por tratamento, e a quantidade encontrada comparada com a quantidade de conídios produzidas pelos tratamentos controle. Após os ensaios fungitóxicos por volatilização, nenhuma das espécies fúngicas produziu conídios com os tratamentos aplicados. Todas as doses testadas com ambos os óleos essenciais foram capazes de inibir 100% da produção total das estruturas.

Os compostos voláteis presentes nos óleos, quando aplicados diretamente nos fungos pelo método de volatilização, apresentam maior intensidade de controle quando comparado

com os efeitos causados pela incorporação dos OE em soluções, e podem causar danos permanentes às paredes celulares. Apesar dos efeitos que os diferentes compostos presentes nos óleos essenciais causam sobre cada espécie fúngica serem variáveis, é consentido que seus constituintes alteram principalmente as propriedades das paredes celulares, como permeabilidade, causando a perda citoplasmática das células e as levando a morte (CAVANNAGH, 2009).

Após os ensaios fungitóxicos por incorporação dos óleos essenciais em meio de cultura, com exceção do *Cladosporium* sp., todas as espécies produziram conídios após os tratamentos. O fungo *Pestalotiopsis* sp., apesar de afetado em crescimento micelial e desenvolvimento das colônias, teve sua produção de conídios estimulada pelos tratamentos de forma proporcional ao aumento das concentrações por incorporação dos óleos essenciais. Com destaque para o tratamento com 1000 ppm de OE de louro, que estimulou em mais de 500% a produção de conídios quando comparado com a testemunha. A única concentração que foi capaz de inibir a produção de conídios para o fungo, foi com 500 ppm de OE de alecrim, com uma diminuição de 26,7% em relação à testemunha.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram significativamente afetados em produção de conídios conforme o aumento das concentrações dos OEs. Os resultados mais expressivos foram com o uso do óleo essencial de louro com as colônias de *Aspergillus*, onde a partir de 200 ppm já houve uma diminuição de aproximadamente 96% na produção, sem diferença estatística entre os tratamentos. Para o OE de alecrim, é possível notar que a porcentagem de inibição dobra, chegando a 100% com 1000 ppm (Tabela 12).

Para o *Penicillium* sp. os tratamentos com maior potencial de inibição em produção de conídios foram os com 1000 ppm, com valores próximos entre os dois OEs. Com 200 ppm, o óleo de louro alcançou uma porcentagem muito maior de inibição do que o OE de alecrim, demonstrando um potencial maior de inibição com menores concentrações (Tabela 12).

Tabela 12 – Porcentagem de inibição de produção de conídios para os fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. conforme o aumento da concentração de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

Concentração dos óleos essenciais	<i>Penicillium</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.	
	Alecrim	Louro	Alecrim	Louro
<b>0 ppm</b>	0 d	0 b	0 c	0 c
<b>200 ppm</b>	15,5 c	80,4 b	49,2 b	95,7 b
<b>500 ppm</b>	73,3 b	83,0 b	95,0 a	97,3 a
<b>1000 ppm</b>	97,3 a	96,2 a	100,0 a	99,2 a

\*Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott ( $p>5\%$ )

Fonte: Autora (2023)

#### 4.5 MÉTODOS DE APLICAÇÃO E TRATAMENTO COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS NOZES-PECÃ

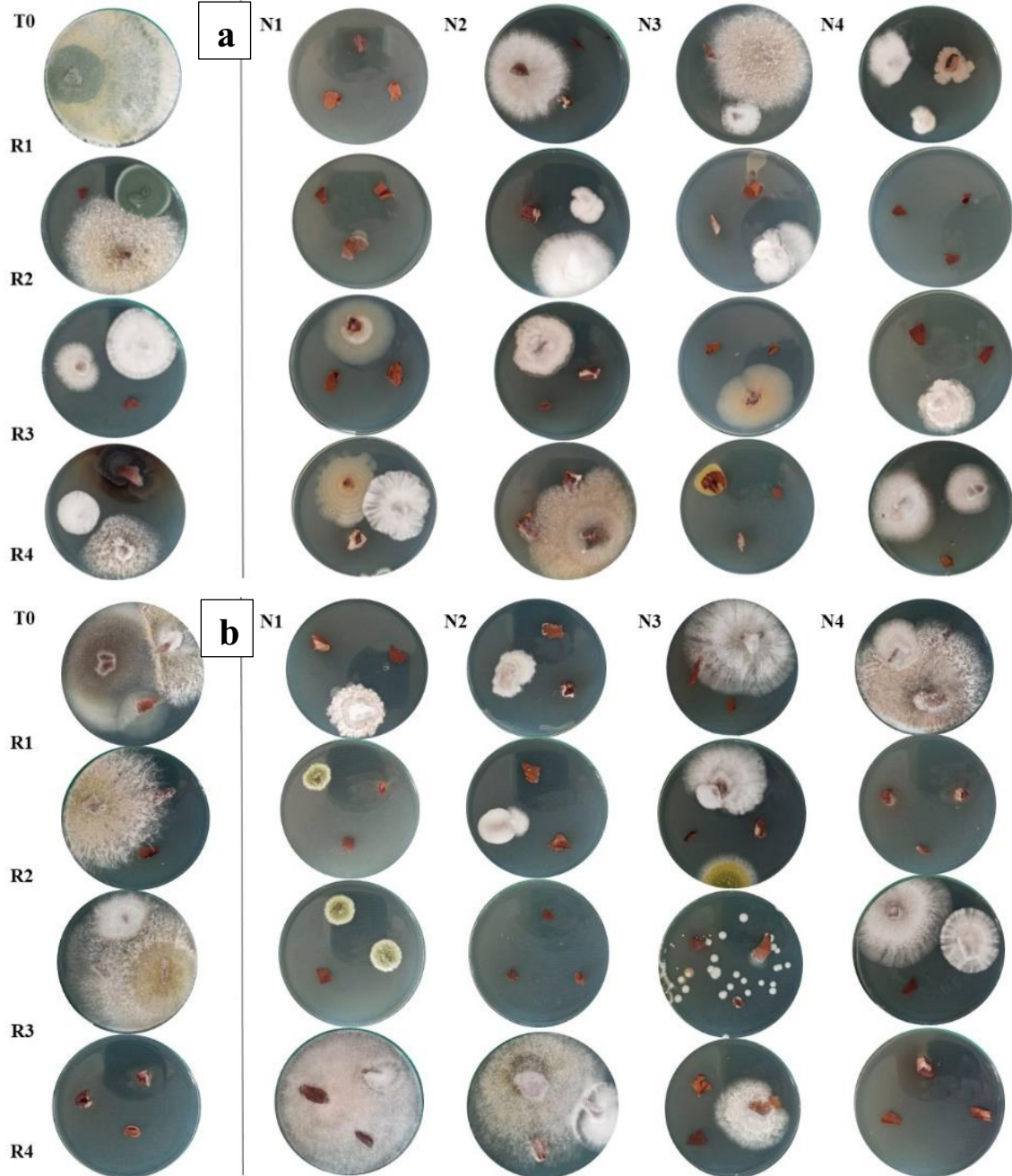
A quantidade de solução necessária para cada método de aplicação foi calculada, resultando em uma média de absorção de 9,3% do total pelo método de imersão das nozes. Pela aplicação por pulverização, não foi possível mensurar a quantidade de solução utilizada, uma vez que a aplicação consumiu menos de 0,5 ml.

De acordo com as 5 nozes amostrais utilizadas para cálculo de teor de umidade antes das aplicações e após, as nozes originalmente contaram com uma média de 4,3% de teor umidade. Após a aplicação por imersão, volatilização e pulverização, o teor de umidade médio encontrado foi de 11,7%, 6,7% e 11,3%, respectivamente. De acordo com Gonçalves *et al.* (2021), a umidade em nozes Pecã acima de 7% pode causar perda de qualidade destas, uma vez que ocorre a absorção de tanino presente na casca pelas amêndoas, tornando seu sabor amargo, além de propiciar a proliferação de agentes degradadores, como fungos e insetos (VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

A quantidade de água presente nas nozes, ou teor de umidade, influencia diretamente na velocidade de reações químicas, físicas e metabólicas, fazendo com que o tempo de prateleira destas seja consideravelmente alterado. Estima-se que TUs acima de 7,5% podem estimular o desenvolvimento de principalmente bolor após 16 semanas, enquanto com 9% apresentam sinais de proliferação fúngica em 4 semanas de armazenamento em temperatura ambiente (GONÇALVES *et al.* 2021; RIBEIRO; BOTH; WAGNER, 2020; VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Ao final dos ensaios, com 15 e 30 dias após os métodos de tratamento, as imagens capturadas em fotografia foram organizadas em pranchas ilustrativas dos resultados obtidos. A partir das Figuras 31, 33, 34, 36, 37 e 39, é possível observar que ocorreu grande aleatoriedade nos resultados visíveis, enquanto alguns fragmentos apresentaram predominância de colônias similares, outros variaram em morfologia das colônias entre os tratamentos e entre as próprias nozes, o que impossibilitou uma análise estatística significativa. Tal fator provavelmente se dá pelo controle anterior às análises, onde o manejo das nozes pelo agricultor variou em controle, assim como pode ter ocorrido a mistura de lotes de nozes de safras mais antigas com a atual de 2022 utilizada, conforme relatado pelo próprio agricultor.

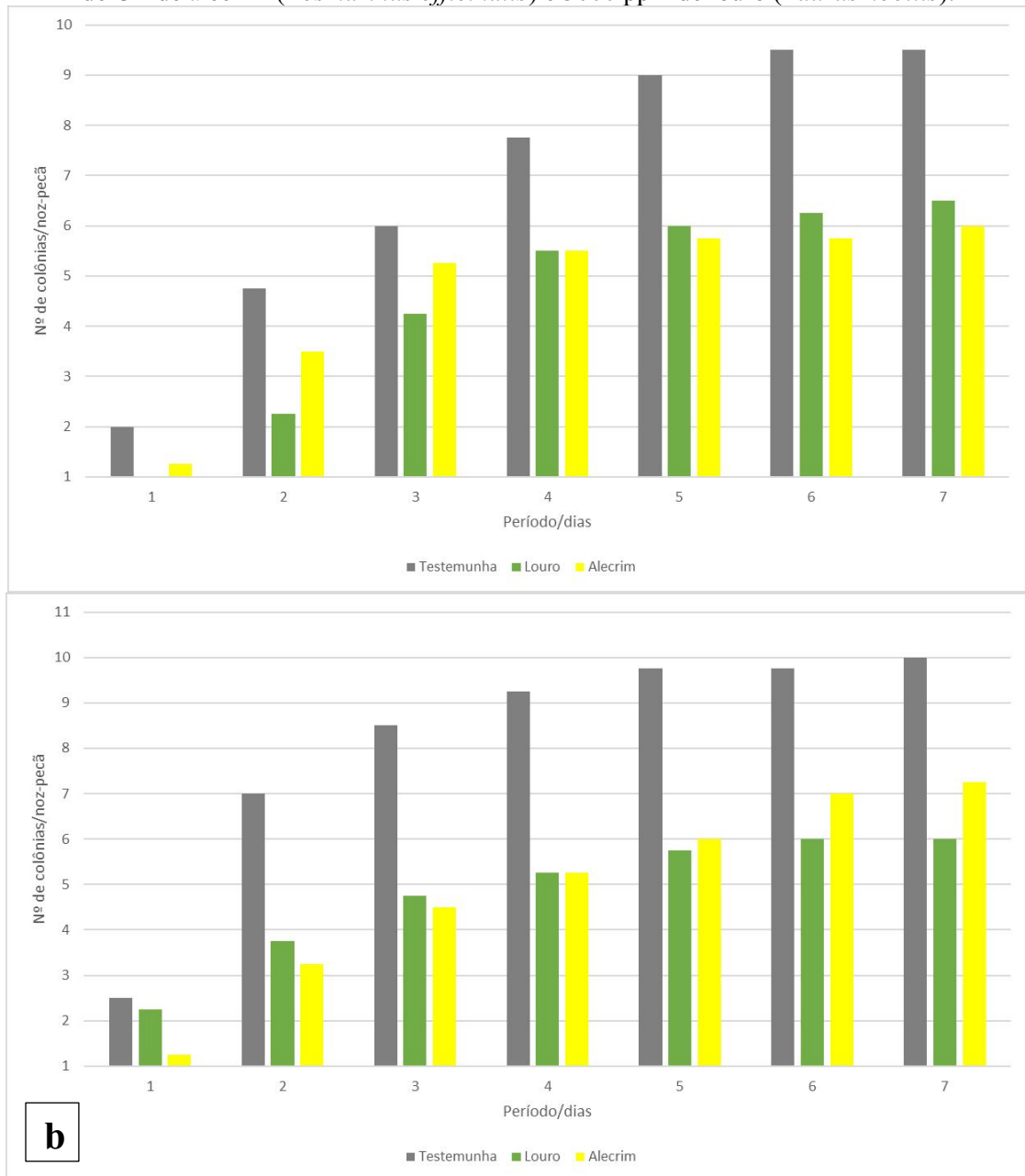
Figura 31 - Prancha ilustrativa do crescimento final das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação por imersão, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes de tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições “R<sub>x</sub>”.



Fonte: Autora (2023).

Como demonstrado na figura 32, o método de aplicação dos óleos essenciais por imersão das nozes em solução com 3000 ppm de cada OE resultou em uma média de aproximadamente 31,6% de número de colônias finais a menos para o tratamento com OE de louro e 36,8% para o OE de alecrim, após 15 dias de tratamento, e após 30 dias uma diminuição de 40% e 27%, respectivamente. Pelo método de aplicação por pulverização (Figura 35), é possível notar que houve um aumento de 11,4% no número de colônias finais para o tratamento com OE de louro e uma diminuição de 8,6% para o OE de alecrim após 15 dias, e após 30 dias, com 18,2% a menos com ambos os tratamentos.

Figura 32 - Número de colônias que se desenvolveram diariamente por noz, após 15 (a) e 30 (b) dias de aplicação por imersão das nozes, de acordo com o tratamento controle com 0 ppm, com 3000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de louro (*Laurus nobilis*).



Fonte: Autora (2023).

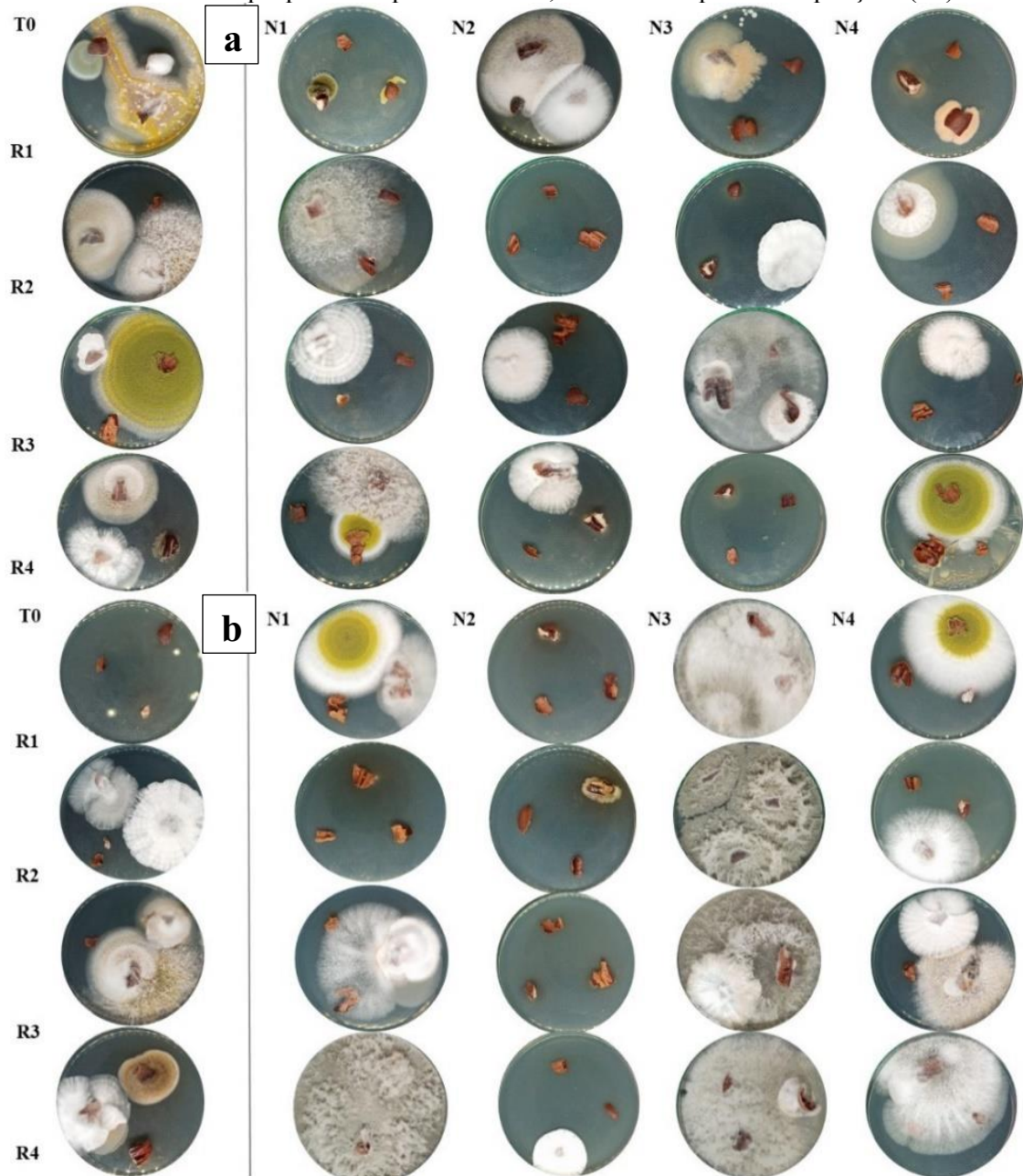
Pelo método de aplicação por volatilização de 200  $\mu$ L dos OEs nas nozes, foi observado (Figura 38) um aumento de 12,1% no número de colônias após 15 dias de tratamento com ambos os óleos e após 30 dias, um aumento de 10% para o OE de louro e uma diminuição de 19,5% para o OE de alecrim.

Assim como relataram Ribeiro *et al.* (2021), o lote inicial testado no presente estudo já contava com um alto índice de contaminação por diferentes tipos de fungos de pós-colheita, assim como demonstram os resultados obtidos pelas testemunhas e em todos os métodos de aplicação testados, mesmo após a assepsia destas, revelando a presença interna e ativa dos fungos nas nozes. De acordo com os autores, as principais espécies contaminantes encontradas foram *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp.

Além dos estudos necessários para se compreender como cada espécie de OE age em cada fungo, o método de aplicação destes é de grande importância, uma vez que pode afetar a eficiência dos óleos e a forma como eles interagem e afetam o produto que está sendo aplicado. A porosidade, densidade, permeabilidade e a composição do material tratado devem ser consideradas quando pensamos em formas de aplicação. Riccioni *et al.* (2019) ao testarem diferentes formas e OEs no tratamento de sementes de grão de bico para consumo humano, constataram que por imersão das sementes, os resultados foram expressivamente mais eficientes no controle do fungo quando comparados a aplicação por pulverização, porém a necessidade de solução para aplicação foi 3 vezes maior, questionando-se assim os custo-benefício do método.



Figura 33 - Prancha ilustrativa do crescimento final das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por imersão, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>).



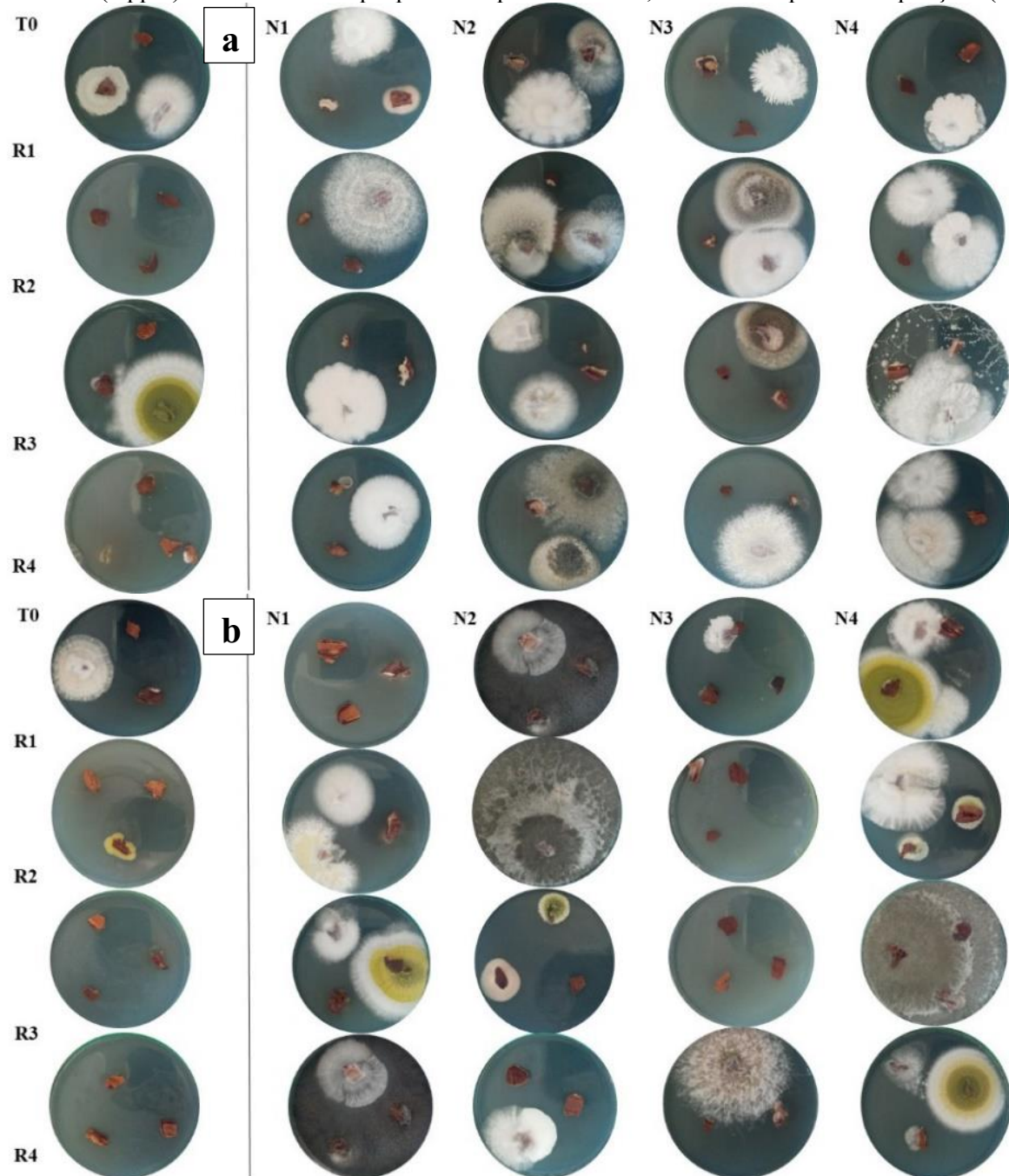
Fonte: Autora (2023).

Além do método de aplicação, o momento em que se faz o tratamento utilizando-se OEs também deve ser levado em consideração ao reproduzir estudos na área. Riccioni *et al.*

(2019) apontaram que a imersão de sementes de grão-de-bico à campo mostrou resultados inferiores quando comparados com os resultados obtidos em laboratório, enquanto Rolli *et al.* (2014) demonstraram que OEs com alto teor de álcoois monoterpênicos e aldeídos podem apresentar uma maior atividade fitotóxica e dependendo do momento de aplicação, causar alelopatia e prejudicar o desenvolvimento de plântulas.

Os estudos sobre métodos de aplicação devem ser voltados diretamente à cada Patossistema de interesse devido ao grande número de variáveis que cada interação entre espécie fúngica e produto a ser tratado apresenta, a fim de se evitar efeitos adversos. A dose, a concentração e a duração dos tratamentos influenciam diretamente nos resultados esperados. Santos (2018), ao realizar a imersão de sementes de feijão em diferentes concentrações de OE de cravo, constatou que quanto maior a quantidade de OE utilizada na solução, menor a germinação das sementes, mas maior o controle de fungos fitopatogênicos.

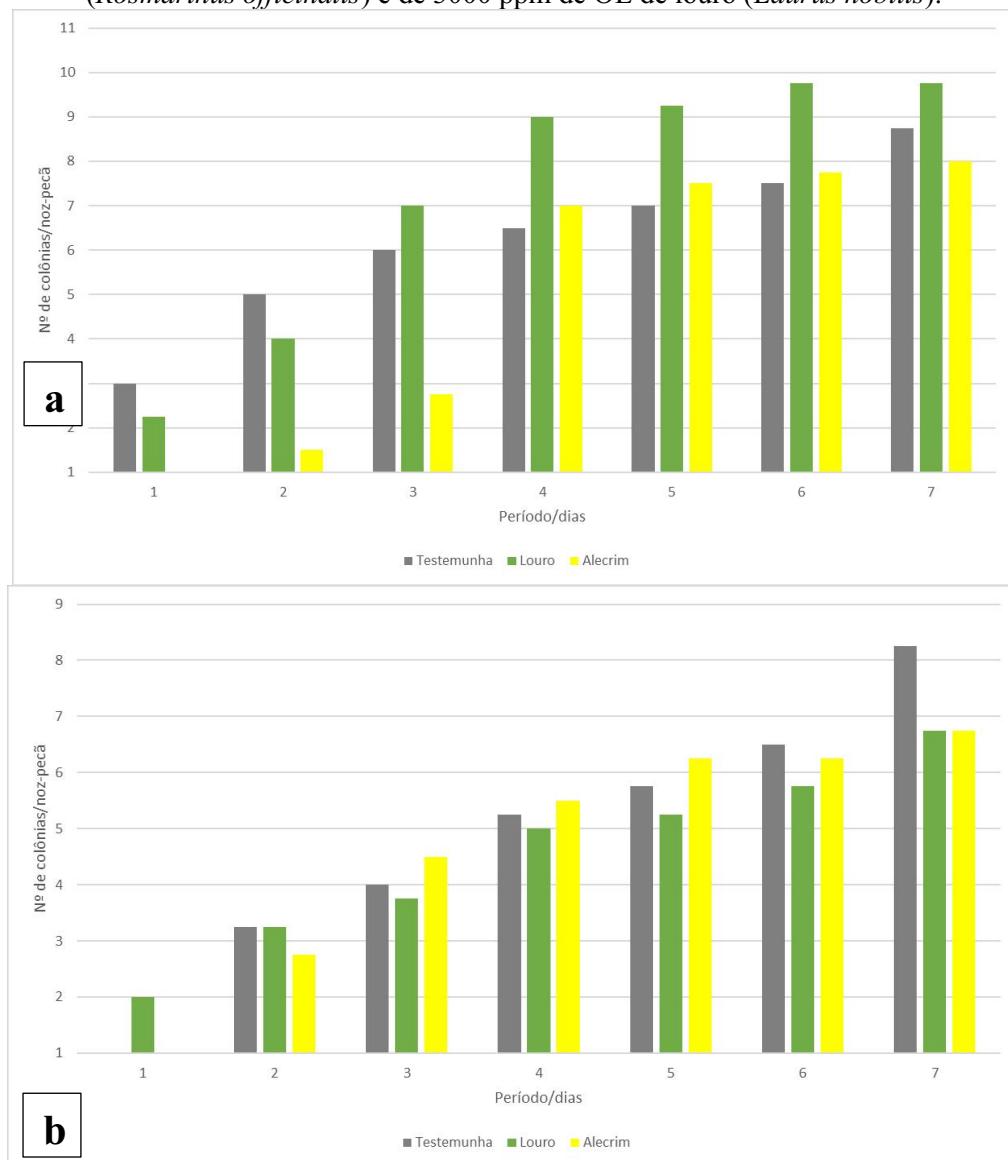
Figura 34 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação dos óleos essenciais por pulverização, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>).



Fonte: Autora (2023).

Apesar de diversos estudos apontarem maior potencial de controle e letalidade aos fungos quando utilizado o método por volatilização de OEs puros em ambientes selados, a fitotoxidez que alguns compostos presentes nestes ficam mais evidentes e podem causar danos ao material vegetal testado, como queimaduras em tecidos mais tenros e crescimento e germinação de mudas. Porém considerando que compostos aromáticos são altamente voláteis, a fitotoxicidade pode diminuir com a exposição dos produtos tratados ao longo do tempo (AJAYI *et al.* 2014; NASCIMENTO, 2021).

Figura 35 - Número de colônias que se desenvolveram por dia após 15 (a) e 30 (b) dias de aplicação por pulverização, de acordo com o tratamento controle e com 3000 ppm de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de 3000 ppm de OE de louro (*Laurus nobilis*).

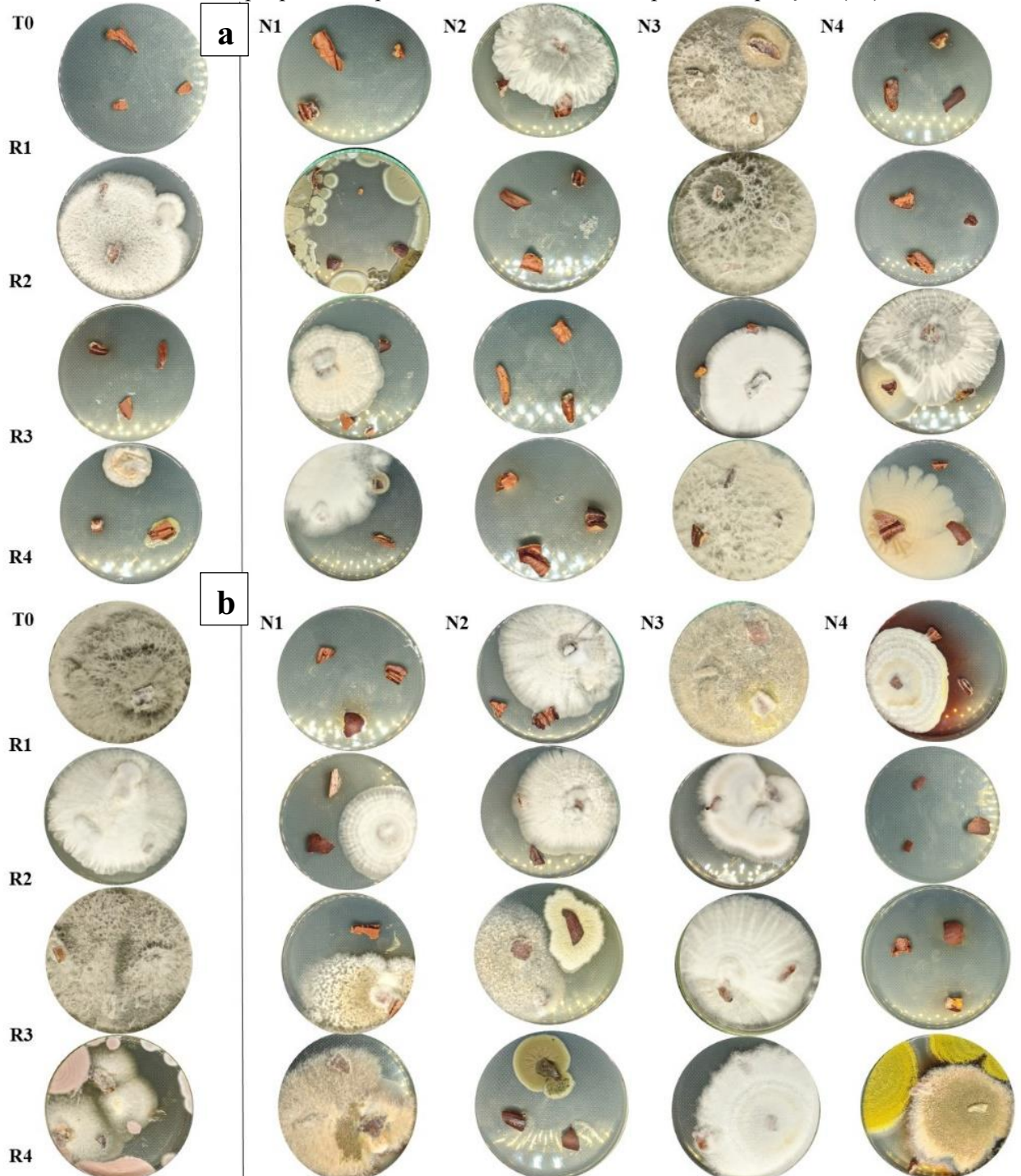


Fonte: Autora (2023)

Assim como no presente estudo, Hillen *et al.* (2012) utilizaram 200  $\mu$ L de OE puro de alecrim, candeia e palmarosa a fim de se testar possíveis efeitos tóxicos dos compostos presentes nos óleos em sementes de feijão, soja e milho. No trabalho, os autores evidenciaram que cada óleo afetou a germinação de formas completamente diferentes de acordo com a espécie vegetal. Portanto existem diversas interações que devem ser consideradas e determinadas antes de se propor um tratamento específico para cada espécie e finalidade do produto final.

O uso de plantas aromáticas e medicinais para a preservação de alimentos é bastante antiga na história humana, dentre as mais conhecidas está o louro, que por possuir alto teor de monoterpenos oxigenados, as folhas da espécie apresentam elevado potencial contra fungos danosos aos alimentos cultivados, com destaque contra as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Santamarina *et al.* (2015) testaram os Oes de louro e de cravo, que são amplamente utilizados na culinária, na preservação durante o armazenamento de arroz e constataram que a eficiência destes contra os fungos de pós-colheita e armazenamento dependeu diretamente do número de dias em que ficou estocado, da dose utilizada e da espécie fúngica.

Figura 36 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por pulverização, com 3000 ppm de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 3000 ppm de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>).

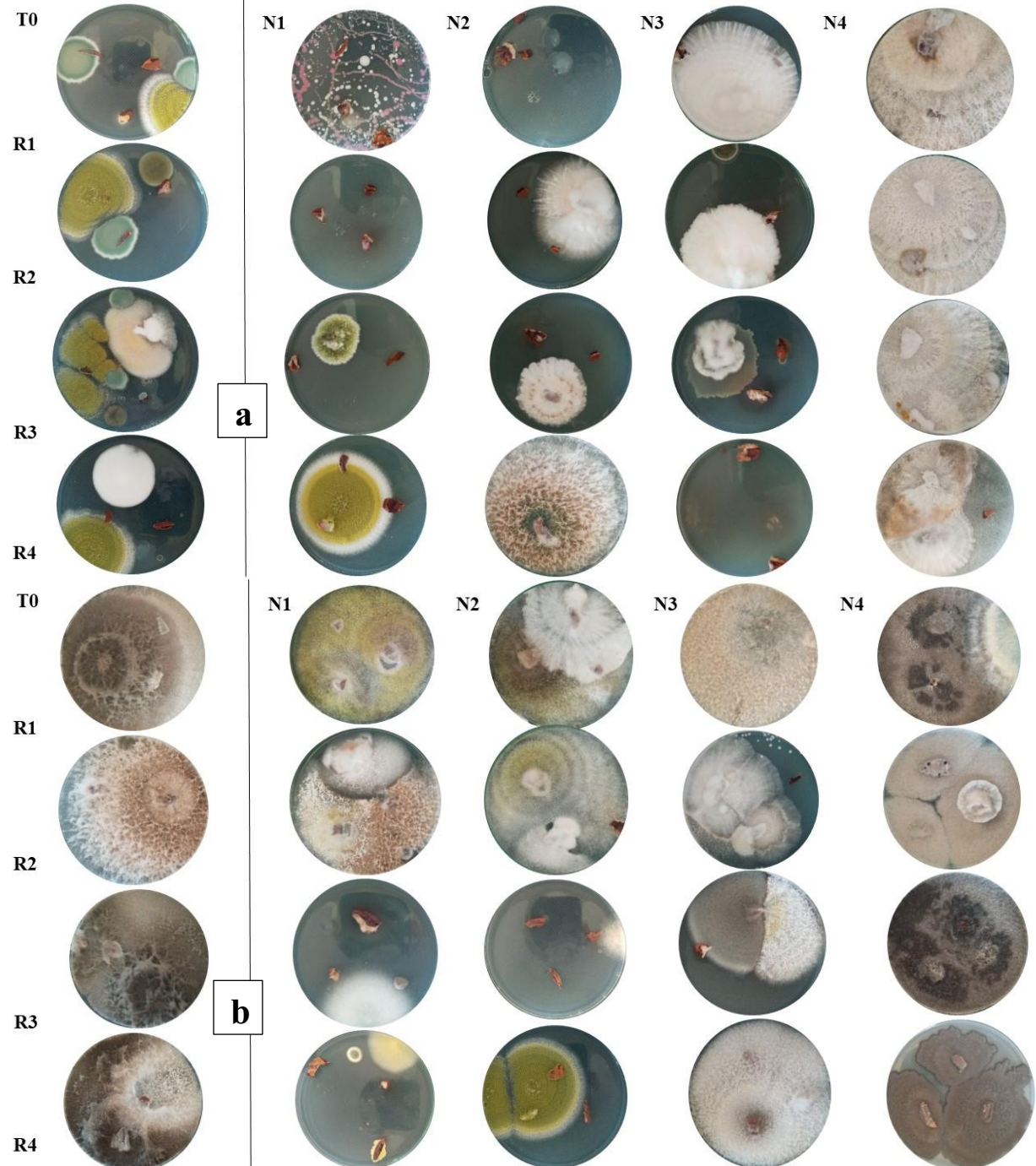


Fonte: Autora (2023).

Dragoni e Vallone (2009) apontam a crescente necessidade e demanda dos consumidores em adquirir produtos fabricados cada vez menos com aditivos químicos, por razões que variam desde escolhas pessoais à novas evidências que surgem, e ressaltam possíveis danos que esses aditivos causam a saúde e ao meio ambiente. Os Oes, portanto, vem se tornando importantes candidatos à substituição destes compostos químicos sintéticos na indústria alimentícia, mas ainda apresentam alguns desafios em relação à possibilidade de alterarem o sabor e aroma de alimentos.

Diferentes tipos de nozes e amêndoas apresentam similares desafios quando a estocagem destas após a colheita é realizada sem acesso à tecnologia de ambientes controlados e manejo adequado, realidade que representa boa parte da cultura da noqueira Pecã que vem crescendo no Brasil. O alto teor de lipídios torna as nozes bastante atrativas a diversos organismos biodegradadores. Lorini, Bonaldo e Mendes (2016) testaram o efeito volátil de diferentes OEs em Castanhas-do-Brasil, dentre eles o óleo de alecrim, a fim de se aumentar o tempo de prateleira contra fungos de pós-colheita. Assim como no presente estudo, as amêndoas foram avaliadas em 2 períodos diferentes após os tratamentos e foi constatado que dentre as espécies testadas, o uso de 100 µL de OE de alecrim estimulou o desenvolvimento de todos os fungos. Portanto é necessário encontrar concentrações que sejam eficientes para diferentes tipos de aplicação.

Figura 37 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 15 dias de aplicação por volatilização de 200  $\mu$ L de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 200  $\mu$ L de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>).

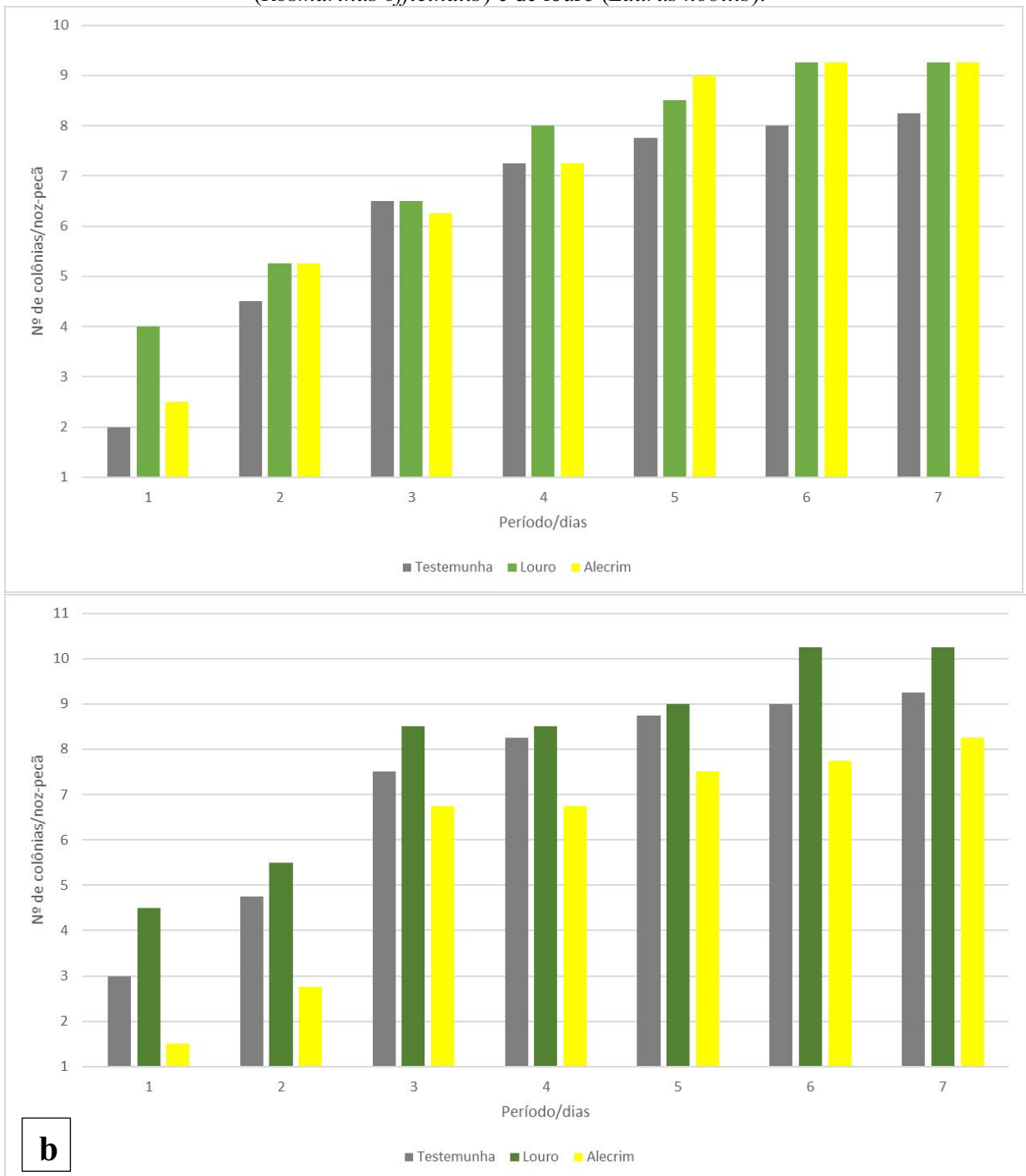


Fonte: Autora (2023).



Vários compostos químicos responsáveis pelos efeitos de controle fúngico são voláteis, portanto, podem se dissipar e perder seu potencial biocida conforme o material tratado é exposto ao ambiente. A partir dos gráficos gerados com os resultados obtidos após 15 e 30 dias dos diferentes métodos de aplicação, é possível observar que quando as nozes foram tratadas por pulverização, a quantidade de colônias detectadas nos fragmentos foi menor com 30 dias de avaliação (figura 42). Nas nozes tratadas por volatilização, a quantidade de colônias por noz se manteve similar em ambos os momentos de avaliação, com uma menor contagem para o tratamento com OE de alecrim após 30 dias (figura 46). No caso da aplicação por imersão das nozes, é visível que os tratamentos com OEs difeririam de forma mais expressiva do tratamento testemunha, com uma média de 5 colônias a menos diariamente.

Figura 38 - Número de colônias que se desenvolveram por dia após 15 e 30 dias de aplicação por volatilização, de acordo com o tratamento controle com 0  $\mu$ L e com 200  $\mu$ L de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de louro (*Laurus nobilis*).

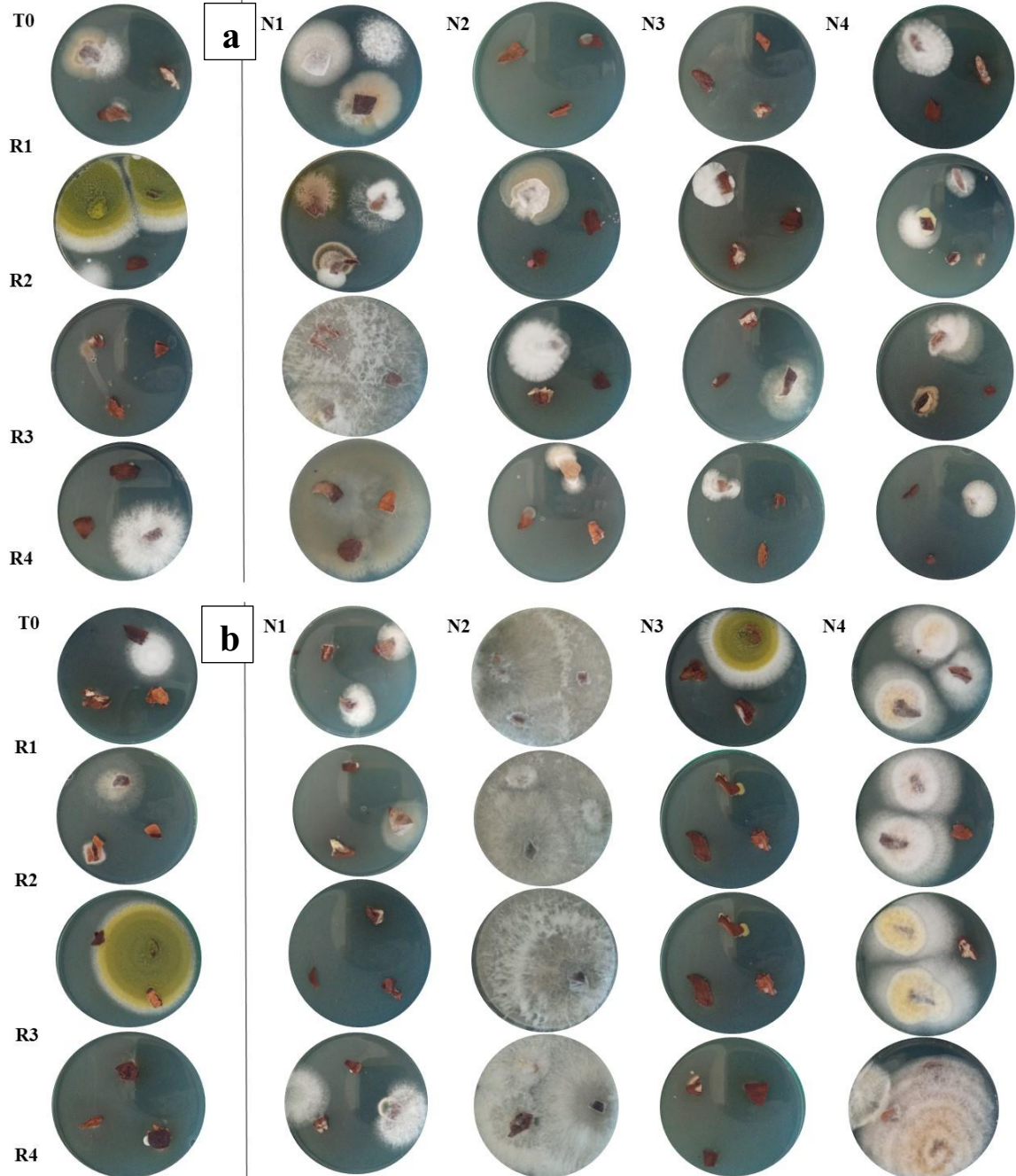


Fonte: Autora (2023).

Em um estudo onde diferentes formas de armazenagem de nozes Pecã foram testadas, a fim de se comparar a porcentagem de proliferação de fungos de pós-colheita antes e após os tratamentos, em nozes provenientes da cultivar Barton, Ribeiro *et al.* (2021) destacaram a maior vulnerabilidade da espécie aos fungos devido à alta porosidade da sua casca e por ficar normalmente em contato com o solo por um período muitas vezes longo. Os autores também detectaram uma alta incidência fúngica antes da aplicação de diferentes tratamentos, mas encontraram diferenças significativas na proliferação destes conforme estocadas em menores temperaturas e atmosfera controlada.

Assim como encontrado no lote de nozes no presente estudo, os gêneros que possuem maior incidência e influência no tempo de armazenagem é o *Aspergillus* e *Penicillium*, ambos que visualmente foram mais expressivos em ocorrência no método de aplicação por volatilização de 200 µL de cada óleo puro, indicando que o controle destes por este método foi menor quando comparado aos outros dois métodos testados (Ribeiro *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.* 2020).

Figura 39 - Prancha ilustrativa do crescimento das colônias fúngicas após 30 dias de aplicação por volatilização de 200  $\mu$ L de OE de alecrim “a” (*Rosmarinus officinalis*) e 200  $\mu$ L de OE de louro “b” (*Laurus nobilis*), onde: coluna “T0” contendo as nozes do tratamento controle (0 ppm) e “N<sub>x</sub>” as nozes que passaram por tratamento, com suas respectivas repetições (R<sub>x</sub>).



Fonte: Autora (2023).

Os métodos de aplicação para preservação de produtos no geral mais empregados são por imersão e por pulverização, técnicas já bastante conhecidas e utilizadas por produtores no geral. Apesar da maior facilidade, sabe-se que o uso de insumos como solução é muito maior do que quando feito o tratamento dos produtos por volatilização. É necessário que se faça uma avaliação econômica para determinação da viabilidade das diferentes técnicas a fim de se concluir qual a mais eficiente. A volatilização de óleos essenciais também depende de um ambiente vedado e controlado, além da relação dos compostos com o volume atmosférico e de produtos tratados.

## 5 CONCLUSÃO

Ambos os óleos essenciais apresentaram um rendimento próximo pelo método de extração empregado, de aproximadamente 1,8%, valor considerado médio a alto em comparação à outras espécies encontradas em literatura.

Os ensaios fungitóxicos *in vitro* demonstraram que cada espécie fúngica foi afetada de forma distinta em todas as concentrações testadas, apresentando maior ou menor sensibilidade aos compostos químicos dos óleos essenciais de alecrim e de louro. A porcentagem de inibição para todos os fungos foi proporcional ao aumento da concentração de óleo essencial incorporada ao meio de cultura, com destaque para o OE de alecrim para os fungos *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., e *Penicillium* sp.

Para os ensaios fungitóxicos por volatilização dos óleos essenciais puros, foi possível observar alta letalidade para todas as espécies. Para o fungo *Pestalotiopsis* sp., 100% de inibição foi alcançada com 40 µl de OE de louro, assim como foi para o fungo *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp. com 50 µl do mesmo. Já para o fungo *Aspergillus* sp., a maior porcentagem de inibição alcançada foi com 100 µl de OE de alecrim. Em todos os casos, após a retirada do algodão contendo o óleo, o desenvolvimento do fungo não se alterou ou diminuiu significativamente, indicando que os OEs foram capazes de causar danos metabólicos permanentes.

Para os testes de formas de aplicação dos óleos essenciais diretamente nas nozes, foi possível observar que a aplicação por imersão causou a maior diminuição na contagem de colônias por nozes, quando comparada com os outros 2 tipos testado, com destaque para a solução contendo 3000 ppm de OE de louro. Porém o método foi o que causou o maior aumento no teor de umidade das nozes.

Apesar do uso de óleos essenciais vir crescendo nos últimos anos, tanto pela demanda por produtos menos tóxicos como pelo manejo alternativo de produtos agrícolas, foi possível identificar em literatura uma grande lacuna entre propostas de pesquisa e a aplicabilidade dos resultados que são gerados. A interação entre fungos e os inúmeros compostos metabólicos que estão presentes nas plantas aromáticas e medicinais ainda traz muitas questões que são essenciais para o desenvolvimento de produtos de origem natural.

## REFERÊNCIAS

ADJOVI, Yann Christie S. *et al.* LAURUS NOBILIS L. A NATURAL ALTERNATIVE AGAINST ASPERGILLUS FLAVUS AND AFLATOXINS. **International Journal Of Development Research**, [s. l], v. 9, n. 5, p. 27692-27697, maio 2019.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Florida: Elsevier, 2005. 922 p.

AGROFIT. **Consulta de Produtos Formulados**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 27 de set. 2023.

AGROLINK. Gazeta do Sul. **RS: projeto para cultivo de plantas bioativas avança na região**. 2021. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/noticias/rs--projeto-para-cultivo-de-plantas-bioativas-avanca-na-regiao\\_447152.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/rs--projeto-para-cultivo-de-plantas-bioativas-avanca-na-regiao_447152.html). Acesso em: 12 ago. 2023.

AJAYI OE, APPEL AG, FADAMIRO HY (2014). Phytotoxicity of some essential oil components to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. **International Journal of Plant Biology & Research**. 2: 1024.

ALFENAS, Acelino Couto; MAFIA, Reginaldo Gonçalves. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. Ufv, 2007. 328 p.

ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Athens, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 25 ago. 2001. American Chemical Society (ACS).  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf001494m>.

ANDRADE, Rodrigo de Oliveira. **Fungicida à base de óleos essenciais combate pragas da cultura de soja**. 2023. Fapesp. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/fungicida-a-base-de-oleos-essenciais-combate-pragas-da-cultura-de-soja/44961>. Acesso em: 06 nov. 2023.

BALLEN, Sandra Cristina *et al.* DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (DPPH) E ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO (*Laurus nobilis*). **Perspectiva**, Erechim, v. 43, n. 163, p. 61-70, set. 2019.

BARNETT, H. L.; HUNTER, Barry B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4. ed. Minnesota: Aps Press, 1998. 240 p.

BELASLI, Azem *et al.* Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.): potential use as wheat preservative. **Food Science & Nutrition**, Tizi-Ouzou, v. 8, n. 9, p. 4717-4729, 23 jul. 2020. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1650>.

BENSCH, K. *et al.* Species and ecological diversity within the Cladosporium cladosporioides complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, v. 67, p. 1–94, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, abr. 2009.

BLÁZQUEZ, M.. Role of Natural Essential Oils in Sustainable Agriculture and Food Preservation. **Journal Of Scientific Research And Reports**, Valencia, v. 3, n. 14, p. 1843-1860, 10 jan. 2014. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/jsrr/2014/11376>.

BOMFIM, Natália da Silva *et al.* Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Maringá, v. 37, n. 1, p. 153-161, 23 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>.

BONINE, Derli Paulo. **Nogueira-Pecã: boas práticas de colheita e pós-colheita**. Encantado: Emater, 2020. 7 p.

BORGES, M. S.; DE MEDEIROS, D. B. **Mapeamento da Cadeia Produtiva da Nogueira Pecã**. XX Mostra de Iniciação Científica, Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão. Caxias do Sul. Universidade Federal de Caxias do Sul. 5 nov. 2020.

BOTH, V.; THEWES, F. R. **Manutenção da qualidade da noz pecan durante longo período após a colheita**. Disponível em: <<https://www.ibpecan.org/post/manuten%C3%A7%C3%A3o-da-qualidade-da-noz-pecan-durante-longo-per%C3%ADodo-ap%C3%B3s-a-colheita>>. Acesso em: 17 set. 2021.

CAPUTO, Lucia *et al.* *Laurus nobilis*: composition of essential oil and its biological activities. **Molecules**, Salerno, v. 22, n. 6, p. 930, 3 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22060930>.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. 1ed. New York: Wiley-Interscience, 1990, 532 p

CAROLLO, E. M.; FILHO, H. P. S. Manual básico de técnicas fitopatológicas. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. BA, 2016.

CAVANAGH, Heather M. A.. Antifungal Activity of the Volatile Phase of Essential Oils: A Brief Review. **Natural Product Communications**, Wagga Wagga, v. 2, n. 12, p. 1297-1302, jul. 2009.

CHAIDECH, Pailin; MATAN, Narumol. Cardamom Oil Vapor Exhibits an Antifungal Mode of Action Against the Post-Harvest Disease-Causing Organism *Pestalotiopsis* Sp. And Preserves Rambutan. **Walailak University**, Walailak, v. 2, n. 4, p. 1-23, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4431556>.

COLLA, Luciane Maria *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, jun. 2008



CORDER, M. P. M; *et al.* Detecção de fungos patogênicos e sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Rev. Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 13-20, jun - jul. 2001.

COSTA, J. S. G. DA; KLUCZKOVSKI, A. M. TECNOLOGIAS DE CONSERVAÇÃO DE NOZES DE ÁRVORES: UMA REVISÃO. p. 425 – 439. *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **Ed. Científica Digital**. 2021.

De CORATO, U., *et al.* Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against postharvest spoilage fungi. **Crop Protection**, Matera, v. 29, n. 2, p. 142-147, dez. 2010.

DE MARCO, R.; LIMA, A. D. V.; MARTINS, C. R. Cultura da noz Pecã para a agricultura familiar: alternativa de diversificação de renda. In: **Alternativas para a Diversificação da Agricultura Familiar de Base Ecológica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018. v. 443p. 25–29.

DERWICH H., BENZIANE Z., BOUKIR A., “Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco,” *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 3, No. 4, 2009, pp. 3818-3824.

FERNANDES, R. C. *et al.* **Óleo essencial de eucalipto para controle pós-colheita de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos “Chimarrita”** 6º **Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense**: Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense. CriciúmaSETIC - Sul, 25 out. 2017.

FERNÁNDEZ, N. J. *et al.* *Laurus nobilis* L. Extracts against *Paenibacillus* larvae : Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi Journal of Biological Sciences*, abr. 2018.

FILIPPINI-ALBA, J. M. *et al.*. **Zoneamento edafoclimático da noqueira-pecã para o Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2020. 65 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 492)

FIORINI, C. *et al.* Composition of the Flower, Leaf and Stem Essential Oils from *Laurus nobilis* L. **Flavour And Fragrance Journal**, Toulouse, v. 12, n. 1, p. 91-93, maio 1997.

FONSECA, M. C. M. *et al.* Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 45–50, 2015.

GARCIA, Carla *et al.* Óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea*: influência na qualidade pós-colheita de uvas ‘rubis’. **Brazilian Journal Of Food Technology**, Botucatu, v. 22, n. 1, p. 1-13, nov. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.17718>.

GONÇALVES *et al.* EMATER. Nogueira Pecã: boas práticas de colheita e pós-colheita. **Jornal da Fruta**. 2020. Disponível em: < <http://www.asbraer.org.br/index.php/rede-de-noticias/item/6164-boas-praticas-de-colheita-e-pos-colheita-garantem-qualidade-para-noz-pecan-no-rs>> Acesso em 5 de out. 2021.

- GONÇALVES, Gabriela Granghelli; MANCINELLI, Renata Carvalho; MORAIS, Lilia Aparecida Salgado de. INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DE CORTE NO RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVAQUINHA E ALECRIM. **Embrapa: Meio Ambiente**, Jaguariúna, v. 27, n. 2, p. 108-112, jun. 2009.
- GRAF JUNIOR, A. L. et al. Óleo essencial das folhas de cataia (*Drimys brasiliensis*) sobre o crescimento micelial de *Alternaria porri*. *Revista Verde*, v. 16, n. 3, p. undefined-8, jul. 2021.
- GUYNOT, M. E., et al. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, Lleida v. 94, p. 893-899, 10 abr. 2003.
- HALFELD-VIEIRA, B. DE A. et al. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2016. 853 p.
- HENDEL, Noui; LAROUS, L; BELBEY, L. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 4, n. 23, p. 1732-1725, jun. 2016.
- HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 14, n. 3, p. 439–446, 12 mar. 2012.
- HUANG, L. H. & HANLIN, R. T. Fungi occurring in freshly harvested and in-market pecans. *Mycologia*, [s. l.], v.67, n.4, p.689–700, 1975
- DRAGONI I.; VALLONE L,. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DELL'OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO NEI CONFRONTI DI SPECIE DI INTERESSE ALIMENTARE. **A.I.V.I.**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 17-20, jun. 2009.
- IBPECAN (Rio Grande do Sul). **Números da safra, união do setor e conjuntura de mercado pautam Abertura da Colheita da Noz pecan**. 2022. Disponível em: <https://www.ibpecan.org/post/n%C3%BAmeros-da-safra-uni%C3%A3o-do-setor-e-conjuntura-de-mercado-pautam-abertura-da-colheita-da-noz-pecan>. Acesso em: 11 jul. 2023.
- INCA (org.). **Agrotóxico**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em: 12 jul. 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). SGI 2.5 – Introdução ao Sistema de Informações Geográficas – SGI. Imagem Geosistemas São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 1995. Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt> Acesso em: 10 de janeiro de 2023.
- JALEL, Sara J.; ABED, Ibrahim J.; JASIM, Aktham N.. Evaluating the biological activity of lemongrass and rosemary essential oils against some fungi isolated from vegetables and fruits. **Journal Of Population Therapeutics And Clinical Pharmacology**, Iraque, v. 30, n. 8, p. 46-54, 1 jan. 2023. SynthesisHub Advance Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.47750/jptcp.2023.30.08.005>.

KODITUWAKKU, Td *et al.* In vitro antifungal efficacy of selected essential oils in controlling fungi associated with the stem-end rot disease of mango (cv. Karutha Colomban) fruits and characterisation of antifungal components. **Journal Of The National Science Foundation Of Sri Lanka**, Sri Lanka, v. 48, n. 2, p. 101-111, 13 out. 2020. Sri Lanka Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.4038/jnsfsr.v48i2.8952>.

LEE, Lundo Tobias *et al.* Fungitoxidade e composição química do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. **Research, Society And Development**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 8, p. 1-16, 29 jun. 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5628>.

LIMA, Cristina Batista de; VILLELA, Tamiris Tonderys. Efeito dos óleos essenciais de alho e laranja e do surfactante Tween® 80 sobre a germinação de sementes de manjeriço. **Rev. Ciênc. Agroamb.**, Bandeirantes, v. 15, n. 2, p. 83-91, jul. 2017.

LORINI, Alexandre; BONALDO, S.M.; MENDES, B.L.. Efeito Volátil de Óleos Essenciais no Desenvolvimento de Patógenos em Amêndoas de Castanhas-do-Brasil. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 2, p. 121-126, 30 jun. 2016. Revista Scientia Agraria Paranaensis (SAP). <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n2p121-126>.

MARANGONI, C. *et al.* Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Rev. Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95–112, 2012.

MARTINS, C. R. *et al.* **Aspectos e Critérios Básicos para Implantação de Pomar de Nogueira-pecã**. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, mai. 2019.

MARTINS, C.; LAZZAROTO, M. Doenças da noqueira-pecã. **Campo e Agronegócio**, v. 19, out. 2019.

MIRI, Yamina Ben *et al.* Prevention by Essential Oils of the Occurrence and Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1 Production in Food Systems: review. **Aflatoxin B1 Occurrence, Detection And Toxicological Effects**, Algeria, v. 4, n. 1, p. 1-18, 3 jun. 2020. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88247>.

MORAES, V. M. *et al.* **MICROBIOTA DE NOZES-PECÃ GAÚCHAS 5º Simpósio de Segurança Alimentar**. Bento Gonçalves. Universidade Federal de Santa Maria, 29 maio 2015..

MORAIS, L. A. S. DE. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. EMBRAPA ed. Jaguariúna: In: BETTIOL, W.;

MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 139-152., 2009.

NASCIMENTO, Daniele Maria do *et al.* Óleos essenciais no tratamento de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 77-90, 2021. Sociedade Brasileira De Fitopatologia. <http://dx.doi.org/10.31976/0104-038321v270004>.

OOTANI, M. A. *et al.* Use of Essential Oils in Agriculture. **J. Biotec. Biodivers.** v. 4, n. 2, p. 162–174, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G *et al.*. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.

PANAGOUE, E. Z. *et al.* Efficacy of hot water, hypochlorite, organic acids and natamycin in the control of post-harvest fungal infection of chestnuts. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61–64, 2005.

POLETTO, T. *et al.* FUNGOS ASSOCIADOS ÀS FLORES E SEMENTES DA NOGUEIRA-PECÃ (*Carya illinoensis*). **Revista de Ciências Ambientais**, p. 5–13, 2014.

PORTE, A.; GODOY, R. L. DE O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193–210, jul. 2001.

Regras para Análises de Sementes. 1. ed. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2009. v. 1

RIBEIRO, S. R. *et al.* Effect of low oxygen on quality attributes of ‘Barton’ pecan nuts after long-term storage at different temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 263, 15 mar. 2020.

RIBEIRO, S. R.; BOTH, V.; WAGNER, R. Congresso Internacional da Agroindústria. 2020. **Estratégias para o armazenamento e manutenção da qualidade da noz pecã após a colheita**. Instituto IDV, Recife. 2020.

RICCIONI, Luca *et al.* Organic seed treatments with essential oils to control ascochyta blight in pea. **European Journal Of Plant Pathology**, Nederlandse, v. 155, n. 3, p. 831-840, 3 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-019-01815-x>.

ROLLI, Enrico *et al.* Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre- and post-emergence development of *Solanum lycopersicum* L.: a multivariate approach. **Industrial Crops And Products**, Parma, v. 60, p. 280-290, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.021>.

ROSS, Ivan A.. *Laurus nobilis* L. In: ROSS, Ivan. A.. **Medicinal Plants of the World: chemical constituents, tradicional and modern medicinal uses**. 2. ed. Nova Iorque: Springer Science, 2001. Cap. 13.

SANTAMARINA, M. Pilar *et al.* Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. **Lwt - Food Science And Technology**, Valencia, v. 65, p. 325-332, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.040>

SANTIBADIA. **Composición del retículo de la cámara de Neubauer**. 2012. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo\\_Neubauer.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg). Acesso em: 19 jul. 2023.

SANTOS, Paula Leite dos. **Manejo de macrofomina phaseolina (tassi) goid. em sementes de feijoeiro (phaseolus vulgaris l.) com óleos essenciais e antagonistas.** 2018. 76 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Proteção de Plantas, Unesp, Botucatu, 2018.

SOLDI, C. **Avaliação preliminar da qualidade/produtividade do óleo essencial de Lavanda sp. cultivada na região do Alto Vale do Itajaí.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005, 39p.

SOLIMAN, F.M. *et al.* Analysis and biological activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Egypt. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, n. 1, p. 29-33, Jan./Feb.1994.

SUTTON, B.C. The Colelomyctes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England, 1980.

SILVA, Lurdes Borges; SILVA, Luiz. Estudo dendrocronológico do loureiro, Autores: uma espécie dominante nos Açores. **Uaciência**, Lisboa, v. 1, n. 2, p. 1-2, dez. 2019

SZCZERBANIK, M. *et al.* Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, Sydney, v. 47, n. 1, p. 103-109, 2007. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ea05236>.

TERABE, N. I.; MARTINS, C. M.; HOMECHIN, M. Comunicação microrganismos associados a frutos de diferentes cultivares de noz pecan. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 2, p. 659–662, 11 abr. 2008.

TESHALE, Frew *et al.* Extraction of essential oil from rosemary leaves: optimization by response surface methodology and mathematical modeling. **Applied Food Research**, Tamil Nadu, v. 2, n. 2, p. 100133, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.afres.2022.100133>.

TOMIć, Ana *et al.* Screening of Antifungal Activity of Essential Oils in Controlling Biocontamination of Historical Papers in Archives. **Antibiotics**, Servia, v. 12, n. 1, p. 103-119, 6 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12010103>.

TSANG, Chi-Ching *et al.* Taxonomy and evolution of Aspergillus, Penicillium and Talaromyces in the omics era – Past, present and future. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, Hong Kong, v. 16, p. 197-210, 23 maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>.

VALKOVÁ, Veronika *et al.* In Vitro Antimicrobial Activity of Lavender, Mint, and Rosemary Essential Oils and the Effect of Their Vapours on Growth of Penicillium spp. in a Bread Model System. **Molecules**, Slovakia, v. 26, n. 13, p. 3859-3875, 24 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26133859>.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54:13, p. 4705-4714 2006. <https://doi.org/10.1021/jf0606959>

YAGUACHE, Bélgica; RADICE, Matteo; SCALVENZI, Laura. Vapor-phase antifungal activity of *Ocimum micranthum* from Ecuadorian Amazon rainforest. **Mdpi Sciforum**, Puyo, v. 1, n. 4, p. 1-4, abr. 2018.

YAN, F., et al. Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipids and possible mechanisms of action. **Journal Science of Food Agriculture**, V. 95, 1469-1474, jul., 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.6845>>. Acesso em: 14 dez. 2023. DOI: 10.1002/jsfa.6845

YANG, Vina W.; CLAUSEN, Carol A. Inhibitory effect of essential oils on decay fungi and mold growth on wood. **American Wood Protection Association**, Birmingham, v. 8, n. 6, p. 62-70, maio 2007.

YILMAZ, Ebru Sebnem; TIMUR, Mahir; ASLIM, Belma. Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 108-116, fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060x.2013.764158>.

WANG, Chunmei; ZHANG, Jie; CHEN, Hao; FAN, Yongjian; SHI, Zhiqi. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology**, Nanjing, v. 35, n. 3, p. 137-143, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762010000300001>.

ZARONI, M. *et al.* Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 29-39, 2004

