



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon citratus*) E ERVA-
CIDREIRA (*Lippia alba*)**

Bárbara Rosceli

**PETROLINA, PE
2018**

BÁRBARA ROSCELI BARBOSA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon citratus*) E ERVA-
CIDREIRA (*Lippia alba*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IF SERTÃO-PE Campus
Petrolina Zona Rural, exigido para a
obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

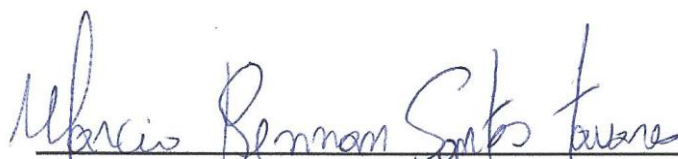
**PETROLINA, PE
2018**

BÁRBARA ROSCELI BARBOSA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon citratus*) E ERVA-
CIDREIRA (*Lippia alba*)**

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado ao IF SERTÃO-PE Campus
Petrolina Zona Rural, exigido para a
obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 06 de Agosto de 2018.



Prof. Msc. Marcio Rennan Santos Tavares
(1º Examinador)



Prof. Dr. Jane Oliveira Perez
(2º Examinadora)



Prof. Dr. Vitor Prates Lorenzo (Orientador)

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	02
2. MATERIAL E MÉTODOS	02
2.1.OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	03
2.1.1. ISOLAMENTO DOS PATÓGENOS.....	03
2.1.1.1. OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO.....	03
2.1.1.1.1. TESTE <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>ALTERNARIA</i> <i>SP.</i>	03
2.1.1.1.1.1. TESTE <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i>	04
2.1.1.1.1.1.1.AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS.....	04
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	05
▪ QUADRO 1 – Taxa de crescimento micelial (mm) de <i>Alternaria</i> sp. submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de erva- cidreira.	06
▪ QUADRO 2 – Taxa de crescimento micelial (mm) de <i>Aspergillus niger</i> submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de erva- cidreira.	06
▪ QUADRO 3 – Taxa de crescimento micelial (mm) de <i>Alternaria</i> sp. submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão.....	07
▪ QUADRO 4 – Taxa de crescimento micelial (mm) de <i>Aspergillus niger</i> submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão.....	07
▪ QUADRO 5 – Média da quantidade de esporos por mililitro dos Fungos.....	08
4. CONCLUSÕES	08
5. AGRADECIMENTOS.....	08
6. REFERÊNCIAS.....	08
6.1.REFERÊNCIAS.....	09
6.1.1.REFERÊNCIAS.....	10

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de capim limão (*Cymbopogon citratus*) e erva-cidreira (*Lippia alba*)

Bárbara Rosceli Barbosa do Nascimento¹, Alysson Lívio Vasconcelos Guedes ², Jéssica de Souza Lima ³, Giovanna Nogueira ⁴ Vitor Prates Lorenzo ⁵

¹ Discente Graduada do Curso de Agronomia, Instituto Federal do Sertão Pernambucano – e-mail: babiross@hotmail.com;

² Msc. Matemática aplicada a Estatística; E-mail: Alysson.livio@ifsertao-pe.edu.br;

³ Doutora em Ciências Agrárias, docente na área de Fitopatologia – IF SERTÃO-PE.

⁴ Técnica de Laboratório, IF SERTÃO-PE – Campus Petrolina Zona Rural; E-mail: giovanna.nogueira@ifsertao-pe.edu.br;

⁵ Orientador do Trabalho, Doutor em Produtos Naturais, docente na área de Bioquímica, IF SERTÃO-PE – e-mail: vitor.lorenzo@ifsertao-pe.edu.br;

^{1,2,3,4,5} IF SERTÃO-PE – Campus Petrolina Zona Rural, PE. 647, Km 22, pisc n- 4, Zona Rural, Cx. Postal 277 - Petrolina – PE – Brasil. CEP: 56.302-970/ Telefone: (87) 2101-8050 / E-mail: cpzr.comunicacao@ifsertao-pe.edu.br;

RESUMO: Os produtos naturais como os óleos essenciais têm apresentado potencial para o controle de fitopatógenos, e um meio alternativo eficiente para a redução do uso indiscriminado de defensivos agrícolas. Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Alternaria* são largamente distribuídos na natureza, são fungos deterioradores comuns em alimentos e plantas. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*) e Erva-cidreira (*Lippia alba*), através crescimento micelial e da esporulação dos fungos *Aspergillus niger* e *Alternaria* sp. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com três repetições, sendo os fatores constituídos por cinco concentrações dos óleos essenciais (C1= 4mg/mL; C2= 8mg/mL; C3= 12mg/mL; C4= 24mg/mL e C5 = 32mg/mL) e testemunha, as avaliações foram realizadas após três dias de inoculação, sendo as medições diárias, do primeiro ao décimo dia de incubação conseguinte. Com base nos resultados obtidos verificou-se redução significativa do crescimento micelial no patógeno *Alternaria* sp. sob as concentrações de 8mg/mL, 12mg/mL, 24mg/mL e 32mg/mL, do óleo essencial de cidreira até o final da avaliação, para o mesmo fungo a maioria das concentrações do óleo de capim limão obtiveram valores de crescimento micelial inferiores ao da testemunha, destacando-se as concentrações 12mg/mL e 32mg/mL ao final da avaliação. Foi verificado que para o fungo *Aspergillus niger* as concentrações do óleo cidreira e capim limão tiveram comportamentos semelhantes retardando inicialmente o desenvolvimento do fungo, no entanto sem efeito significativo no controle do crescimento micelial do patógeno. Com relação ao controle da esporulação para ambos os fungos, todas as concentrações testadas esporularam menos com relação às testemunhas para os dois óleos.

Palavras-chave: Crescimento micelial, Óleos essenciais, Controle fitopatogênico.

In vitro evaluation of the antifungal activity of essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and lemon-balm (*Lippia alba*)

ABSTRACT: Natural products such as essential oils have potential for the control of phytopathogens, and an efficient alternative means for reducing the indiscriminate use of pesticides. The fungi of the genus *Aspergillus* and *Alternaria* are widely distributed in nature, are common deteriorating fungi in food and plants. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of essential oils of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and Lemon-balm (*Lippia alba*), through mouse growth and sporulation of fungi *Aspergillus niger* and *Alternaria* sp. It was used a completely randomized design in a factorial scheme with three replicates, being the factors constituted by five essential oils concentrations (C1 = 4mg / mL, C2 = 8mg / mL, C3 = 12mg / mL, C4 = 24mg / mL and C5 = 32mg / mL) and control, the evaluations were performed after three days of inoculation, with daily measurements, from the first to the tenth day of incubation. Based on the results obtained, there was a significant reduction of mycelial growth in the pathogen *Alternaria* sp., the concentration of 8mg / mL, 12mg / mL, 24mg / mL and 32mg / mL, of the essential oil of lemon balm until the end of the evaluation, for the same fungus the majority of lemon grass oil concentrations obtained lower mycelial growth values and the concentration of 12mg / mL and 32mg / mL at the end of the evaluation. It was verified that for the *Aspergillus niger* fungus the concentrations of lemon balm and lemon grass had similar behavior, initially delaying the development of the fungus, but without a significant effect on the control of mycelial growth of the pathogen. Regarding sporulation the control for both fungi, all concentrations tested sporulated less with respect to the controls for the two oils.

Keywords: Mycelial growth, Essential oils, Phytopathogenic control.

Introdução

A contaminação microbiana pode causar perdas significativas na produção de alimentos. Existe uma grande diversidade de fungos encontrados nas plantas, muitas vezes associados a grãos, frutos e hortaliças, como os das espécies do gênero *Aspergillus* e *Alternaria spp.*, estes podem infectar o produto ainda nas fases de campo ou no armazenamento, podendo possuir muitos hospedeiros intermediários. São principalmente disseminados através do vento, alojados em restos de cultura, água da chuva, ferramentas contaminadas e em grãos mau armazenados, ocasionando prejuízos aos vegetais. (Frisvad et al., 2007; Perrone et al., 2007). Os fungos desses gêneros são agentes contaminantes que afetam a cadeia de produção de varias culturas de importância, muitas vezes produzindo micotoxinas que podem representar perigos a saúde humana e animal. Geralmente o método controle das doenças geradas por esses patógenos está voltado para o uso de fungicidas convencionais (Lee et al., 2008; Bhat et al., 2010; Zain, 2011).

De acordo com (Silva et al., 2010) a utilização continua de agroquímicos na agricultura, como fungicidas sintéticos, tem acarretado uma série de impactos ambientais negativos e danos a saúde humana, consequentemente, têm se elevado a procura por produtos naturais e métodos alternativos eficientes no controle de fungos fitopatogênicos que reduzam ou substituam o uso desses produtos químicos, e que sejam viáveis e seguros.

Algumas plantas medicinais aromáticas apresentam diversas substâncias bioativas provenientes de metabolismo secundário em sua composição química, muitas com potencial fungicida ou fungistático; o que oportuniza a utilização direta de seus óleos essenciais, pelo produtor rural, ou para servir de matéria prima para estudos na formulação de novos produtos (Garcia et al., 2012). O capim limão (*Cymbopogon citratus*) e a erva-cidreira

(*Lippia alba*), são espécies medicinais conhecidas bastante utilizadas pela população brasileira. Sendo plantas herbáceas de pequeno porte, bem adaptadas a ambientes de clima tropical e subtropical, de fácil propagação, produtoras de óleo essencial. Estes óleos apresentam em sua composição química alguns componentes majoritários como o citral, mirceno, geraniol e o limoneno. (Barbosa et al., 2006; Castro et al., 2010; Castro et al., 2003; Guimarães et al., 2011; GUIMARÃES, 2007); (Santos & Inneco, 2004).

A maioria dos óleos essenciais são sistêmicos, podem ser de fácil obtenção e baixo custo, não apresentam toxidez residual, são biodegradáveis e com baixa ou nenhuma fitotoxicidade. (BUTTERWORTH & MORGAN, 1968); (Figueiredo et al., 2008; Ootani et al., 2011).

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*) e Erva-cidreira (*Lippia alba*), através crescimento micelial e da esporulação dos fungos *Aspergillus niger* e *Alternaria sp.*

Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural. A extração dos óleos essenciais foi realizada no LaProNat (Laboratório de Produtos Naturais) e os ensaios antifúngicos foram realizados no laboratório microbiologia situados no campus, as plantas de capim limão e cidreira foram coletadas no campo na horta medicinal, implantada no próprio campus.

Obtenção dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos foi empregado o método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. (Castro et al., 2010), Após o recolhimento de 150 gramas da parte aérea de cada uma das plantas da horta de

plantas medicinais, as folhas foram repicadas e colocadas em balão de vidro, submersas em água destilada até o preenchimento de 2/3 do balão, sendo este conectado ao aparelho de Clevenger; o processo de extração durou três horas sem interrupção até a separação líquida da mistura óleo-água. Os óleos foram coletados em tubos de ensaio, etiquetados e armazenados em freezer.



Fonte: (Bárbara Rosceli, 2018).

Figura 1: Aparelho de Clevenger.

Isolamento dos patógenos

Os fungos *Alternaria* sp. foram isolados a partir de tecidos vegetais de caule de sisal (*Agave sisalana*) e *Aspergillus niger* de bulbos de cebola (*Allium cepa*) comprados comercialmente, que apresentavam sintomas típicos das doenças. Os contaminantes foram isolados diretamente do caule e bulbo dentro de capela, com alça esterilizada transferindo cada fungo para placas de Petri de 90 mm diâmetro com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), incubadas até a formação da colônia; e depois feita às repicagens.

Obtenção da solução padrão

No preparo da solução padrão dos óleos essenciais de cidreira e capim limão, foi pesado em balança analítica 0,1g de cada óleo em seguida diluídos em vidro relógio com o auxílio de pipeta em 2000 μ L de tween 80 a 10% autoclavado, e armazenado em frasco de vidro.

Para definição das diferentes concentrações, fez-se uso da fórmula: $V_a \times C_a = V_b \times C_b$, onde V_a foi a quantidade desconhecida dissolvida, C_a foi a concentração da solução estoque, V_b o volume final requerido, e C_b a concentração diluída que se objetivou preparar. Com os resultados dos volumes calculados de acordo com as porcentagens (C1= 4mg/mL; C2= 8mg/mL; C3= 12mg/mL; C4= 24mg/mL e C5= 32mg/mL) definidos da solução estoque, depositados em eppendorfes, sendo logo em seguida adicionado com pipeta tween 80 a 10% para completar 1000 μ L. As concentrações nos eppendorfes foram etiquetadas e armazenadas em freezer.

Teste *in vitro* de óleos essenciais sobre *Alternaria* sp.

Para avaliar as diferentes concentrações dos óleos de cidreira e capim limão sobre o fungos foram utilizadas cinco (C1= 4mg/mL; C2= 8mg/mL; C3= 12mg/mL; C4= 24mg/mL e C5= 32mg/mL) concentrações e distribuídas 100 μ L em cada placa com pipeta sob a superfície do meio de cultura BDA com auxílio de uma alça tipo Drigalsky. Após a distribuição, foi colocado um disco de 5mm contendo micélios do fungo foi posicionado no centro da placa de petri de 90mm de diâmetro e a testemunha colocou-se apenas um disco do fungo cultivado em meio BDA sem o óleo, foram feitas três repetições de cada tratamento. As placas foram vedadas com filme plástico PVC, identificadas e incubadas em D.B.O (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 26°C \pm 2°C. Depois realizada as medições com o paquímetro manual em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametralmente opostas).

Teste *in vitro* de óleos essenciais sobre *Aspergillus niger*

Para se conseguir um controle uniforme do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* em medições observadas, antes dos testes *in vitro*, preparou-se uma solução gelatinosa de ágar-água a 1% composta por (50ml de água + 1 gota de tween + 0,16g de ágar-ágar), em capela foi adicionada nessa mesma solução

esporos de *A. niger* suspensos no líquido depois homogeneizado por agitação. Depois de adicionada as respectivas concentrações (C1= 4mg/mL; C2= 8mg/mL; C3= 12mg/mL; C4= 24mg/mL e C5= 32mg/mL) dos óleos de capim limão e cidreira isoladamente nas placas de petri com o meio de cultura BDA e espalhados com uma alça tipo Drigalsky, sendo realizadas três repetições de cada tratamento. Com a pipeta foi depositada uma gota da solução formada de ágar-água a 1% com os esporos do fungo, no centro das placas de petri com BDA, sendo a testemunha colocada apenas uma gota da suspensão fúngica sem o óleo. As placas foram vedadas com filme plástico PVC, identificadas e incubadas em D.B.O (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 26°C ±2°C. Foram realizadas as medições do crescimento micelial em dois eixos ortogonais tirando-se a média das duas medidas diametralmente opostas com o paquímetro manual.

Avaliação da capacidade de esporulação dos fungos

Preparou-se a suspensão fúngica dos esporos de *Aspergillus niger* e *Alternaria* isoladamente, adicionando-se as placas de petri, 20 ml de água estéril mais uma gota de tween 80 puro, homogeneizando manualmente com uma alça do tipo Drigalsky até os esporos se desprenderem do meio BDA (batata, dextrose e ágar). Coletou-se 100µL da suspensão fúngica concentrada de esporos com a pipeta correspondente a cada amostra (C1= 4mg/mL; C2= 8mg/mL; C3= 12mg/mL; C4= 24mg/mL e C5= 32mg/mL) e testemunha, colocadas em eppendorf, adicionou-se com a pipeta 900µL de água estéril para cada concentração e para a testemunha. Em seguida foram realizadas duas diluições das amostras, coletando-se os 100 microlitros da amostra inicial (R1D1), para o segundo eppendorf (R2D2) completando com 900µL água estéril, para cada concentração. Os esporos soltos em meio controle foram recolhidos postos em eppendorfs e etiquetados. A contagem dos conídios foi feita em microscópio com câmara de Neubauer, no aumento de 250x e 400x, nos

cinco quadrantes (subcompartimentos) que aparecem na grade. Para determinar o número de conídios utilizou a fórmula a seguir para cada repetição: $\text{Conídios/mL} = \left\{ \left[\frac{\text{Campo 1} + \text{Campo 2}}{2} \right] \times 2,5 \times 10^5 \right\}$ Campo 1 = $(E1+E2+E3+E4+E5)/5$ e Campo 2 = $(E1+E2+E3+E4+E5)/5$. Utilizada a diluição 10².

Todos os dados dos testes avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão. No fator qualitativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, e no fator quantitativo foram ajustadas equações de regressão com base no teste “t” dos coeficientes a 1% de probabilidade e no coeficiente de determinação linear da reta (R²). O programa estatístico usado foi R Core Team (2017).

Resultados e Discussão

De maneira geral quanto às concentrações do óleo de erva-cidreira as amostras que obtiveram valores inferiores no crescimento micelial foram 8mg/mL, 12mg/mL, 24mg/mL e 32mg/mL, para *Alternaria* sp. até décimo dia de avaliação, observados no **quadro 1**. Sendo o nível da porcentagem de controle ao final da avaliação respectivamente 19,35%; 21,29%; 22,60% e 22,48%, com base na testemunha.

Observou-se que à medida que a concentração era aumentada, maior era a redução na taxa de crescimento diária de *Alternaria* sp., do óleo testado.

Para o fungo *Aspergillus* as concentrações 24mg/mL e 32mg/mL de erva-cidreira retardaram inicialmente o crescimento micelial até o 5^a dia de incubação, sendo que no 4^a dia de incubação todas as concentrações se diferenciaram da testemunha, ao final da avaliação não houve diferenciação estatística, a porcentagem de controle correspondeu a 10,91% e 12,35%, respectivamente. *A.niger* foi pouco sensível à ação do óleo, esses valores dispostos no **quadro 2**.

Nos testes *in vitro*, para o fungo *Alternaria* sp. submetido ao óleo essencial de capim limão, apresentado no **quadro 3**, a maioria das concentrações obtiveram valores de crescimento micelial menores que a testemunha

até o 8^a dia de incubação, no final das medições a porcentagem de controle do tratamento de 12mg/mL e 32mg/mL foi 19,63% e 20,72%.

Na presença do óleo de capim limão o desenvolvimento do fungo *A.niger* foi retardado no início dos tratamentos em todas as concentrações observadas até o 4^a dia de avaliação, exceto para testemunha, representado no **quadro 4**. O nível da porcentagem de controle ao final obteve baixa eficiência para esse óleo testado, de 7,47% para a concentração de 32mg/mL, em relação à testemunha.

Os óleos essenciais de capim limão e cidreira apresentaram potencial fungistático retardando o desenvolvimento de *Alternaria* sp. e *Aspergillus niger*, a ação fungistática também foi observada por (Antunes & Cavacob, 2010), segundo estes os compostos ativos dos óleos essenciais podem atuar como agentes fungistáticos ou fungicida, de acordo com as concentrações usadas, um mesmo óleo pode ser ativo contra muitas espécies de microrganismos, no entanto as concentrações inibitórias podem ter variações.

Em *Aspergillus* os óleos avaliados nas concentrações determinadas não apresentaram inibição do crescimento micelial, contudo, é importante considerar que nem todos os óleos essenciais atuam de forma direta sobre o patógeno, rompendo as membranas celulares de hifas e de conídios, podendo este, por exemplo, ter possivelmente possuir efeito indutor de resistência ao atuar diretamente no fruto e na semente, ou na planta ao ativar o sistema de defesa, retardando o aparecimento dos sintomas da doença. Como foram empregadas concentrações menores que 50mg/mL dos óleos capim limão e erva-cidreira, a não redução do diâmetro micelial de *Aspergillus niger* pode ser devido à quantidade insuficiente, nestas concentrações, das substâncias que exerçam atividade antifúngica. Sendo o micélio um conjunto de hifas, outra questão que pode ser analisada é que na morfologia da parede do fungo *Aspergillus niger*, a superfície da matriz extracelular da hifa contém hidrofobinas, pequenas proteínas, que formam películas com faces hidrofílicas e hidrofóbicas, essas

encobrem o micélio aéreo com uma camada impermeável atuando na emergência das hifas aéreas, na diferenciação e formação de estruturas protetoras (Wessels, 1993). A presença destas proteínas pode ter contribuído na sobrevivência do fungo na presença desses óleos, atuando como fator de resistência dificultando a absorção dos produtos. (Van Wetter et al., 2000).

No teste de esporulação foi possível observar que todos os tratamentos para *Alternaria* sp. foram efetivos 4mg/mL, 8mg/mL, 12mg/mL, 24mg/mL e 32mg/mL, o nível respectivo de controle para essas proporções no óleo de erva-cidreira corresponderam a 39%; 53,7%; 62,96%; 73,15% e 89,35%, respectivamente, com o maior nível de controle de (*Alternaria* sp.). Enquanto a porcentagem de controle para o óleo de capim limão foi de 31%; 37%; 46,3%; 51,24% e 64,46%, com base na testemunha. Dentre estas as concentrações que esporularam menos com relação às testemunhas, foram as proporções de 24mg/mL e 32mg/mL, pois apresentaram menor quantidade de esporos por mililitro para ambos os óleos.

As concentrações testadas no fungo *A. niger* também reduziram a produção de esporos em consideravelmente em 4mg/mL, 8mg/mL, 12mg/mL, 24mg/mL e 32mg/mL. O nível da porcentagem controle do fungo submetido ao óleo de erva-cidreira sequencialmente foi 52,74%; 52,66%; 60%; 84,23% e 85,64%. Com o óleo de capim limão para as mesmas concentrações em *Aspergillus niger* a porcentagem controle foi de 31,71%; 32,40%; 61,19%; 67% e 70,23%. Sendo destaque proporções de 24mg/mL e 32mg/mL para os dois óleos testados. Todas as amostras foram ajustadas e passaram por duas diluições. Os óleos tiveram influencia na produção de conídeos afetando a propagação dos fungos atuando como efeito antiesporulante. Bem como foi verificado em outro estudo, por exemplo, de (Itako et al., 2008) que observaram redução da esporulação e germinação de conídios de *Alternaria solani* sob concentração de 20% do extrato bruto aquoso de capim-limão.

Quadro 2 – Taxa de crescimento micelial (mm) de *Alternaria* sp. submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de erva-cidreira.*Alternaria* sp. – Erva-cidreira

Épocas de Avaliação (dias de incubação)										
Concent. mg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	11,99aG	26,83aF	32,32aEF	35,32aDE	41,47aCD	45,72aC	60,76aB	64,60aB	71,77aAB	84,27aA
4	11,32abH	22,96abG	26,50bFG	29,83abEF	33,31bDE	38,42bD	48,35bC	51,11bBC	60,91bAB	71,94abA
8	10,66abF	24,58abE	27,94abDE	32,40abCD	35,71abC	37,55bC	47,30bB	49,99bB	64,51bA	67,97bA
12	11,16abF	22,64abE	26,11bDE	29,94abCD	31,48bCD	34,42bC	44,76bB	46,11bB	62,12bA	66,33bA
24	9,99bG	21,65bF	26,00bEF	29,15bDE	32,00bCD	35,66bC	44,83bB	48,79bB	62,42bA	65,22bA
32	6,32cF	21,98bE	24,99bDE	28,81bCD	31,63bC	33,79bC	41,70bB	44,63bB	58,01bA	65,32bA
Média	10,24	23,44	27,31	30,91	34,27	37,59	47,95	50,87	63,29	70,17

Fonte: Pesquisa direta.

**Letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Quadro 2 – Taxa de crescimento micelial (mm) de *Aspergillus niger* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de erva-cidreira.*Aspergillus niger*. – Erva-cidreira

Épocas de Avaliação (dias de incubação)										
Concent. mg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	10.18 aE	17.82aD	30.80aC	49.13aB	57.91aB	75.49aA	87.16aA	89.00aA	90.00aA	90.00aA
4	6.82bF	15.65abcE	21.81bcD	37.88bC	53.58aB	72.90aA	77.75aA	82.68aA	84.21aA	84.21aA
8	9.19bG	15.79abF	24.13bE	38.81bD	49.23abC	71.95aB	86.49aAB	88.83aAB	89.66aA	89.66aA
12	6.48bF	14.10bcE	25.63bD	39.72bC	53.58aB	73.11aA	82.16aA	84.16aA	86.32aA	86.32aA
24	5.98bE	12.97cD	21.41bcC	37.38bB	41.14bB	69.84aA	76.13aA	77.81aA	80.18aA	80.18aA
32	5.82bF	14.65bcE	19.82cD	36.53bC	51.15bB	66.80aA	76.38aA	78.88aA	78.88aA	78.88aA
Média	7.41	15.16	23.93	39.90	51.09	71.68	81.00	83.53	84.87	84.87

Fonte: Pesquisa direta.

**Letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Quadro 3 – Taxa de crescimento micelial (mm) de *Alternaria sp.* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão.

Alternaria sp. - Capim Limão

Épocas de Avaliação (dias de incubação)										
Concent. mg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	13,03aF	29,16aE	35,16aDE	40,50aCD	45,99aBC	51,16aB	69,50aA	73,30aA	73,16aA	82,79aA
4	11,49abG	23,49bF	27,64bEF	31,00bDE	35,76bCD	40,44bC	54,78bB	56,94bAB	64,04aAB	68,73bA
8	10,99abG	22,50bcF	26,33bcEF	30,50bDE	34,83bCD	38,16bcC	49,82bcB	51,33bcdB	65,33aA	69,98abA
12	9,98bG	23,45bF	25,82bcEF	31,29bDE	34,91bCD	39,14bC	51,82bcB	53,62bcB	61,62aAB	66,54bA
24	5,63cG	19,03cdF	22,22cEF	26,19bcDE	29,88bcCD	32,31cdC	43,80cdB	46,62cdB	61,81aA	70,44abA
32	6,49cF	18,62dE	22,49cDE	24,82cCD	27,15cCD	29,82dC	39,94dB	43,96dB	63,28aA	65,64bA
Média	9,6	22,71	26,61	30,71	34,76	38,51	51,61	54,3	64,87	70,69

Fonte: Pesquisa direta.

**Letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Quadro 4 – Taxa de crescimento micelial (mm) de *Aspergillus niger* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial de capim limão.

Aspergillus niger. – Capim Limão

Épocas de Avaliação (dias de incubação)										
Concent. mg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	10.74aE	18.98aD	33.99aC	42.62aB	60.78aB	75.19aA	83.65aA	86.48aA	89.66aA	89.66aA
4	9.52abE	15.28abD	26.63abC	29.60bC	59.44aB	76.26aA	79.92aA	82.63aA	85.98aA	85.98aA
8	7.65bcF	13.82bcE	21.46bD	25.11bcD	56.83aC	61.99aBC	71.83aBC	79.83aB	82.64aA	82.64aA
12	9.76bD	12.45bcD	23.31bC	28.26bC	56.57aB	72.25aA	81.61aA	84.33aA	86.99aA	86.99aA
24	8.25bE	12.89bcD	21.64bcC	25.06bcC	55.90aB	64.68aA	70.82aA	79.95aA	83.98aA	83.98aA
32	6.98cE	11.26cD	15.07cC	19.92bC	50.30aB	62.83aA	66.94aA	79.40aA	82.97aA	82.97aA
Média	8.81	14.11	23.68	28.42	56.63	68.86	75.79	82.10	85.37	85.37

Fonte: Pesquisa direta.

**Letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Quadro 5 – Média da quantidade de esporos por mililitro dos Fungos.

ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS				
Concentração mg/mL	Alternaria Capim L.	Alternaria Cidreira	Aspergillus Capim L.	Aspergillus Cidreira
	Número de esporos por mililitro			
0	60,5x10 ⁷ a	54x10 ⁷ a	179,75x10 ⁷ a	282x10 ⁷ a
4	41,75 x 10 ⁷ b	33 x10 ⁷ b	122,75 x 10 ⁷ b	133,25x10 ⁷ b
8	38,25x10 ⁷ b	25x10 ⁷ b	121,5x10 ⁷ b	133,5x10 ⁷ b
12	32,5x10 ⁷ b	20x10 ⁷ b	69,75x10 ⁷ c	113,5x10 ⁷ b
24	29,5x10 ⁷ b	14,5x10 ⁷ c	59,5x10 ⁷ c	44,45x10 ⁷ c
32	21,5x10 ⁷ c	5,75x10 ⁷ c	53,5x10 ⁷ c	40,5x10 ⁷ c
Média	37.73	25.37	101.12	124.53

Fonte: Pesquisa direta.

**Letras minúsculas na vertical, não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que para taxa de crescimento micelial, os dois óleos essenciais de erva-cidreira e capim limão, nas concentrações testadas apresentaram ação fungistática. Portanto o óleo essencial de capim limão sob o fungo *Alternaria* sp. foi efetivo nas concentrações 12mg/mL e 32mg/mL, e no óleo de erva-cidreira foram eficientes no controle do crescimento micelial de *Alternaria* sp as concentrações 8mg/mL, 12mg/mL, 24mg/mL e 32mg/mL, empregadas. Para *Aspergillus niger* a ação dos óleos essenciais não mostrou eficiência de controle no crescimento micelial em relação à testemunha nas condições testadas.

Com relação à esporulação para ambos os fungos, em todas as concentrações houve diferença significativa em comparação às testemunhas para os dois óleos. Na esporulação os óleos apresentaram ação erradicante e anti-esporulante.

Os óleos de capim limão (*Cymbopogon citratus*) e erva-cidreira (*Lippia alba*), podem ser uma fonte alternativa, viável e sustentável aos fungicidas sintéticos, no controle de

Alternaria sp., e na esporulação *Aspergillus niger*. Necessitando de mais estudos para maior embasamento de sua efetividade.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por tudo, e a todos aqueles que me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa. Ao IF Sertão-PE Campus Petrolina Zona Rural pela oportunidade.

Referências

- ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 351-366, 2010.
- BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.
- Bhat R, Rai R, Karim A (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:1, p. 57- 82.
- BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, London, v.35, n.1, p.23-24, 1968.

- CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2 p. 308-314, 2010.
- CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. **Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita.** Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.
- CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Principais Gramíneas Produtoras de Óleos Essenciais:** capim-cidrón, *Cymbopogon martinii* (Rox.), palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.). Porto alegre: FEPAGRO, 2003. p 23.
- COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, O. R.R. F.; SUINAGA, F. A. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006a. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 281).
- COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; LUZ, C.M.; SUINAGA, F. A.; SILVA, O.R.R.F. Bole roto of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 6, 2006.
- EMBAPA HORTALIÇAS, Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. Comunicado Técnico, 95. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/960748/1/cot95.pdf>> Acesso em 22 Mar.2018.
- EMBRAPA MEIO AMBIENTE, IV Curso teórico e prático Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf>. Acesso em 21 Mar.2018.
- EMBRAPA MEIO AMBIENTE, Jaguariúna, SP., APARECIDA, LILIA; Óleos Essenciais no Controle de Doenças de Plantas, Article January 2009. RAPP-Volume 17, 2009.
- FIGUEIREDO, AC, BARROSO, JG, PEDRO, LG e SCHEFFER, JC, 2008. Fatores que afetam a produção de metabólitos secundários em plantas: componentes voláteis e óleos essenciais. *Flavor and Fragrance Journal*, vol.23, p. 213 -226.
- Frisvad J, Larsen T, Vries R, Meijer M, Houbraken J, Cabañes F, Ehrlich K, Samson R (2007) Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*. 59, p. 31-37.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, v. 28, p. 48-57, 2012.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. **Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral.** Revista Ciência Agronômica, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.
- GUIMARÃES, L.L. **Tudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de Capim-limão (*cymbopogon citratus* (DC.) stapf.).** p.72, 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras Universidade, Mina Gerais.
- ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; STANGARLIN, J. R.; SILVA CRUZ, M. E. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.
- JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND BIODIVERSITY; Use of Essential Oils in Agriculture. Vol. 4, N.2: pp. 162-174, May 2013.
- KIMATI, HIROSHI. (Coord.) [et al]. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 55p.- 657 p.
- LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I. I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour Fragrance Journal*, v. 23, p. 23-28, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agrofit. www.agricultura.gov.br. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 12 Julho. 2018.
- OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W. S.; MELLO, A. V.; DIDONET, J.; PORTELLA, A. C. F.; NASCIMENTO, I. R. Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 609-618, 2011.
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad J, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson R (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some

important agricultural products. *Studies in Mycology*. 6:59, p. 53-66.

R Core Team (2017), R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em 12 Julho. 2018.

SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura do corte da erva-cidreira brasileira. *Horticultura Brasileira*, v.22, n.2, p.182-5, 2004.

SILVA, A. C. da. *et al.* Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1853 -1860, 2009. Edição Especial.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

Tõfoli, J.G. Domingues R.J, Ferrari J.T., *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281294712_ALTERNARIA_SPP_EM_OLERACEAS_SINTOMAS_ETIOLOGIA_MANEJO_E_FUNGICIDAS>. Acesso em 21 Mar. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS, Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos. Disponível em: <<http://www.uft.edu.br/producaovegetal/dissertacoes/R%C3%9ABIA%20BORGES%20CRUZ%20SARMENTO%20BRUM.pdf>>. Acesso em 22 Mar. 2018.

Van Wetter, M-A.; Wösten, H. A. B.; Sietsma, J. H.; Wessels, J. G. H. 2000. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology* 31: 99-104.

Wessels, J. G. H. 1993. Tansley Review No 45 –Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist*, 123: 397- 413.

Zain M (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal Saudi Chemical Society*. 15:2, p. 129-144.