

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

EDIANE RONCAGLIO BASEGGIO

**ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE  
*Monilinia fructicola* IN VITRO E DA PODRIDÃO PARDA NA PÓS-  
COLHEITA DE PÊSSEGOS**

TESE

PATO BRANCO

2021

EDIANE RONCAGLIO BASEGGIO

**ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE *Monilinia fructicola* IN VITRO E DA PODRIDÃO PARDA NA PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGOS**

**Essential oils and vegetable extracts in the control of *Monilinia fructicola in vitro* and parda rot in the post-harvest of peaches**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Américo Wagner Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Clevison Luiz Giacobbo

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite o download e o compartilhamento da obra desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-la ou utilizá-la para fins comerciais.



Ministerio da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Parana  
Campus Pato Branco



EDIANE RONCAGLIO BASEGGIO

**OLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE  
MONILINIA FRUCTICOLA IN VITRO E DA PODRIDAO PARDA NA POS-  
COLHEITA DE PÊSSEGOS**

Trabalho de pesquisa de doutorado apresentado como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Area de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 22 de Março de 2021

Prof Americo Wagner Junior, - Universidade Tecnológica Federal do Parana  
Prof.a Keli Cristina Fabiane, Doutorado - Instituto Federal Santa Catarina - Ifsc  
Prof.a Maristela Dos Santos Rey, - Universidade Tecnológica Federal do Parana  
Prof.a Paola Mendes Milanesi, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)  
Prof Sergio Miguel Mazaro, - Universidade Tecnológica Federal do Parana

Documento gerado pelo Sistema Academico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 23/ 03/ 2021.

[https://utfws.utfpr.edu.br/aluno05/sistema/mpCADEDocsAssinar.pcTelaAssinaturaDoc?p\\_pessoa=193612&p\\_cadedocpescodnr=6919&p\\_cad...](https://utfws.utfpr.edu.br/aluno05/sistema/mpCADEDocsAssinar.pcTelaAssinaturaDoc?p_pessoa=193612&p_cadedocpescodnr=6919&p_cad...)



À minha família e ao meu Anjo Voador

## AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio, paciência e ajuda em cuidar do Lorenzo. Em especial ao meu filho Lorenzo por entender e aceitar os momentos de ausência da mãe. E o esposo Everton por encorajar a cada dia a lutar pelos sonhos.

Ao meu PAI (*in memoria*) por ser meu porto seguro, sei que onde estás me dá forças e coragem de seguir em frente, mesmo quando o caminho é árduo.

A Deus que sempre ilumina e guia meus passos, e conforta nas horas de desespero.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela oportunidade de realização do curso e desenvolvimento profissional, programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAG) pela aprendizagem.

Ao orientador Dr. Américo Wagner Júnior e coorientador Dr. Clevison Luiz Giacobbo pela dedicação, paciência e ensinamentos não só teóricos e práticos, mas também de vida, hoje se sou uma pessoa melhor devo isso inclusive a vocês.

Ao professor Dr. Sérgio Miguel Mazaro pela disponibilidade e ajuda, assim como Stheffani Lucca da UTFPR – Dois Vizinhos. A Gabriela V. Verde e Eduardo Pritsch – UFFS Chapecó pelo auxílio na execução dos experimentos.

A professora Maristela Rey pelo auxílio na análise das imagens da MEV.

A professora e amiga Paola Mendes Milanesi pelo apoio e parceria de sempre.

Aos meus amigos Rosangela Lima e Pablo Barriga que me acolheram, cuidaram e ajudaram quando estava em Pato Branco. Que nossa amizade perdure até a eternidade.

A todas as pessoas que me ajudaram nessa caminhada nada fácil, mas que me deram uma palavra, um gesto de apoio, uma cama para dormir e as trocas de caronas, não tem como citar nomes por que foram tantas pessoas abençoadas que cruzaram meu caminho, e posso cometer a gafe de esquecer. Só tenho uma palavra para escrever GRATIDÃO.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

## RESUMO

BASEGGIO, Ediane Roncaglio, Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de *Monilinia fructicola in vitro* e da podridão parda na pós-colheita de pêssegos. 156 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2021.

Produtos alternativos para o controle de doenças têm como objetivo substituir os químicos, proporcionando aos frutos mesma qualidade, sem agredir saúde e meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos óleos essenciais, extratos hidroalcoólicos (álcool 70%) e extratos vegetais aquosos a frio e quente de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), alho (*Allium sativum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), losna (*Artemisia absinthium*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e pitangueira (*Eugenia uniflora*) no controle *in vitro* por contato direto e indireto do fungo *Monilinia fructicola* e na pós-colheita aplicados em pêssegos cultivar “Dourado”. Foram realizados dois estudos. No Estudo I avaliou-se os óleos essenciais e extratos vegetais por contato direto e indireto, analisando o crescimento micelial, índice de crescimento micelial, inibição do crescimento micelial, concentração mínima inibitória, concentração fungicida mínima, indução de fitoalexinas, toxicologia dos produtos em *Artemia salina* e microscopia eletrônica de varredura. No Estudo II avaliou-se extratos vegetais e óleos essenciais por contato indireto e direto em pós-colheita de pêssegos, analisando a incidência e severidade da podridão parda nos frutos, além da indução de resistência, com análise das enzimas fenilalanina amônia-liase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo a concentração utilizada para os óleos essenciais 1% e extratos vegetais 10%. No Estudo I contato direto e indireto dos óleos essenciais de alho, cravo-da-índia e orégano; contato direto do extrato frio de alho; extrato quente de alecrim, alho e cravo-da-índia; extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia obtiveram os melhores resultados quanto as avaliações realizadas. No Estudo II, os óleos essenciais de alho por contato indireto e orégano por contato direto apresentaram potencial para controlar a incidência e severidade da podridão parda na pós-colheita de pêssegos. Esses óleos também induziram resistência pela ativação das enzimas FAL e quitinase. Desta forma, os óleos essenciais cravo-da-índia e orégano obtiveram resultados satisfatórios nos Estudos I e II e, se tornam promissores para mais estudos no controle da *M. fructicola*.

**Palavras-chave:** Controle alternativo. Doença. *Prunus persica*. Indução de resistência.

## ABSTRACT

BASEGGIO, Ediane Roncaglio. Essential oils and vegetable extracts in the control of *Monilinia fructicola* *in vitro* and parda rot in the post-harvest of peaches. 156 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology – Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2021.

Alternative products for disease control aim to replace chemicals, providing fruits with the same quality, without harming health and the environment. The objective of this work was to evaluate the potential of essential oils and hydroalcoholic extracts (70% alcohol) and hot and cold aqueous plant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), garlic (*Allium sativum*), cloves (*Syzygium aromaticum* L.), wormwood (*Artemisia absinthium*), oregano (*Origanum vulgare* L.) and Surinam cherry (*Eugenia uniflora*) in the *in vitro* control by direct and indirect contact of the fungus *Monilinia fructicola* and in the Dourado peach variety post-harvest. Two studies were carried out. In Study I, essential oils and plant extracts were evaluated by direct and indirect contact, analyzing mycelial growth, mycelial growth index, inhibition of mycelial growth, minimum inhibitory concentration, minimum fungicidal concentration, phytoalexin induction, toxicology of products in *Artemia salina* and scanning electron microscopy. In Study II, plant extracts and essential oils were evaluated by indirect and direct contact in post-harvest peaches, analyzing the incidence and severity of brown rot in fruits, in addition to resistance induction, with analysis of the enzymes phenylalanine ammonia lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. The experimental design was completely randomized, with the concentration used for essential oils 1% and plant extracts 10%. In Study I direct and indirect contact with essential oils of garlic, cloves and oregano; direct contact of the cold garlic extract; hot extract of rosemary, garlic and cloves; hydroalcoholic extract of garlic and cloves obtained the best results regarding the evaluations performed. In Study II, the essential oils of garlic by indirect contact and oregano by direct contact had the potential to control the incidence and severity of brown rot in the post-harvest of peaches. These oils also induced resistance by activating the enzymes FAL and chitinase. Thus, clove and oregano essential oils obtained satisfactory results in Studies I and II and are promising for further studies in the control of *M. fructicola*.

**Keywords:** Alternative control. Disease. *Prunus persica*. Resistance induction.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Ciclo do fungo <i>Monilinia fructicola</i> .....	22
<b>Figura 2</b> - Cabeça e área torácica de náuplio de <i>Artemia salina</i> após 96 horas: (a) olho náuplios; (b) olho complexo lateral; (c) antenas; (d) antena; (e) aparelho digestivo. ....	39
<b>Figura 3</b> – Pêssego com podridão parda (A). Visualização <i>M. fructicola</i> microscópio óptico (B). Esporos de <i>M. fructicola</i> (C). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	45
<b>Figura 4</b> - Diagrama confecção dos extratos vegetais. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	49
<b>Figura 5</b> – Placa com tratamento por contato direto (A). Placas com tratamento por contato indireto (B). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Escala de avaliação de tratamentos. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2021. ....57
- Tabela 2** - Escala da severidade da doença causada pelo fungo *M. fructicola* em pêssegos. ....60
- Tabela 3** - Identificação (possível composto) e quantificação de compostos fenólicos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato). ....62
- Tabela 4** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....71
- Tabela 5** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de preparados com água fria (extrato frio) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....72
- Tabela 6** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de preparados com água quente (extrato quente) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....73
- Tabela 7** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de preparados com álcool (extrato hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....74
- Tabela 8** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....76
- Tabela 9** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....77
- Tabela 10** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....78
- Tabela 11** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....78
- Tabela 12** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água

quente (extrato quente) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	80
<b>Tabela 13</b> - Inibição (%) do crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	80
<b>Tabela 14</b> - Inibição (%) do crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	81
<b>Tabela 15</b> - Inibição (%) do crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	82
<b>Tabela 16</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	83
<b>Tabela 17</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	84
<b>Tabela 18</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	86
<b>Tabela 19</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	86
<b>Tabela 20</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	87
<b>Tabela 21</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato indireto (CI).	

UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	88
<b>Tabela 22</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	89
<b>Tabela 23</b> - Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> , após dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	89
<b>Tabela 24</b> - Concentrações inibitória mínima (MIC) (%)* e fungicida mínima (CFM) (%) dos óleos essenciais e extratos vegetais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água contra <i>Monilinia fructicola</i> in vitro. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	90
<b>Tabela 25</b> - Indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por meio da aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais (frio, quente e hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água, avaliado pela absorvância de 285nm. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	95
<b>Tabela 26</b> - Taxa de mortalidade (%) de <i>Artemia salina</i> em relação a toxicidade de diferentes tratamentos oriundos de cada tipo de extração, após 24 h. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	96
<b>Tabela 27</b> - Média dos experimentos realizados, conforme tipo de extração (óleo essencial: OE; EF: extrato frio; EQ: extrato quente; EH: extrato hidroalcoólico) e aplicação (CD: contato direto e CI: contato indireto). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	98
<b>Tabela 28</b> - Incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com <i>M. fructicola</i> . (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	99
<b>Tabela 29</b> - Severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com <i>M. fructicola</i> . (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ...	100
<b>Tabela 30</b> - Incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com <i>M. fructicola</i> . (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	102
<b>Tabela 31</b> - Severidade (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com <i>M. fructicola</i> . (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.	

.....	103
<b>Tabela 32</b> - Teor de proteína (mg g <sup>-1</sup> tecido) presente em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	104
<b>Tabela 33</b> - Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Uabs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> x 10 <sup>-2</sup> ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. ....	104
<b>Tabela 34</b> - Atividade da enzima quitinase (U.E mg <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata-dextrose-ágar
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CD	Contato direto
Cfa	Clima subtropical e úmido
CI	Contato indireto
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CM	Crescimento micelial
CV	Coefficiente de variação
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EF	Extrato frio
EH	Extrato hidralcoólico
EQ	Extrato quente
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EV	Extrato vegetal
FAL	Fenilalanina amônia-liase
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
ICM	Inibição do crescimento micelial
IFG	Índice fitoalexina gliceolina
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
m	Metro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standart
OE	Óleo essencial
Proteínas PR	Proteínas relacionadas à patogênese

PVC	Policloreto de polivinila
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RLA	Resistência Local adquirida
RSA	Resistência sistêmica adquirida
RSI	Resistência sistêmica induzida
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
2.1	INTERAÇÃO <i>Prunus persica</i> x <i>Monilinia fructicola</i> .....	20
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS UTILIZADOS EM CONTATO DIRETO E INDIRETO NO CONTROLE DE PATÓGENOS .....	27
2.3	PLANTAS COM POTENCIAL INIBIDOR DO DESENVOLVIMENTO DE PATÓGENOS .....	31
2.4	INDUÇÃO DE FITOALEXINAS COM EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
2.5	AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS EM <i>Artemia salina</i> .....	38
2.6	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA .....	39
2.7	RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA.....	40
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
3.1	ESTUDO I – ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS <i>IN VITRO</i> : INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E TOXICOLOGIA .....	45
3.1.1	Culturas de Fungos e Produção de Conídios .....	45
3.1.2	Análise Molecular .....	46
3.1.3	Obtenção dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais e análise cromatográfica 47	
3.1.4	Efeito dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais Sobre o Crescimento Micelial de <i>M. fructicola in vitro</i> .....	50
3.1.5	Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos Óleos Essenciais e Extrato Vegetais a <i>M. fructicola</i> .....	52
3.1.6	Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais a <i>M. fructicola</i> .....	53
3.1.7	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
3.1.8	Óleos Essenciais e Extratos Vegetais na Indução de Fitoalexina Gliceolina em Cotilédones de Soja.....	54
3.1.9	Toxicologia de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais em <i>Artemia salina</i> ..	55
3.1.10	Ranking de tratamentos .....	56
3.2	Estudo II – AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGOS .....	57
3.2.1	Incidência e Severidade de Podridão Parda em Pêssegos Tratados com Óleos Essenciais e Extratos Vegetais.....	57
3.2.2	Análises Bioquímicas .....	60
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>



4.1 Estudo I - ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS <i>IN VITRO</i> , INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E TOXICOLOGIA.....	62
4.1.1 Análise Molecular.....	62
4.1.2 Cromatografia.....	62
4.1.3 Óleos Essenciais e Extratos Vegetais sobre o Crescimento Micelial de <i>M. fructicola in vitro</i> 64	
4.1.4 Inibição do Crescimento Micelial (ICM).....	75
4.1.5 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM).....	83
4.1.6 Concentração Mínima Inibitória (MIC) Concentração fungicida mínima (CFM) dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais a <i>M. fructicola</i> .....	90
4.1.7 Microscopia Óptica e Varredura.....	91
4.1.8 Óleos Essenciais e Extratos Vegetais na Indução de Fitoalexina Gliceolina em Cotilédones de Soja.....	95
4.1.9 Toxicologia de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais em <i>Artemia salina</i> ..	96
4.1.10 Ranking de tratamentos .....	98
4.2 Estudo II – AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGOS .....	99
4.2.1 Incidência e Severidade de Podridão Parda em Pêssegos Tratados com Óleos Essenciais e Extratos Vegetais e Análises Bioquímicas.....	99
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>107</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS .....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O pessegueiro é originário da China, sendo introduzido no Brasil, no Estado de São Paulo, por Martins Afonso de Souza. Por ser cultura de clima temperado se adaptou nessa região, mas foi nos Estados do Sul que encontrou as melhores condições para sua expansão, principalmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (MADAIL; RASEIRA, 2008).

Apesar dos pomares de pessegueiro estarem se difundindo para outros Estados do país, cujas temperaturas são mais elevadas, a área de cultivo diminuiu 23,6% comparando-se os anos de 2007 e 2017, mas houve crescimento na produção de 33,7% (FAOSTAT, 2020).

Todavia, mesmo com tal redução da área, a produtividade tem se mantido, o que pode ser atribuído a seleção de materiais genéticos dentro dos programas de melhoramento e a melhoria da capacidade produtiva das plantas, associado às técnicas de manejo e controle, permitindo que esta fruteira se expandisse para condições de clima mais ameno.

A implantação de pomares em locais com temperaturas e umidade mais elevadas, tende a aumentar a incidência de doenças, principalmente a podridão parda, considerada como uma das doenças fúngicas mais severas de ocorrência mundial, causando perdas quantitativas e qualitativas, tanto em pré quanto em pós colheita de pêssegos (MARTINS et al., 2005).

A podridão parda pode ser causada por três espécies de fungos, *Monilinia fructicola*, *M. laxa* e *M. fructigena*. A *M. fructigena* é encontrada na Europa, *M. laxa* na Europa e em 2008 teve o primeiro relato no Brasil (SOUZA et al., 2008), enquanto que a *M. fructicola* na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia, Japão e Brasil (PONIATOWSKA; MICHALECKA; BIELENIN, 2013), tendo esta última maior taxa de crescimento e agressividade e, maior prevalência no país (VILLARINO; MELGAREJO; DE CAL, 2016).

A podridão parda [*M. fructicola* (Wint) Honey] ataca as partes aéreas do pessegueiro, causando sintomas como pardeamento e morte das flores, com os esporos ficando aderentes ao pedúnculo por tempo indeterminado (GARRIDO; SÔNEGO, 2003). Estes podem ser disseminados pelo vento, chuva e insetos (MAY-DE-MIO; GARRIDO; UENO, 2004). Quando os frutos infectados são deixados na

planta se desidratam e mumificam ou caem ao solo permanecendo por todo o inverno, liberando os conídios que formam o inóculo primário na primavera (AGRIOS, 1997; FORTES; MARTINS, 1998).

Ainda não existem cultivares de pessegueiro resistentes a podridão parda, principalmente, em condições ideais para desenvolvimento do fungo (WAGNER JÚNIOR, 2003). Assim, o controle desta doença tem se intensificado basicamente com o emprego de produtos sintéticos devido a sua eficiência em pré e pós-colheita. No entanto, a utilização indiscriminada está se mostrando ineficiente, devido ao surgimento de cepas de fungos resistentes já que diversos organismos começaram a desenvolver resistência aos vários fungicidas (LOPEZ-REYES et al., 2013).

Além disso, a necessidade crescente da demanda por produtos mais saudáveis instiga estudos com novas formas de controle da doença surgindo como alternativa produtos como óleos essenciais (OE) e extratos vegetais (EV) eficientes que podem ter ação direta sobre o patógeno ou ativar mecanismo de defesa nas plantas. Porém, além da eficiência é imprescindível que seja comprovado a baixa toxicidade à saúde humana e ao agroecossistema (SILVA et al., 2010).

Esses produtos alternativos quando aplicados em plantas ou frutos na pós-colheita são denominados eliciadores, pois podem induzir a resistência contra determinados patógenos. Estes indutores ativam mecanismos de defesa que estavam até então de forma latente, ou seja, as plantas após a exposição ao agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados, não somente no local da infecção, mas também distante deste, conferindo assim a resistência sistêmica adquirida (RSA) (PASCHOLATI, 2011).

Os OE e os EV são indutores abióticos, contendo compostos do metabolismo secundário das plantas com atividade biológica que auxiliam no processo de indução de resistência. Estes possuem atividades contra fitopatógenos devido à presença de compostos que demonstram atividade fungitóxica, fungicida e/ou fungistática, que inibem e/ou retardam o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos, além de possuírem ação como indutores de resistência, ativando nas plantas o metabolismo primário e secundário (ALVES; PERINA, 2014).

Os OE e os EV têm capacidade de indução de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), visto que estas não são produzidas nas plantas de forma espontânea, mas sim quando são desafiadas, ou seja, a planta reconhece como se estivesse sendo atacada por um patógeno (SCHWAN-ESTRADA,

2003). Com a ativação das PR-Proteínas enzimas são produzidas em maior quantidade, como peroxidases, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase (FAL), podendo ter como resposta na planta a deposição de lignina e formação de papilas (VERBENE et al., 2000).

A partir disso, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial dos OE e os EV de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum* L.), cravo-da-índia (*Sizygium aromaticum* L.), losna (*Artemisia absinthium*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e pitangueira (*Eugenia uniflora*) no controle de *M. fructicola* (G. Wint.) Honey *in vitro*, e sua ação quando aplicados na pós-colheita de pêssegos.

Para isso, foram realizados dois experimentos:

#### **Estudo I:**

- Isolou-se e cultivou-se o fungo *M. fructicola*; realizou-se análise molecular do fungo *M. fructicola*; obteve-se os OE e os EV, bem como determinou-se as substâncias presentes por meio de cromatografia; avaliou-se o desenvolvimento do fungo *M. fructicola in vitro*, com a utilização de OE e os EV aquosos e hidroalcoólicos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira em contato direto (CD) e contato indireto (CI) com o patógeno; observou-se o efeito de cada produto sobre o fungo *M. fructicola*, através da microscopia óptica e eletrônica de varredura; verificou-se a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) de cada produto para o crescimento de *M. fructicola*; observou-se o potencial de indução de fitoalexinas em cotilédones de soja dos OE e os EV em estudo; verificou-se o efeito toxicológico dos OE e os EV em estudo sobre *Artemia salina*.

#### **Estudo II:**

- Avaliou-se a incidência e severidade da podridão parda na pós-colheita de pêssegos tratados por CD e CI com OE e os EV em estudo e; analisou-se alterações bioquímicas associadas a indução de resistência quanto à podridão parda, a partir do CD e CI com OE e os EV em estudo na pós-colheita de pêssegos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 INTERAÇÃO *Prunus persica* x *Monilinia fructicola*

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch], pertence à família das Rosáceas, subfamília Prunoidea, gênero *Prunus*, sendo espécie perene, caducifólia de clima temperado (HERTER; SACHS; FLORES, 1998), produz fruto classificado como drupa carnosa, com fino pericarpo, mesocarpo polposo e endocarpo lenhoso, com linha de sutura que vai da inserção do pedúnculo até o ápice do fruto. O pericarpo apresenta-se livre ou aderente à polpa (SACHS; CAMPOS, 1998), com cor que pode variar entre branca, amarela esverdeada, amarelo escura, alaranjada e vermelha, conforme o cultivar (CASTRO; BARBIERI, 2014).

Originário da China, o pessegueiro foi introduzido no Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza no Estado de São Paulo, onde se adaptou às regiões de clima mais propício para seu desenvolvimento, devido ser cultura de regiões temperadas (WESTWOOD, 1982). Em seguida, espalhou para o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e parte do Paraná devido as condições climáticas favoráveis (SACHS; CAMPOS, 1998), visto que necessita de 600 e 1200 horas de frio abaixo de 7,2°C (RASEIRA et al., 2014). Porém, com a realização de trabalhos de melhoramento genético ao longo dos últimos anos, lançaram cultivares com menor necessidade de frio, visando sua adaptação em condições de clima temperado ameno ou subtropical (RASEIRA et al., 2014). Contudo, estes ambientes são propícios para maior prevalência de doenças, principalmente fúngicas.

Dentre as doenças que acometem as frutas de caroço, a podridão parda causada pelo fungo *M. fructicola* (Wint.) Honey é das mais importantes, iniciando-se no período do florescimento e estendendo-se até a pós-colheita (OGAWA et al, 1995; MAY- DE-MIO; GARRIDO; UENO, 2004).

Em 1796 ocorreu o primeiro relato de podridão parda associado ao fungo *Torula fructigena*, no continente europeu (BYRDE; WILLETTS, 1977). No fim do século XIX, início do século XX, o gênero do patógeno denominou-se *Monilinia*, com três espécies causadoras de podridão parda, *M. fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey, *M. laxa* (Aderhold & Ruhland) e *M. fructicola* (G. Winter) Honey.

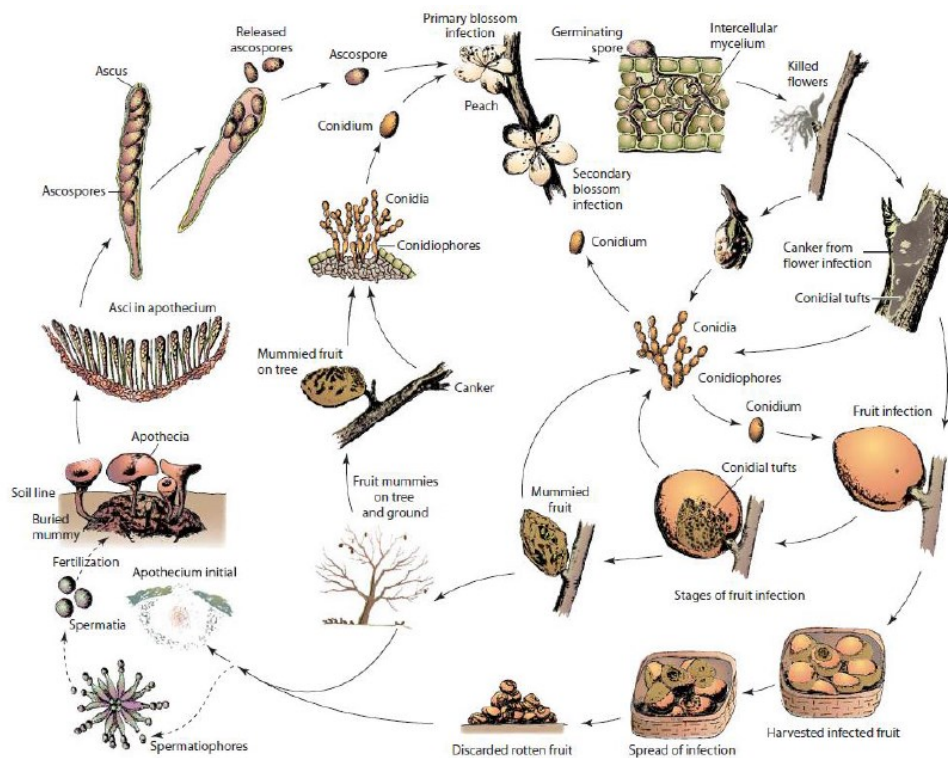
A *M. laxa* e *M. fructigena* são encontradas na Europa, enquanto a *M. fructicola* na América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Japão, França. Porém, em geral, as espécies fúngicas causadoras de podridão estão distribuídas mundialmente nas regiões produtoras de frutos com caroço (PONIATOWSKA; MICHALECKA; BIELENIN, 2013). Em 1883, G. Winter relatou a espécie *M. fructicola*, na Pensilvânia (EUA), em pêssegos mumificados, como *Ciboria fructicola* (BATRA, 1991).

Estes fungos causadores da podridão parda pertencem ao filo Ascomycota, ordem Helioteliales, família Sclerotiniceae, gênero *Monilinia* (LINO et al., 2016) tendo como características formar escleródios bem desenvolvidos, estruturas que garantem a sobrevivência em períodos desfavoráveis. Os escleródios ao germinarem formam apotécios pedicelados, que produzem ascos, sendo que os ascósporos são disseminados pelo vento (inóculo primário da doença) (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011). A fase reprodutiva assexuada (anamórfica) do gênero é denominado *Monilia*. Nesta é difícil a diferenciação por meio dos conídios, visto que todos são limoliformes ou ovóides e hialinos, produzidos em cadeia, o que varia de espécie para outra é o tamanho dos conídios (OGAWA et al., 1995).

Lane (2002) descreveu a chave dicotômica para diferenciar as três espécies tendo a *M. fructicola* características de crescimento da colônia mais acelerado, parte superior da colônia acinzentada, ausência de margens lobadas, sem aspecto de rosetas, esporulação abundante, na forma de anéis concêntricos.

A *M. fructicola* sobrevive no inverno ou em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento de várias maneiras, como em frutos mumificados nas árvores ou caídos ao solo (Figura 1). Nestes em condições propícias de temperatura e geralmente em solo úmido, surgem os apotécios. Quando os ascos estiverem maduros e em condições de tempo favoráveis, ocorrendo a liberação dos ascósporos por meio da chuva, correntes de ar e insetos. Esse processo ocorre na primavera, que coincide com a época do florescimento dos hospedeiros, após os apotécios desintegram-se. Desta forma, causando a infecção primária (HOLTZ; MICHAILIDES; HONG, 1998).

**Figura 1** - Ciclo do fungo *Monilinia fructicola*.



Fonte: AGRIOS, 2005

A infecção secundária ocorre depois que a da flor estiver infectada. Desta forma, ocorre o desenvolvimento das hifas que causam cancrios nos galhos e morte destes ou podem ficar quiescentes até o desenvolvimento do fruto (HOLB, 2008).

Conforme Villarino et al. (2012) os conídios produzidos em frutos mumificados podem sobreviver ao inverno e causar infecção na primavera. Estes são formados no final da temporada, possuem parede mais espessa e são mais resistentes do que os produzidos durante o início do verão, enquanto o micélio formado em botões e folhas tem menor potencial de ocasionar infecções primárias.

Após a infecção, as hifas colonizam as partes florais e formam tufo de conídios. Nos ramos podem ficar latente, formando-se cancro marrom-avermelhado que secam e morrem. As infecções primárias na flor podem desenvolver ou caso não haja condições propícias de temperatura elevada, umidade e chuvas recorrentes pode ficar latente (THOMIDIS; MICHAILIDES, 2010). Quando a flor é infectada aparecem manchas pardas nas pétalas, muitas vezes com presença de conídios sobre os órgãos florais, ocasionando a morte destas que podem permanecer aderidos ao pedúnculo, sendo outra fonte de inóculo (WAGNER JÚNIOR, 2003).

Os ambientes propícios para o desenvolvimento da doença incluem alta precipitação pluviométrica e com isso umidade relativa do ar elevada, temperatura ótima de crescimento e desenvolvimento de 25°C, com período mínimo de 18 h a 10°C e 5 h a 25°C, ou seja, variação entre 17°C a 25°C e, ventos na primavera e verão (MARTINS et al., 2005; FACHINELLO et al., 2011).

No clima subtropical úmido (Cfa) a sobrevivência do fungo de uma safra para outra ocorre na maioria das vezes em múmias que podem ficar presas as plantas ou no solo, nos pedúnculos, nas flores murchas em ramos e cancrios (OGAWA et al., 1995). Muitas vezes pode-se formar a fase perfeita, com formação dos apotécios (fase sexuada). Porém, é mais difícil de ocorrer, sendo que no Brasil devido as variações de temperatura e umidade é pouco comum (MAY-DE-MIO et al., 2014).

Dessa forma, as infecções primárias ocorrem com a fase imperfeita (fase assexuada), por meio dos conídios liberados das infecções do ano anterior em flores murchas, pedúnculos, ramos, cancrios e frutos mumificados (FACHINELLO; NACHTIGAL, 2008). No clima temperado pode produzir escleródios, que ao germinarem originam as estruturas de reprodução sexuada, apotécios de cor marrom escura. Estes germinam a partir das múmias que estão levemente enterradas no solo, formando os ascos que emergem na época da florada do pessegueiro e os ascósporos que são disseminados pelo vento, constituindo o inóculo primário da doença (OGAWA et al., 1995).

Estando o inóculo do fungo no pomar em frutos mumificados, nos cancrios de ramos ou em estruturas de resistência no solo, se oportuniza que o ciclo da *M. fructicola* ocorra disseminando os conídios e ascósporos através do vento, chuva ou insetos [mosca-das-frutas (*Anastrepha frateculus*) e grafolita (*Grapholita molesta*)] ou pelo granizo (AGRIOS, 2005; MAY-DE-MIO et al., 2008). Porém, em condições de temperatura e duração de umidade (GARCIA-BENITEZ et al., 2016) desfavoráveis para o desenvolvimento do patógeno, este pode ficar latente até as condições estarem adequadas (PRUSKY et al., 2003).

Em condições propícias, a infecção acomete em poucas horas os órgãos florais, onde ocasiona a necrose das anteras, seguindo para ovário e pedúnculo. Quando atinge os ramos penetra neste, formando cancrios que podem anelá-lo, causando a murcha e morte da parte terminal. As flores murcham com a infecção, ficando com coloração marrom e permanecem fixadas ao ramo (GARRIDO; SÔNEGO, 2005). Assim, a *M. fructicola* possui duas fases de infecção, no período de



floração e nos estádios finais de frutificação (pré e pós colheita) (HONG et al., 1997).

A penetração nos frutos pode ocorrer por meio de aberturas naturais (estômatos ou rachaduras) ou mesmo por ferimentos causados por insetos ou intempéries (LEE; BOSTOCK, 2006). Após a infecção causam manchas circulares pardas que aumentam de tamanho progressivamente, principalmente próximo a maturação. Os frutos podem cair ao solo ou desidratarem e ficarem presos a planta, mumificados servindo de ponto para disseminação de conídios na próxima safra, constituindo-se o inóculo primário. Nos frutos mumificados, os conídios ficam de forma latente até as condições apropriadas (OGAWA et al., 1995; MAY-DE-MIO; GARRIDO; UENO, 2004).

Observa-se que com o avanço dos estádios de desenvolvimento dos frutos, estes tornam-se mais suscetíveis a podridão parda, pois ocorrem alterações fisiológicas e na composição química (DE CAL et al., 2013). Isso pode ser devido ao fato de que os frutos serem fotossinteticamente ativos e apresentarem maior teor de nutrientes deixando-os mais suscetíveis no período de maturação (THOMIDIS et al., 2007).

Assim a resistência a podridão parda está relacionada diretamente com o estágio de desenvolvimento do fruto, devido aos mecanismos de defesa da planta e também as estruturas pré-formadas, como espessura de cutícula, compactação de células na parede celular e produção de compostos fenólicos. Frutos com maior espessura de cutícula e parede celular aumentam o período de infecção do fungo (LEE; BOSTOCK, 2006).

A epiderme é única barreira física que os frutos possuem contra os patógenos, devido a quitina presente na cutícula, mas se ultrapassada pelos tubos germinativos e/ou apressórios tem facilitada sua infecção, visto que a polpa não oferece nenhum tipo de resistência (LEE; BOSTOCK, 2006). Conforme Fernández et al. (2011) em pêssegos, a cutícula é formada por 53% de cutano, 27% de ceras, 23% de cutina e 1% derivados do ácido hidroxicinâmico, como ácido ferúlico e ácido p-cumárico. Devido a quantidade de ceras presente na epiderme também auxiliam como barreira à penetração do patógeno, pois podem formar cristais que aumentam a repelência da água e impedem a formação de sua película, que é necessária para germinação dos esporos (LINO et al., 2016).

A resistência na epiderme dos frutos pode variar dependendo da cultivar, pois a concentração destes compostos varia com o genótipo do pessegueiro (TAVARINI et

al., 2008). Os frutos jovens de pessegueiro possuem abundante concentração de compostos secundários, dentre eles, os fenólicos (ácido clorogênico e cafeico), que inibem a atividade da enzima quitinase presente no tubo germinativo e apressórios do patógeno. Porém, conforme o nível de maturação dos frutos, a concentração diminui e a atividade da quitinase aumenta ocorrendo a infecção (AGRIOS, 2005).

Scariotto et al. (2018) analisaram 97 cultivares e seleções de pessegueiro, observando que a composição dos fenóis oscilou qualitativamente e quantitativamente entre os genótipos, sendo mais abundantes na epiderme do que na polpa. Os pigmentos antociânicos, bem como ácido clorogênico e neoclorogênico estavam em maior quantidade na epiderme das frutas, além dos triterpenos, ácido oleanólico e ursólico que também estavam presentes em maiores concentrações na epiderme dos pêssegos, não sendo encontrados na polpa do fruto. Segundo Villarino et al. (2012) a susceptibilidade do fruto ao patógeno está diretamente relacionada com a baixa concentração de ácidos neoclorogênico e clorogênico na epiderme do mesmo.

Além disso, com a maturação do fruto ocorre a expansão celular, aumento na produção de açúcares e diminuição de compostos secundários que auxiliam na resistência contra patógenos, tornando-os novamente suscetíveis a doença. Nesse período também há desenvolvimento do fungo que estava latente (DE CAL et al., 2013).

Também se percebe que o tempo de inoculação do patógeno é fator relevante. Santos, Raseira e Zanandrea (2012) observaram que o tamanho das lesões até 72 h após a inoculação com *M.fructicola* eram menores do que a 96 h. Porém, algumas cultivares com 24 h já apresentavam lesões. Em frutos lesionados, o tamanho das lesões aumentou consideravelmente em espaço mais curto de tempo, demonstrando assim a necessidade de cuidados com os frutos, além do tempo de pós-colheita.

Como não há nenhuma cultivar de pessegueiro altamente resistente à podridão parda é imprescindível métodos de controle durante o ciclo ou na pós-colheita (MAY-DE MIO et al., 2014). Estes métodos visam minimizar ou eliminar a doença, com uso do controle químico, por meio de pulverizações de fungicidas, desde a floração até a pré-colheita, tendo como produtos recomendados iprodione, triforine, procimidone, captan, mancozeb (MAY-DE-MIO; GARRIDO; UENO, 2004).

O controle químico regular ainda é o mais utilizado, principalmente em anos desfavoráveis, devido as perdas severas que a podridão parda causa nos pomares. Porém, já existem cepas resistentes para alguns princípios ativos, o que dificulta o

controle da doença. Em alguns países, certos princípios ativos estão sendo proibidos, enquanto outros estão sendo registrados (LINO et al., 2016).

O uso repetido de ingredientes ativos específicos pode levar ao desenvolvimento de resistência do patógeno, sendo ideal para o manejo a adoção de fungicidas com diferentes mecanismos de ação (EMERY; SCHERM; SAVELLE, 2002). Além disso, a crescente exigência da sociedade em consumir produtos mais saudáveis que tenham produção sustentável, com menor quantidade ou ausência de agrotóxicos e a falta de aprovação de algumas das moléculas ativas mais eficazes levam a busca do desenvolvimento de métodos de controle alternativos, seguros e naturais (LOPEZ-REYES et al., 2013), o que tem impulsionado a demanda por pesquisas com uso de indutores de resistência obtidas por EV e OE.

A exploração destes compostos obtidos de plantas tem se tornado alternativa no controle de fitopatógenos, pois atuam com efeito fungicida e/ou fungitóxico, como por exemplo, o extrato bruto vegetal, OE e pó (LAZAROTTO et al., 2009). Estas substâncias apresentam potencial ecológico na substituição de produtos sintéticos, pois prejudicam menos o homem e o meio ambiente, além de ter menor custo e estar facilmente disponível aos agricultores (STANGARLIN et al., 1999). Mas para sua utilização no controle de moléstias faz-se necessário estudos que comprovem sua eficiência, com seu potencial de inibição de crescimento através da ação direta ou indireta por meio da indução de resistência sistêmica adquirida (RSA) e periodicidade de aplicações, uma vez que sua duração no ambiente é influenciada pela periodicidade de chuvas, umidade e temperatura que auxiliam na volatilização e para que o efeito não seja o desejado (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Porém, a aplicação somente de produtos não controla a doença, sendo necessário práticas culturais que tenham como finalidade reduzir o inóculo do fungo, como poda de limpeza, com remoção de frutos mumificados, ramos doentes, flores murchas ou secas e limpeza do terreno de forma que todos os possíveis inóculos sejam retirados e destruídos, principalmente onde possa ocorrer a forma perfeita do patógeno, de modo a prevenir a formação de apotécios. Além disso, a escolha de locais mais apropriados, densidade de plantio e adubação adequada a fim de minimizar o estresse das plantas e desta forma fornecer condições favoráveis a cultura e desfavoráveis aos patógenos (LEEUWEN; HOLB; JEGER, 2002).

Vale ressaltar que a limpeza do solo inclui também a retirada de plantas daninhas que podem servir de hospedeiro alternativo ao patógeno. Além disso, a

escolha de terreno inclinado com linhas do plantio orientadas na direção dos ventos dominantes auxilia no controle da doença (HRUSTIĆ et al., 2012).

## 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS UTILIZADOS EM CONTATO DIRETO E INDIRETO NO CONTROLE DE PATÓGENOS

As plantas medicinais, aromáticas e condimentares possuem substâncias em sua composição química, com potencial fungistático, fungitóxico e/ou fungicida direto ou indireto, ou seja, podem ser aplicados diretamente sobre o patógeno ou nas plantas e frutos para que o metabolismo seja ativado e com isso a planta se torne mais resistente a determinada doença. Estas plantas possuem metabólitos secundários com baixa toxicidade para mamíferos e podem ser considerados potentes biofungicidas e inseticidas naturais (SIMON et al., 2016). Desta forma, estes compostos devem ser estudados para formulação de matéria prima visando obter novos produtos, bem como, para utilização do produtor (GARCIA et al., 2012).

Segundo a Internacional Standart Organization (ISO), os óleos voláteis são produtos obtidos de parte das plantas por destilação de arraste com vapor de água, tendo na sua composição substâncias terpênicas, voláteis e de baixo peso molecular que podem ser atraentes ou repelentes as pragas, bem como inseticida, bactericida e fungicida (KNAAK; FIUZA, 2010). Porém, a função específica é desconhecida (GUIMARÃES et al., 2011).

Os OE são misturas complexas de compostos voláteis extraídos de plantas, tendo como principais componentes constituintes aromáticos e alifáticos que são caracterizados por baixo peso molecular (BASSOLÉ; JULIANI, 2012). Estes são biossintetizados por todos os órgãos da planta, na maioria das vezes distribuídos em células secretoras, cavidades, canais e células epidérmica e com isso o modo de ação deste compostos não tem alvos celulares específicos (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Os OE podem interferir no ataque do patógeno devido alguns compostos serem lipofílicos, permitindo atravessarem a parede celular e da membrana citoplasmática à base de lipídios, perturbando a estrutura de multicamadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, destruindo assim a estrutura celular, causando citotoxicidade (RICHTER; SCHLEGEL, 1993). Além disso, os OE podem afetar a expansão da membrana e alterar a fluidez interferindo na troca de prótons e o pool de ATP para causar o desordenamento de substâncias macromoleculares intracelulares, como

ácidos nucleicos e proteínas, atividades enzimáticas intracelulares e metabolismo de energia. Estas alterações podem influenciar no processo de anabolismo ou catabolismo, resultando no desequilíbrio entre síntese e acúmulo de substâncias energéticas. Também ocorre alteração na taxa respiratória intracelular e eficiência da fosforilação oxidativa, levando à morte celular por apoptose e necrose (YOON et al., 2000).

Conforme Sivakumar e Bautista-Baños (2014), os OE estão ganhando popularidade devido à volatilidade que facilita o uso de pequenas concentrações seguras para o consumo, bem como a aceitação pelos consumidores porque são amplamente utilizados nas práticas culinárias. Com a síntese dos compostos e, a eficiência de OE, a aplicação destes produtos se tornou interessante para indústria alimentícia, devido as propriedades antimicrobianas, biodegradáveis, ecológicas e pela volatilidade dos compostos aromáticos dos OE que os torna eficazes como biofumigantes em pós-colheita de frutos (PHILLIPS; LAIRD, 2014).

Os EV se destacam, pois as plantas estão disponíveis aos agricultores viabilizando o custo, tendo facilidade do preparo por ser simples e barato, alta eficácia contra ampla gama de patógenos de importância agrícola, múltiplos mecanismos de ação devido a diversidade de compostos secundários, baixa toxicidade contra organismos não alvos e com isso reduzindo os riscos à saúde durante a aplicação.

Os OE e os EV estão entre as formas de controle alternativo, pois possuem potencial de uso em doenças causadas por fitopatógenos, por apresentarem ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos, sendo fundamental no controle da doença, pois estas estruturas são ponto de partida para propagação e sobrevivência dos fungos (JINGA et al., 2018). Também podem induzir as fitoalexinas, que são metabólitos secundários produzidos quando as plantas são expostas as condições de estresse, tendo como resposta granulação do citoplasma, rompimento da membrana plasmática, inibição de enzimas fúngicas e desorganização dos conteúdos celulares (HILLEN et al., 2012).

Estas alterações morfológicas podem ocorrer devido aos compostos secundários dos OE e os EV agirem na parede celular e de retraírem o citoplasma nas hifas, resultando na morte micelial, além de interferir nas reações enzimáticas da síntese da parede celular, afetando seu crescimento e morfogênese, ou seja, atuam em múltiplos alvos que impedem o desenvolvimento da resistência (MITCHELL et al., 2010; NAZZARO et al., 2013). A maioria dos componentes não tem alvos celulares

específicos, o que impede o aparecimento de cepas de patógenos resistentes (MARI; NERI; SPADONI, 2015).

O metabolismo secundário das plantas sintetiza substâncias bioativas, como alcalóides, lipídios, terpenos, terpenóides, sesquiterpenos, aldeídos, cetonas, componentes fenólicos, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, polietilenos e poliacetilenos (ZAKER, 2016). Desta forma, originam misturas complexas de compostos, com propriedades físicas e químicas específicas, devido à combinação em proporções de cada substância (FIGUEIREDO et al., 2008).

A síntese destes metabólitos secundários é dependente dos metabólitos primários, como lipídios, carboidratos e proteínas. A maioria não possui implicação direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo produzidos conforme espécie e gênero de cada planta e, acumulados na forma glicosídica nos vacúolos ou em estruturas secretoras especializadas, como tricomas, dutos, canais e laticíferos em concentrações de 1 a 3% de peso fresco, ou seja, estão em diferentes locais de produção e acúmulo, o que explica a composição diferenciada dos OE e dos EV, podendo ter efeito biológico em outros organismos devido à alta toxicidade (FIGUEIREDO et al., 2008).

As concentrações de metabólitos secundários são encontradas em maior quantidade nos órgãos jovens, tendo os terpenóides geralmente quantidades maiores antes e durante a antese e, nas estruturas reprodutivas (FIGUEIREDO et al., 2008). A composição dos OE e dos EV pode variar significativamente, dependendo do método de extração, do órgão vegetal utilizado, da época de colheita e da origem da planta (YUAN et al., 2016).

Porém, a atividade antimicrobiana de cada um depende do efeito de cada composto individual e das interações sinérgicas, aditivas e antagônicas entre eles, o que dificulta de alguma forma a comparação das atividades (NAZZARO et al., 2013). Desta forma, faz-se necessário a realização de testes que visem verificar a atividade antimicrobiana, além de definir e adotar metodologias adequadas e padronizadas, de modo a possibilitar a comparação de estudos (NASCIMENTO et al., 2007).

De forma particular, os OE podem ser extraídos de plantas através das técnicas de arraste de vapor, prensagem do pericarpo de frutos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), hidrodestilação, extração por enfloração, extração por CO<sub>2</sub> supercrítico e solventes orgânicos apolares (MORAIS, GONÇALCES, BETTIOL, 2009). Eles são compostos constituídos na maioria das vezes por moléculas de natureza terpênic

(mono, sesqui e di-terpenos), provenientes da rota do ácido mevalônico, sendo alguns derivados de fenilpropanóides e compostos alifáticos (NAZZARO et al., 2013).

Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os compostos com maior facilidade de se encontrar, visto ter maior frequência na natureza, responsáveis por grande parte das atividades biológicas dos OE (MORAIS, GONÇALCES, BETTIOL, 2009). Em temperatura ambiente são geralmente líquidos, altamente solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis em água. Devido as propriedades antimicrobianas e biodegradáveis e, por não deixarem efeito residual nos produtos frescos são conhecidos como antioxidantes naturais (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Além disso, os OE possuem compostos hidrofóbicos, o que provoca menor repelência por fungos e a composição lipídica das membranas também auxilia na atividade antimicrobiana. Os fungos também são mais sensíveis aos compostos como perialdeído, perilol, citral, citronelal, geraniol, nerol, citronelol, acetato de geranil, cimeno, cinamaldeído e eugenol (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2017). A composição química dos OE e EV pode variar dependendo da época de coleta, com as espécies apresentando maior ou menor quantidade de compostos secundários (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2003).

Segundo Figueiredo et al. (2008) em condições normais, as plantas produzem grande quantidade de metabólitos secundários. Porém, quando submetidas a qualquer tipo de lesão pode ocorrer produção de novos compostos até então não presentes, ocorrendo para isso de maneira induzida. Contudo, qualquer tipo de lesão ou intempérie estimula a produção de metabólitos em maior ou menor quantidade considerando-se constitutivos.

Desta forma, as plantas utilizadas para extração de OE e a fabricação dos extratos vegetais possuem variados compostos complexos presentes que ativam o metabolismo secundário das plantas com possibilidade de sintetizar novas moléculas com potenciais fungicidas (NAZZARO et al., 2013). Porém, a composição dos compostos e suas concentrações podem variar dependendo da parte vegetal utilizada, método de extração, época do ano e hora de colheita, estresse pelo qual a planta foi submetida, tipo de solo e origem da planta, nutrição, o que dificulta comparações entre os resultados encontrados, devido as metodologias adotadas para comprovação de seus efeitos não seguirem padrão nas técnicas utilizadas (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Apesar dos importantes resultados obtidos com os OE e os EV no controle de

patógenos em pós-colheita de frutos, ainda permanecem dúvidas quanto ao seu possível sinergismo entre os componentes bioativos e sua identificação, visto que as substâncias não se encontram puras, mas sim na forma de complexos, em que os compostos se completam desempenhando maior ação sobre o organismo, devido a variabilidade química influenciada pelas condições ecológicas, geográficas, idade da planta, tempo e época de colheita e, diferentes métodos de extração. Alguns OE e EV possuem aromas fortes mesmo em baixas concentrações, tendo volatilidade de alguns componentes que podem ser perdidos durante a extração, aplicação e transporte (PRAKASH et al., 2015).

Ressalta-se que a aplicação de voláteis dos OE não deve interferir no aroma ou sabores das frutas (PONCE et al., 2008) embora o uso do OE na forma de vapor (CI) exija concentrações mais baixas e aplicações mais efetivas do que na forma líquida (CD). As aplicações a vapor podem afetar minimamente as propriedades sensoriais dos produtos alimentícios (ANTHONY; ABEYWICKRAM; WIJERATNAM, 2003; LAIRD; PHILLIPS, 2012), bem como, auxiliar a superar a contaminação do produto durante tratamentos de imersão (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

A duração do tempo de armazenamento pós-colheita também pode influenciar a eficácia da atividade antifúngica nos tratamentos com OE (LOPEZ-REYES et al., 2013). Assim o OE possui vantagem devido a sua bioatividade na fase de vapor, característica que os torna atraentes como possíveis fumigantes para proteção dos produtos armazenados (DIXIT et al., 1995).

### 2.3 PLANTAS COM POTENCIAL INIBIDOR DO DESENVOLVIMENTO DE PATÓGENOS

Os vegetais são fontes de moléculas, na maioria desconhecidas, que podem servir para síntese química gerando produtos de baixo custo, padronizados, seguros, registrados, com controle de qualidade, para que se possa reproduzir e ter constância de componentes visando atender as necessidades dos produtores (MORAIS, GONÇALCES, BETTIOL, 2009).

Ark e Thompson (1959) realizaram os primeiros trabalhos sobre o uso de extratos de plantas para controlar patógenos de frutas em pós-colheita. Estes autores relataram a atividade do extrato de alho (*Allium sativum* L.) sobre a inibição de *Monilinia fructicola* em pêssegos. A partir disso, estudos com OE e EV foram



realizados para verificar a ação dos compostos naturais sobre patógenos em pós-colheita de frutos. Estes compostos são geralmente descritos no grupo de extratos de plantas, mas também são classificados em subgrupos, dependendo da origem e composição química, como OE, isotiocianatos (ITCs), jasmonatos, compostos aromáticos e outros (MARI; NERI; SPADONI, 2016).

O alho (*Allium Sativum* L.) pertence à família Alliaceae, sendo planta herbácea, com folhas lanceoladas, estreitas e cerosas, cujas bainhas formam pseudocaule curto, tendo na parte inferior origem do bulbo, podendo atingir até 60 cm de altura. O bulbo com formato redondo ou ovalado é dividido em bulbilhos (dentes), que são compridos, ovoides e de forma arqueada, envoltos por folhas protetoras (brácteas) (RESENDE; HABER; PINHEIRO, 2018).

O alho possui substâncias como aliinase e aliina, que quando complexados, formam composto de enxofre oxigenado denominado de alicina (dialil tiossulfonato) descoberto por Cavallito e Bailey (1944). Essa substância confere o aroma típico do alho (TALAMINI; STADNIK, 2004; BORLINGHAUS et al., 2014). É bioativo tóxico em células de bactérias e fungos podendo levar a inibição da proliferação dos mesmos devido à presença de altas concentrações de compostos contendo enxofre (KHADRI; BOUTEFNOUCHET; DEKHIL, 2010).

O alho também é fonte rica de fitonutrientes, como flavonoides, saponinas e sapogeninas, compostos fenólicos, óxidos de nitrogênio, amidas e proteínas (LANZOTTI; SCALA; BONANOMI, 2014). Os compostos organossulfurados voláteis e odoríferos mais característicos do alho são liberados após a ruptura da membrana celular, eliminando aliina e outros sulfóxidos, localizados no citoplasma, pela enzima aliinase, localizada no vacúolo (BLOEM; HANEKLAUS; SCHNUG., 2010).

A alicina se decompõe rapidamente em compostos derivados de enxofre, como dióxido de enxofre, dissulfeto de dialila, sulfeto de dialila, trissulfeto de dialila, tetrassulfeto de dialila e dissulfeto de alila propila (AMAGASE, 2006).

O óleo essencial de alho tem como componente mais importante o dissulfeto de dialila, sendo usado como atrativo e inseticida em rações e também por ser bactericida e inibir a nitrificação do solo (CHENG; TONG; JIN, 2008). A alicina provavelmente se decompõe em dissulfeto de dialila e outros aleloquímicos, sendo que o primeiro é substância orgânica volátil, considerada composto mais estável do que a alicina (WANG et al., 2019).

O extrato de alho possui funções medicinais e bactericidas, tendo seu uso

aumentado gradualmente para o controle de doenças agrícolas (WANG et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que esse extrato tem efeitos inibitórios sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cineria*, *Penicillium expansum* e *Neofabraea alba* (DANIEL; LENNOX; VRIES, 2015), *Ralstonia solanacearum* (ZHANG et al., 2009), *Phytophthora nicotianae* (WANG et al., 2019), *P. capsici* e *Verticillium dahliae* (HAYAT et al., 2016). O dialil dissulfeto pode ser utilizado também como fumigante de enxofre orgânico para controle de podridão da raiz do feijão, nematóide da raiz do tomate e doenças da pimenta (MA et al., 2009).

O alho também possui outros compostos como a hesperidina que é flavonóide glicosídico produzido nas células do parênquima adjacente e liberados no lúmen do xilema sendo cristalizados neste espaço, formando-se agulhas de cristais que ocasionam obstrução deste (STANGARLIN et al., 2011). Segundo os mesmos autores esta formação de cristais pode ter efeito protetor formando barreira física. Além disso, os flavonóides glicosídicos possuem propriedades antifúngicas com ação tóxica contra micro-organismos, ou seja, quando o patógeno produz enzimas para degradação dos cristais de hesperidina, ocorre a liberação de substâncias tóxicas (STANGARLIN et al., 2011).

A quercetina é substância encontrada no alho e causa danos as células das membranas dos fungos, aumentando a permeabilidade e provocando vazamento de componentes celulares (YUN et al., 2015). O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), polifenol presente em várias frutas, vegetais, e produtos derivados, foi descrito como poderoso antioxidante natural que é capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila (POLEWSKI; KNIAT; SLAWINSKA, 2002), tendo propriedades antimicrobianas (CHANWITHEESUK et al., 2007).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), da família Lamiaceae, é planta aromática de porte subarbustivo lenhoso, que pode atingir até 1,5 m de altura, nativa da região do mediterrâneo, cultivada em quase todos os países de clima temperado, se desenvolve bem em solo rico em calcário e em ambientes úmidos de clima ameno (LORENZI; MATOS, 2008).

O OE de alecrim é constituído por compostos voláteis que caracterizam o odor, tendo como componentes majoritários  $\alpha$ -pineno, mirceno, 1,8-cineol, borneol e cânfora, nos quais possuem atividade antimicrobiana (LORENZI; MATOS, 2008) e, possui capacidade de estender a vida útil de produtos alimentícios e manter sua

qualidade durante o armazenamento. Desta forma, vem sendo utilizado como bioconservante pela indústria de alimentos como substituto natural para aditivos alimentares antioxidantes sintéticos (OJEDA-SANA et al., 2013).

O  $\alpha$ -pineno, presente no OE de alecrim, é monoterpene encontrado nos óleos essenciais de coníferas, alecrim e lavanda, com potencial antimicrobiano. Nas plantas, apresentam atividade fungicida e inseticida natural (SILVA et al., 2012). Também tem a capacidade de alterar a integridade celular aumentando a permeabilidade da membrana em células de levedura e mitocôndrias isoladas (COX et al., 2000). A atividade antifúngica sobre *Aspergillus flavus* está relacionada a maior porcentagem de  $\alpha$ -pineno no óleo de alecrim (MOGHTADER; SALARI; FARAHM, 2012).

Além disso, o OE de alecrim possui mirceno, que é líquido oleoso de cor amarelada e odor agradável. Monoterpene acíclico, tem a função de metabólito vegetal, agente anti-inflamatório, anabólico, aromatizante e componente volátil do óleo (PUBCHEM, 2021).

O cineol, também é um monoterpene e assim como os demais são produzidos pelas plantas para atuarem como mecanismo de defesa. Estas moléculas são tóxicas aos patógenos e herbívoros. Por serem voláteis, podem ser liberadas como moléculas de sinalização, tanto para atrair os predadores de pragas quanto para sinalizar os polinizadores (WAR et al., 2012).

O óleo essencial de alecrim pode ser utilizado para a redução do crescimento micelial de fungos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. e *Penicillium* spp (FONSECA et al., 2015; WAITHAKA et al., 2017). Os extratos vegetais e o óleo de alecrim possuem também efeito fungitóxico e fungistático em *Bipolares oryzae* (SILVA et al., 2018).

O craveiro-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), árvore de grande porte, podendo atingir 15 m de altura, de ciclo perene e pertencente à família Myrtaceae. O seu fruto possui até 90% de OE, sendo seu principal componente o eugenol (éter fenólico – natureza química), acompanhado por trans-cariofileno, acetato de eugenila e  $\alpha$ -humuleno (PAOLI et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

O eugenol é fenilpropeno, utilizado nos diversos ramos da indústria devido as suas características de efeito antibacteriana e antifúngico (FIGUEIREDO et al., 2008). O mecanismo de ação inclui desnaturação de proteínas e reação com fosfolípidios de

membrana da célula, alterando sua permeabilidade (FU et al., 2007). Wang et al. (2010) sugerem que o eugenol interfere nos processos que ocorrem após os estágios de germinação.

O eugenol possui atividade biológica na inibição de *Candida* (AHMAD et al., 2010); crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (WANG et al., 2010; OLEA et al., 2019) *Alternaria* sp., *Penicillium chrysogenum* (FARIA et al., 2006).

O extrato bruto de cravo-da-índia inibiu completamente os fitopatógenos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp (VENTUROSOSO et al., 2011), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp (JIMOH; AROWOLO; ALABI, 2017).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) possui potencial sobre patógenos, além de ser fonte de compostos bioativos (CHRISTAKI et al., 2012). Pertence à família Lamiaceae, erva perene com folhas altamente aromáticas, tendo seu óleo considerado como potente bactericida e fungicida por ter componentes majoritários como timol [Fenol (3 - hidroxip-cimeno) - natureza química] e carvacrol. O óleo também possui componente como sabineno, cis- $\beta$ -ocimeno, p-cimeno e carifileno (NAZER; KOBILINSKY; THOLOZAN, 2005).

Timol e carvacrol são fenóis derivados do monoterpene cimeno, usado por suas ações anti-sépticas, antibacterianas e antifúngicas (VAZQUEZ et al., 2001). Estes fenóis inibiram o crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassicola* (ROMERO et al., 2013), *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* e *Myrothecium verrucaria* (ROMERO et al., 2009), *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (BEDOYA-SERNA et al., 2018).

O extrato de orégano possui atividade antifúngica sobre *P. aurantiogriseum*, *P. glabrum*, *P. brevicompactum*, *P. crisógeno*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus wentii* e *Eurotium herbariorum* (KOCIĆ-TANACKOV et al., 2012; KOCIĆ-TANACKOV et al., 2014).

A losna (*Artemisia absinthium*), da família Asteraceae, é subarbusto com cerca de 1,20 m de altura, apresentando haste com ramificações pilosas, folhas multifendidas de lóbulos finos. As flores apresentam-se em capítulos subglobosos agrupados em panículas (LORENZI; MATOS, 2008), tendo como metabólitos secundários os fenóis, flavonoides, tiofeno, terpenóides e carotenoides (VERDI;

BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; ABERHAM et al., 2010).

Extrato de losna potencial para inibição do crescimento micelial sobre *Colletotrichum acutatum* (ALMEIDA; CAMARGO; PANIZZI, 2009), *A. alternata*, *P. expansum* e *Mucor piriformis* (PARVEEN et al., 2014). Além da inibição do crescimento micelial, também interferiu na germinação de zoósporos, alongamento do tubo germinativo e produção de zoósporos de *Phytophthora parasitica* e *P. capsici* (ALI et al., 2015).

Extrato etanólico de losna inibiu totalmente a geminação de esporos de *Plasmopara viticola*, além de ser eficiente na inibição do crescimento de *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis allii*, *Monilinia laxa* e *Monilinia fructigena* (ANDREU et al., 2018).

A pitangueira (*Eugenia uniflora*), família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, espécie arbórea, nativa do Bioma Mata Atlântica (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012), copa estreita, tronco liso na coloração pardo claro, cuja altura varia de quatro a 10 m (FIUZA et al., 2008).

Os OE e EV podem extraídos ou preparados a partir das raízes, caule, folhas, flores e frutos, tendo os metabólitos secundários presentes na planta principalmente nos vacúolos e nos tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008). A caracterização química de óleos essenciais extraídos das folhas de *E. uniflora* demonstrou compostos como taninos, antraquinonas, flavonoides, compostos mono e triterpenoides, citronelol, geraniol, cineol e sesquiterpenos (SCHAPOVAL et al., 1994; SOBRAL-SOUZA et al., 2014).

O OE de pitangueira tem atividade antifúngica em *Candida lipolytica* e *C. guilliermondii* e bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (VICTORIA et al., 2012); *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (SANTOS et al., 2018).

## 2.4 INDUÇÃO DE FITOALEXINAS COM EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS

O termo fitoalexina (phyton: planta; alexin: composto que repele), surgiu na Alemanha em 1940. A primeira a ser caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de ervilha (*Pisum sativum*). Após esta descoberta, mais de 300 compostos já foram isolados com ampla diversidade, como cumarinas, diterpenos, apigeninidina,

lutelinidina e flavonóides (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). O isolamento ocorreu de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada e banana (BRAGA, 2007).

As fitoalexinas são metabólitos secundários pós-formados, de baixo peso molecular, produzidos pela planta a partir de estresse biológico, químico ou físico, onde ocorreu a ativação de genes de defesa pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, a produção destas é um dos principais mecanismos de defesa das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013), nas quais são sintetizadas em diferentes vias metabólicas, com a característica comum da presença da rota do ácido chiquímico (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Desta forma, as fitoalexinas não são encontradas presentes nas plantas antes do estresse, sendo biossintetizadas após o ataque do patógeno, em função da ativação de novas rotas biossintéticas. O processo inicia com a transcrição dos RNA's mensageiros específicos e a sua tradução em enzimas correspondentes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O modo de ação das fitoalexinas nos patógenos causam ruptura da membrana plasmática, granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, inibição e ativação de enzimas fúngicas e conseqüentemente interferindo na germinação, alongação do tubo germinativo, na redução e até mesmo inibição do crescimento micelial (GOUVEA et al., 2011).

A fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) é analisada em cotilédones de soja, visto a importante interação entre a planta e os fitopatógenos. Desta forma, é excelente ferramenta para estudos envolvendo ação de eliciadores de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA; FREITAS; STANGARLIN, 2000).

Os pterocarpanos originários em parte da via de fenilpropanóides, assim quando ocorre a infecção há hidrolização das isoflavonas pré-formadas (malonilglucosil - genisteína e malonilglucosil-daidzeína), liberando a molécula precursora da gliceolina – daidzeína e a molécula inibidora de crescimento fúngico – genisteína (SIMÕES, 2004).

Os eliciadores abióticos podem estimular a produção da gliceolina e ativar as rotas que induzem resistência nas plantas, como pode ser observado por Schwann-Estrada, Freitas e Stangarlin (2000) ao aplicarem em cotilédones de soja EV e OE de diferentes plantas medicinais.

Gouvea et al. (2011) pesquisaram a indução conforme a dosagem de extratos de alho, neem e timbó. Matiello e Bonaldo (2013) verificaram que os extratos brutos aquosos e tinturas de arruda, manjerona e carqueja induziram produção de fitoalexinas conforme a concentração. Porém, com resultados mais expressivos para a tintura de carqueja que aumentou o nível de gliceolina.

Mazaro et al. (2008) utilizaram folhas de pitangueira em extrato alcoólico, infusão, maceração e decocção, em diferentes concentrações e observaram que todos os preparos induziram a produção da gliceolina.

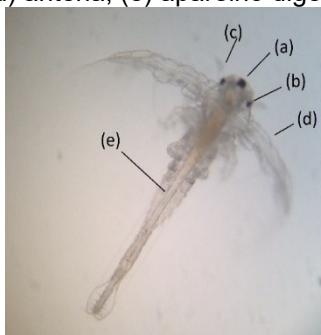
## 2.5 AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Artemia salina*

A utilização de produtos alternativos ao invés de agrotóxicos, não pode ser realizada sem ter estudos prévios de que são realmente seguros. Desta forma, é necessário avaliar a toxicidade destes com teste de toxicidade aguda. Para isso utilizam-se bioindicadores, como os invertebrados aquáticos que são sensíveis a variações ambientais (BARBIERI, 2004).

A *Artemia* sp. pertence ao filo Arthropoda, classe Crustacea, subclasse Branquiopoda, ordem Anostraca, família Artemidae e gênero *Artemia*, tendo comohabitat o marinho e por isso sua denominação “camarão de água salgada”, servindo como alimento para peixes e crustáceos. A sua distribuição é cosmopolita e populações de larga escala. A reprodução pode ser partenogênica ou sexuada, com produção de cistos e após formação dos náuplios (VEIGA; VITAL, 2002). Os cistos possuem diâmetro em torno de 0,25 mm, náuplios 0,45 mm de comprimento e adultos chegando a medir 10 mm (GOMES, 1986).

A *A. salina* produz cistos que são capazes de permanecer em estado de hibernação, inativos desde que sejam mantidos em ambiente seco. Uma vez colocados em água salgada em condições adequadas, o cisto eclodirá dentro de 12 a 48 h e tamanho menor de 0,5 mm (MANZANARES et al., 2015). A partir da eclosão ocorrerão as fases consecutivas, cisto, náuplio, semi-adulto e adulto. O estágio náuplio leva cerca de uma semana para ser concluído, atingindo o desenvolvimento completo geralmente em três semanas. Nesta fase possui o corpo alongado com dois olhos complexos, um trato digestivo linear, antenas sensoriais e pares de toracópodes funcionais (Figura 2) (SCHUMANN, 1995).

**Figura 2** - Cabeça e área torácica de náuplio de *Artemia salina* após 96 horas: (a) olho náuplios; (b) olho complexo lateral; (c) antenas; (d) antena; (e) aparelho digestivo.



Fonte: MANZANARES et al., (2015).

O teste de letalidade com camarão de água salgada é utilizado para avaliar a citotoxicidade, triagem e fracionamento de produtos químicos e bioativos naturais, devido a filtração não seletiva que os torna vulneráveis ao ataque de substâncias tóxicas (MCLAUGHLIN; ROGERS, 1998; SHAOJIE, WENLI, 2012). Além disso, os náuplios de *A. salina* são utilizados para análise de toxicidade aguda e monitoramento de efluentes, devido a facilidade de compra dos cistos e do cultivo em laboratório (COSTA et al., 2008).

Os cistos podem ser adquiridos em lojas especializadas e armazenados em locais secos. Para que ocorra a eclosão é necessário basicamente hidratar com água salina. Após a eclosão é realizado o teste de toxicidade expondo os náuplios por até 24 horas, nas concentrações que se pretende testar, podendo estas serem crescentes, com análise no final do período do número de mortos ou com perda de mobilidade (VEIGA; VITAL, 2002). Este também representa bioensaio rápido, barato e simples para testar a letalidade de produtos vegetais, que na maioria dos casos se relaciona com propriedades citotóxicas (BARAVALIA; GHASIYA; CHANDA, 2012).

É importante ressaltar que, para ter confiabilidade dos resultados, as *Artemias* sp. precisam estar em condições ótimas, como temperatura em torno de 30°C, salinidade 35% e pH aproximadamente 8,0 (SAHPAZ et al., 1994).

## 2.6 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

A concentração mínima inibitória (CMI) é a menor concentração a ser utilizada por determinado produto visando inibir completamente o crescimento do fungo em condições de incubação específica (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2017). Ela é



obtida por meio da microdiluição de substâncias em meio líquido ou sólido, inoculação do microrganismo e após período de incubação, verificando-se qual a menor concentração do produto testado que inibiu o crescimento (NCCLS, 2002).

A CMI pode ser avaliada pelo método de diluição em caldo, utilizando-se OE e EV. É preciso ter atenção quanto a composição dos caldos, visto que a concentração de lipídios, carboidratos e sais podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2017), bem como, o pH, pois caso esteja baixo alguns compostos do OE são mais hidrofóbicos e, com isso, podem-se dissolver na parte hidrofóbica da membrana microbiana com maior facilidade aumentando sua atividade (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

O tempo de incubação, emulsionante e de solventes utilizados podem influenciar na determinação da MIC, visto que alteram a cinética de desenvolvimento dos micro-organismos (ZWIETERING et al., 1994). A temperatura também influencia na pressão de vapor, viscosidade, densidade e estabilidade química dos compostos presentes nos OE e EV (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2017). Desta forma, sempre que for descrever a metodologia deve ser detalhada, para que se tenha base para os resultados, visto que há vários fatores que interferem.

## 2.7 RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA

O metabolismo das plantas é configurado pelo conjunto de reações químicas que ocorrem nas células com ação de enzimas e desta forma direcionando as rotas metabólicas. As reações de biossíntese de compostos comuns para sobrevivência dos organismos, ou seja, relacionados a manutenção da vida, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e alguns polímeros são integrantes do metabolismo primário (MORAIS, GONÇALCES, BETTIOL, 2009).

A síntese de substâncias limitadas as espécies, fazem parte do metabolismo secundário, ou seja, não são comuns a todos os organismos e não estão diretamente relacionados a manutenção da vida, assim não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, mas quando presentes nos organismos possuem vantagens de sobrevivência sobre os demais (AERTS et al., 1991). Como por exemplo, aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie em locais desfavoráveis; protegem contra patógenos, pois podem atuar como antibióticos,

compostos antifúngicos ou alelopáticos para o controle de germinação ou tóxicas para outras plantas e como fitoalexinas (LI et al., 1993).

A biossíntese dos metabólitos secundários está diretamente relacionada ao metabolismo primário. Ela é influenciada por fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos, ataque de patógenos e nutrição (GOBBO; LOPES, 2007).

Conforme a rota de biossíntese dos compostos secundários, ocorre a classificação em alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) derivados do ácido chiquímico (chiquimato) e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina), por exemplo morfina, nicotina, cafeína e vincristina. Os terpenos são produzidos no citoplasma a partir do ácido mevalônico ou no cloroplasto pelo piruvato ou 3-fosfoglicerato, gerando saponinas, carotenoides e fitoreguladores como as giberelinas e ácido abscísico. Os compostos fenólicos provêm do ácido chiquímico e ácido mevalônico, sendo exemplos os flavonoides, taninos e ligninas (ALVES, 2001; PERES, 2004).

As substâncias do metabolismo secundário podem ser utilizadas na indução de resistência, pois são compostos que não apresentam qualquer ação direta sobre os micro-organismos, agindo pela ativação de genes de defesa da planta. Estes genes codificam mecanismos de defesa, classificados em pré-existentes como ceras, cutículas, parede celular, tricomas, estômatos e substâncias químicas; pós-formados ou induzidos pela formação de papila, lignificação da parede celular, tiloses, Pr-proteínas e produção de fitoalexinas (GURGEL et al., 2016).

Na tentativa do menor uso de produtos químicos no tratamento dos frutos pós-colheita, os EV e OE podem apresentar ação na indução de resistência, nos quais ativam os mecanismos de defesa que se encontram latente na planta (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997), além de possuir ação fungitóxica, fungistática ou fungicida direta sobre o fungo (ALVES; PERINA 2014). Isso torna possível sua utilização em pomares de pessegueiro, com função de controlar diretamente a podridão parda e estimular o metabolismo da planta contra esta doença, que causa grandes perdas na pós-colheita (DANNER et al., 2008).

Os EV e OE são denominados elicitores abióticos, que podem desencadear resistência sistêmica induzida (RSI), local adquirida (RLA) e sistêmica adquirida

(RSA). Estes mecanismos de resistência podem apresentar respostas fenológicas semelhantes, porém diferem quanto a rota metabólica dos compostos específicos envolvidos no processo e na parte do vegetal onde atuam (TERRY; JOYCE, 2004).

A RSA ocorre com ativação de genes da rota de síntese do ácido salicílico que age como sinalizador para a síntese de proteínas associadas à patogênese conhecidas como proteínas PR. A RSI é desencadeada pelo aumento na produção de jasmonato e etileno, não dependendo diretamente do ácido salicílico (TERRY; JOYCE, 2004).

A RSA é caracterizada pela expressão de genes que codificam respostas de defesa a fitopatógenos, restringindo o crescimento dos micro-organismos, diminuindo os sintomas da doença devido à ativação de mecanismos de resistência associados a expressão dos genes de defesa (RYALS et al., 1996).

Dentre os mecanismos envolvidos na RSA, pode-se citar a resposta de hipersensibilidade; acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR); fenilpropanóides, como fitoalexinas e compostos fenólicos; ativação das enzimas peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (FAL); alterações estruturais como lignificações, deposição de calose e formações de papilas (DURRANT; DONG, 2004).

A reação de hipersensibilidade causa a morte celular programada no local da infecção, impedindo o desenvolvimento da necrose causada pelo patógeno. Isso ocorre devido ao aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio ( $K^+$ ) e ganho de íons hidrogênio ( $H^+$ ) pelas células, ocorrendo a destruição de compartimentos e, o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de fitoalexinas e proteínas PR (NIMCHUK et al., 2003).

Segundo Oliveira et al (2001) as proteínas PR ativadas por indutores como as hidrolases  $\beta$ -1,3-glucanase (PR-2) e quitinase (PR-3) promovem a desorganização da parede celular dos patógenos, quebrando polímeros estruturais, enquanto que, as peroxidases e a fenilalanina amônia liase (FAL), estão diretamente envolvidas no processo de lignificação da parede celular.

A enzima FAL é de extrema importância, pois está situada em ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e, a reação que ela catalisa é etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Também é chave para todas as vias de síntese que estão envolvidos com resistência de patógeno. Esta enzima catalisa a desaminação da fenilalanina para formar ácido trans-cinâmico e amônia, envolvendo várias reações nos quais se

converte em ácido salicílico que é a molécula sinalizadora, pois é responsável pela ativação das funções que expressam a resistência contra o patógeno, como compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonoides e ligninas (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Segundo Hennig et al. (1993) o ácido salicílico pode ser convertido em composto volátil metil salicilato para ativar a resistência em locais próximos na planta que não foram inoculados, pode ativar a proteína NPR1, co-ativadora transcricional, que induz a reprogramação da célula, ativando a expressão de genes relacionados à defesa. A FAL possui ação na rota dos fenilpropanoides para formação de compostos fenólicos, entre os quais têm-se as fitoalexinas, que são moléculas importantes na defesa, bem como, a síntese de lignina, a qual está relacionada a resistência mecânica no processo de defesa (FU; DONG, 2013).

De acordo com Guzzo (2004) o tempo de duração da resistência pode variar de dias, semanas ou até o fim do ciclo de vida da planta. Tal processo depende da concentração do indutor, inóculo utilizado, intervalo de tempo entre o tratamento inicial com o indutor e o contato com o patógeno, das condições de temperatura e luminosidade, do patógeno utilizado para inoculação e do tamanho da necrose ocorrida em função da inoculação do patógeno, sendo que a RSA não é específica para determinado patógeno (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Os compostos fenólicos são formados por grupos hidroxílicos que podem formar pontes de hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano e, desta forma desativar ou inibir o crescimento e desenvolvimento do fungo (JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002). Constituem-se em grupo quimicamente heterogêneo com diferentes funções, entre as quais citam-se a defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atrativos de polinizadores e dispersores de frutos, proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras. Entre os compostos fenólicos com ação antimicrobiana destacam-se a lignina e os flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além disso, esses compostos são conhecidos como substâncias fungitóxicas, atuando na inibição da germinação de esporos, no crescimento micelial, na produção e atividades de enzimas microbianas, sendo que em pêssegos quando apresentam altos níveis são menos suscetíveis a *M. fructicola* (GRADZIEL; BOSTOCK; ADASKAVEG, 2003). Altas concentrações de ácido clorogênico, ácido protocatecólico

e catecol, arbutina e floridizina em frutos verdes ou em estágio de maturação combinados com demais compostos fenólicos interferem na resistência a podridão parda, mantendo o fungo quiescente (BOSTOCK et al., 1999).

### 3 METODOLOGIA

Os experimentos com *M. fructicola* foram baseados em dois estudos, descritos a seguir.

#### 3.1 ESTUDO I – ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS *IN VITRO*: INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E TOXICOLOGIA

##### 3.1.1 Culturas de Fungos e Produção de Conídios

Para isolar o fungo *M. fructicola* foram coletados seis pêssegos com podridão parda no pomar da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Câmpus* Chapecó – SC (27°7'10.89"S; 52°42'32.09"O); colocados em sacos plásticos e levados até o Laboratório de Pós-Colheita da mesma universidade (Figura 3). Com o auxílio de pincel chato, cerdas macias nº 14, foram retirados conídios do fungo dos frutos, transferidos para placas de Petri®, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-água – Imedia®). As placas foram incubadas em câmara tipo BOD a 24°C, no escuro, até atingir toda a superfície da placa (FABIANE, 2011). Foram realizadas sucessivas repicagens até obtenção de cultura pura, tendo a completa eliminação de fungos contaminantes.

**Figura 3** – Pêssego com podridão parda (A). Visualização de *M. fructicola* microscópio estereoscópio (B). Conídios de *M. fructicola* (C). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



### 3.1.2 Análise Molecular

Após a obtenção da cultura pura, realizou-se a análise molecular para correta identificação das espécie e gênero do fungo em estudo. Esta análise foi realizada no Laboratório Agrônômica – Laboratório de diagnóstico fitossanitário e consultoria de Porto Alegre RS.

Para caracterização molecular e filogenética, o Laboratório realizou a metodologia descrita a seguir:

- **Obtenção de biomassa fúngica**

Três discos de micélio provenientes do crescimento em placa de Petri® foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL esterilizados, contendo 20 mL de extrato de malte 2% (20 g L<sup>-1</sup>, Difco) líquido com o auxílio de agulha histológica esterilizada. Os tubos foram incubados a 25°C, em agitação de 110 rpm por 4 dias. A biomassa da cultura foi coletada por filtração através de papel de filtro Whatman N° 1 e o *pellet* micelial foi lavado com água deionizada esterilizada, seco em papel filtro esterilizado e armazenado a -20°C (KUMAR et al., 2018; WHITE et al., 1990).

- **Extração de DNA**

Para extração de DNA, o material fúngico coletado foi moído até obtenção de pó fino em N<sub>2</sub> líquido, com auxílio de pistilo e almofariz previamente congelados. A extração de DNA total, utilizando 100 mg de material moído homogeneizado foi realizada com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (KUMAR et al., 2018; WHITE et al., 1990).

- **Quantificação da concentração em Nanodrop**

Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop Thermo Scientific modelo 2000) com a determinação da absorbância a A260 nm e A280 nm. A concentração do DNA foi ajustada para 50 ng/μL utilizando água ultrapura (KUMAR et al., 2018; WHITE et al., 1990).

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação do produto de PCR e sequenciamento**

A identidade molecular do isolado foi determinada pela amplificação por PCR e sequenciamento das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS), 5.8S rDNA e partes de 18S e 28S rDNA utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (5). O mix de PCR para o gene ITS (15 μL) continha 2,0 μL de DNA genômico, 0,3 μL de

cada iniciador (25  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), 10,03  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril, 0,12  $\mu\text{L}$  de Taq PCR Platinum, 1,50  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10  $\times$  0,45  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (1,5  $\text{mmol} / \text{L}$ ) e 0,3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (0,2  $\text{mmol} / \text{L}$ ). O programa de amplificação da PCR consistiu em 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 10 min (KUMAR et al., 2018; WHITE et al., 1990).

O produto de PCR foi submetido ao gel de agarose a 1,5% (peso / volume) em tampão Tris / Borato / EDTA (TBE) 0,5X a 90V por 80 minutos utilizando o tampão de carregamento contendo o corante *Blue Green* (LGC) e visualizado em luz ultravioleta utilizando sistema de imagem em gel (*Safe Imager Blue Light Transilluminator*, *Invitrogen*). O tamanho do fragmento foi estimado em relação ao marcador de peso molecular padrão de 1kb (Qiagen, EUA) (KUMAR et al., 2018; WHITE et al., 1990).

O produto de PCR foi purificado utilizando o *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega, Madison, EUA). O produto de PCR foi sequenciado em ambas as direções utilizando os mesmos primers da PCR pela empresa ATCGene Molecular Analysis, Porto Alegre, RS, utilizando sequenciador automático AB-3500 (*Applied Biosystems*, EUA). As sequências obtidas foram editadas no programa BioEdit 7.0.5.3 e as sequências de consenso foram analisadas por meio do software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGAX) (3), construído com o algoritmo ClustalW e comparadas no banco de dados NCBI *GenBank*. A similaridade da sequência de nucleotídeos do isolado foi calculada utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). As análises filogenéticas foram realizadas pelo método da Máxima Verossimilhança por meio do programa MEGAX. Sequências de referência correspondentes ao gene ITS de espécies da *Monilinia fructicola* previamente depositadas no Genbank, também foram acrescentadas às análises. Sequência de *Sclerotinia sclerotiorum* (ATCC 46762) foi utilizada para formar o grupo externo (FISCHER et al., 2016).

### 3.1.3 Obtenção dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais e análise cromatográfica

Os OE foram adquiridos da empresa Laszlo Aromaterapia, alho (*Allium sativum*); orégano (*Origanum vulgare*) alecrim (*Rosmarinus officinalis*); losna (*Artemisia absinthium*); cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*), tendo como características cromatográficas as descritas nos Anexos 1 ao 6.

Os EV foram obtidos a partir de bulbilhos de alho (*Allium sativum*) e botões

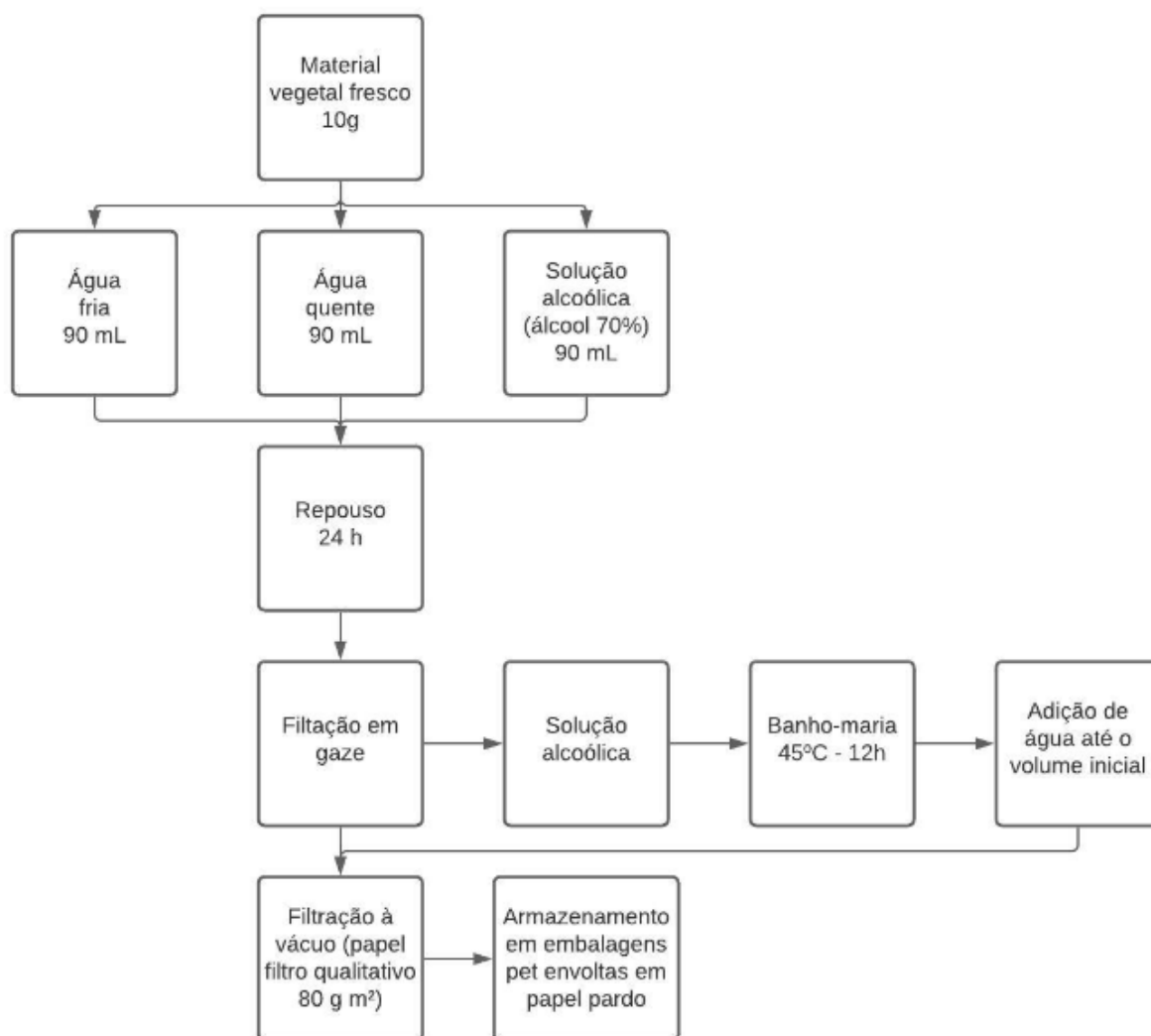


florais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) adquiridos em mercado. As demais plantas foram coletadas no município de Charrua (RS), conforme detalhamento a seguir. Utilizou-se a parte aérea de orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e losna (*Artemisia absinthium*) coletadas nas coordenadas 27°57'21.83"S; 52° 1'0.48"O e folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) coletadas nas coordenadas 27°57'15.61"S; 52° 1'49.96"O. Todas as plantas e/ou partes das mesmas foram colhidas na fase vegetativa, entre as 6 e 7 horas da manhã.

Para a obtenção dos extratos aquosos a frio utilizou-se 10 g de cada material vegetal fresco colocados em 90 mL de água destilada em condição de temperatura ambiente. Após, os materiais em água foram triturados em liquidificador industrial, por três vezes consecutivas, durante 3 min, com intervalos de 3 min. Os extratos foram deixados em repouso por 24h, peneirados, filtrados em gaze até a completa remoção dos fragmentos vegetais, após filtrados em bomba de vácuo com papel filtro qualitativo 80 g m<sup>2</sup> e tampão de algodão. Foram armazenados em embalagens de plástico, tipo PET® (politereftalato de etila) envoltas em papel pardo, devidamente identificados e abrigados da luz. Os mesmos procedimentos foram realizados para obtenção dos extratos aquosos a quente. Porém, foi utilizado água em ebulição (98°C) ( BARBOSA et al., 2018). Conforme diagrama apresentado na Figura 4.

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados conforme Celoto et al. (2008), com adequações no tempo e concentração dos extratos. Foram utilizados 10 g de cada material vegetal e 90 mL de solução alcoólica a 70% (álcool de cereais), triturado em liquidificador, conforme descrição anterior. Após, realizou-se a filtração, colocou-se o extrato em banho-maria a 45°C, por 12 h, até ficar líquido viscoso. Em seguida, foi adicionado água destilada até completar o volume inicial e filtrado novamente com auxílio da bomba de vácuo (Figura 4).

**Figura 4** - Diagrama de preparação dos extratos vegetais. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



A análise cromatográfica dos EV foi realizada para aqueles que obtiveram maior controle do crescimento de *M. fructicola*. Estas análises foram realizadas na Central de Análises do Instituto de Biotecnologia –Universidade de Caxias do Sul.

A metodologia utilizada pelo Laboratório foi conforme descrito por Morelli (2010), onde as análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP18 (5µm) equipado com detector UV a 210 nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi constituída do solvente A – água Milli-Q com 1% de ácido fosfórico e solvente B – Acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5min, 60% de A de 5 a 40min e 90% de A de 45 a 50min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

As amostras foram filtradas em membranas de Nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com sua ordem de

eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU\*s) do pico do composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado (ácido gálico, epigallocatequina, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, rutina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, apigenina e canferol). O resultado foi expresso em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato.

#### 3.1.4 Efeito dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais sobre o Crescimento Micelial de *M. fructicola* in vitro

A avaliação do efeito dos OE e EV no crescimento de *M. fructicola* ocorreu por meio do contato direto (CD) e contato indireto (CI), como segue:

- **Contato direto (CD)**

Para avaliar os efeitos dos OE na inibição do crescimento micelial de *M. fructicola* foi utilizada solução de 10 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de cada OE, 100  $\mu\text{L}$  de Tween 80 e 9,8 mL de soro fisiológico (VISMARA, 2019), obtendo-se concentração de 1%. Esta solução foi utilizada em todos os experimentos utilizando OE.

O meio de cultura BDA foi vertido em placas de Petri® com 9,0 cm de diâmetro. Após o meio ter solidificado, foi adicionado sobre sua superfície 5 mL da solução de cada OE, na concentração 1% e espalhados sobre toda a superfície com auxílio de alça de Drigalski. Para os EV adotou-se a concentração 10%, sendo espalhado 5 mL de cada extrato sobre o meio solidificado com auxílio da alça de Drigalski (SILVA et al., 2018).

Em seguida, colocou-se no centro de cada placa de Petri®, disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio e conídios de *M. fructicola* com 10 dias após a repicagem e avaliou-se a interferência dos tratamentos em CD sobre crescimento e inibição do patógeno (SEIXAS et al., 2011).

- **Contato indireto (CI)**

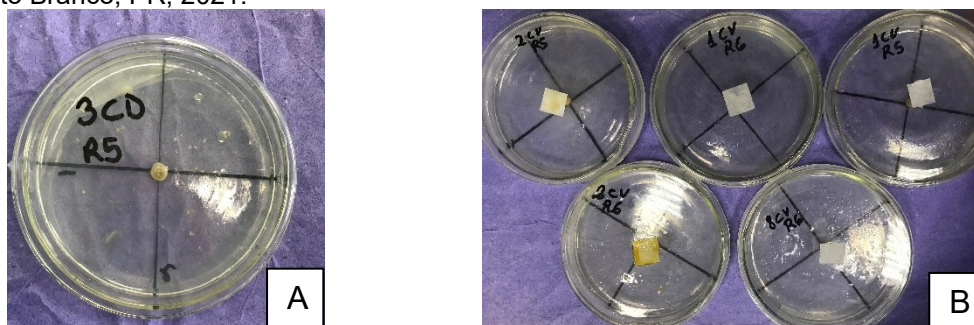
Foi fixado com cola quente 1,5  $\text{cm}^2$  de papel filtro esterilizado no centro da tampa da placa de Petri®. Neste aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  da solução de cada OE ou EV. Na mesma placa, foi colocado no centro da superfície do meio de cultura BDA disco de

0,5 cm de diâmetro contendo micélio e conídios de *M. fructicola* com 10 dias após a repicagem, conforme Júnior, Sales e Martins (2009) com adaptações.

Para os dois métodos de aplicação dos tratamentos (CD e CI), utilizou-se como testemunha negativa água destilada e positiva o ingrediente ativo captana (Captan 500WP®) (denominado tratamento químico), conforme orientação do fabricante.

Todas as placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas em câmara tipo BOD a 24 °C no escuro, durante 7 dias. A avaliação ocorreu diariamente, consistindo em medições do crescimento micelial das colônias, com duas medidas diametralmente opostas em centímetros (cm), com auxílio de régua graduada (Figura 5).

**Figura 5** – Placa com tratamento por contato direto (A). Placas com tratamento por contato indireto (B). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



A partir das medições calculou-se a taxa de inibição do crescimento micelial tanto no CD como CI, conforme Hillen et al. (2012):

$$ICM = \frac{(\text{crescimento testemunha} - \text{crescimento com tratamento})}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

Também foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), por meio da fórmula descrita por Oliveira (1991):

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

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

O delineamento experimental para CD e CI foi inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 8 x 7 (tratamentos x tempos de incubação), com 6 repetições, sendo esse utilizado para cada tipo de extração. A unidade experimental foi composta por uma placa de Petri®. Os tratamentos utilizados foram com alecrim, alho, cravo-da-índia, orégano, losna, pitangueira, água destilada e fungicida. Os tempos de incubação foram de um a sete dias.

Os dados obtidos para os EV e OE foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, sendo transformados pelo método Box-Cox. Em seguida os dados transformados ou não foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de agrupamento de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ), com auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2019). Quando os dados foram significativos efetuou-se análise de regressão com auxílio do programa SigmaPlot v. 10.0.

A utilização do teste de Scott-Knott para agrupamento das médias foi definida devido a necessidade de agrupar os melhores tratamentos para aplicá-los nos pêssegos. Conforme Santos, Ferreira e Bueno Filho (2001) a vantagem deste teste é a ausência de ambiguidade presente nas comparações dos tratamentos, sendo que desta forma ocorre a partição dos grupos de médias e não por comparações de duas a duas.

### 3.1.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos Óleos Essenciais e Extrato Vegetais a *M. fructicola*

Para a realização dos experimentos de CMI foram utilizadas soluções estéreis de cada OE e EV acima citados, na concentração 1 e 10%, respectivamente.

A CMI foi determinada com base no documento da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M38-A, preconizada pela *National Committee for Clinical Laboratory Standart* (NCCLS, 2002), com adaptações conforme descrito abaixo.

A suspensão fúngica de *M. fructicola* foi preparada a partir de placas contendo culturas com 10 dias após a repicagem, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias, seguida de leve fricção sobre o micélio do fungo com alça de Drigalski. A suspensão foi filtrada em gaze, após adicionados 80 mL de água destilada e esterilizada, para completar 100 mL de suspensão. Retirou-se 10  $\mu$ L para quantificar o número de conídios mL<sup>-1</sup> na câmara de Neubauer, realizando-se

sucessivas diluições até a concentração final de  $1,0 \times 10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007).

Para a análise da CMI foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços estéreis, tendo 8 linhas (A a H) e 12 colunas (1 a 12). Distribuiu-se 100  $\mu\text{L}$  do caldo BD (batata e dextrose). Em seguida, inoculou-se em cada poço 100  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica na concentração  $1,0 \times 10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Incubou-se as placas por 48 h em BOD a 24 °C no escuro, para que houvesse o crescimento do fungo. Após foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  da solução de cada OE ou EV no primeiro poço (Linha A) da primeira coluna (coluna 1), homogeneizado e transferido para o segundo poço e assim sucessivamente até o 12º poço. Deste modo, a concentração foi reduzida em 50% a cada diluição. Retirou-se 100  $\mu\text{L}$  excedentes do último poço. Também foram realizadas análises controle somente com caldo BD, com a solução fisiológica e com o fungicida.

Todo o experimento foi realizado em triplicata. As placas voltaram a ser incubadas em BOD a 24°C no escuro, durante 48 h.

Após esse período, utilizou-se 10  $\mu\text{L}$  de cloreto – 2,3,5 – trifeniltetrazólio a 1%, no qual demonstrava atividade mitocondrial do fungo, ou seja, no poço que não houve coloração teve morte do fungo ou diminuição do crescimento, sendo utilizado Lupa - Microscópio Estereoscópio Binocular para auxiliar na verificação. Foi considerado CMI, a menor concentração dos produtos utilizados que cessou o crescimento do inóculo em teste.

### 3.1.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais a *M. fructicola*

A CFM foi determinada com auxílio do método do *spot-test*, conforme Bernardi (2020) em que placas contendo meio de cultura sólido (BDA) foram preparadas e secas por cinco dias em estufa à 37°C, até que as mesmas estivessem totalmente sem umidade e sem ocorrência de escorrimento de material. Para marcação dos pontos onde a solução foi adicionada utilizou-se folha de papel milimetrado.

Utilizou-se a preparação do teste de CMI, antes de adicionar cloreto 2,3,5 – trifeniltetrazólio aos poços, retirando-se 5  $\mu\text{L}$  de solução de cada poço e adicionou-se em cada placa a distância de  $1\text{cm}^2$  entre eles.

Para determinar quais poços foram adicionados ao *spot-test*, observou-se no teste de CMI os poços com formação de botons (crescimento visível do fungo no

poço). Após a identificação do primeiro poço (coluna) que apresentou a formação, foram escolhidos dois poços antes e quatro depois.

A avaliação consistiu no desenvolvimento de microrganismo na alíquota adicionada na placa após 48 h, sendo que estas foram mantidas em BOD a 24°C escuro. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada na Central de Análises da UTFPR – Câmpus Pato Branco.

Para analisar o efeito direto dos tratamentos sobre o fungo *M. fructicola* foram retirados aleatoriamente amostras de micélio dos experimentos com a aplicação dos tratamentos em CD ou CI, onde ocorreu algum controle no crescimento do patógeno. As amostras foram coletadas das placas de Petri®, nos ensaios de CD e CI dos tratamentos com *M. fructicola*. As alíquotas contendo micélio do patógeno foram depositadas em câmara para amostras (70 x 50 mm de diâmetro) que, em seguida, foi preparada com fita de carbono e cobre. A câmara foi então colocada no microscópio eletrônico de varredura, modelo TM3000, Hitachi para realização das leituras. As imagens foram geradas com magnificação de 1000x e em seguida realizadas correções de foco, brilho e contraste.

### 3.1.8 Óleos Essenciais e Extratos Vegetais na Indução de Fitoalexina Gliceolina em Cotilédones de Soja

Para análise de indução de fitoalexina gliceolina foi utilizado sementes de soja da cultivar “BRS 284”, semeadas em caixas de poliestireno contendo areia autoclavada, mantidas em temperatura ambiente. Após 10 dias da semeadura, os cotilédones foram retirados e lavados em água destilada, deixados secar em temperatura ambiente sobre papel toalha. Em seguida, foram colocados quatro cotilédones em cada caixa do tipo Gerbox com tampa, sobre papel filtro umedecido com água destilada. Um corte superficial foi realizado na face abaxial das sementes com o auxílio de lâmina cirúrgica estéril.

Neste corte foi depositado 40 $\mu$ L da solução estéril de cada OE ou EV concentração 1 e 10%, extraídos com diferentes diluentes, respectivamente. Utilizou-se como testemunha apenas água destilada.

Ao término desse procedimento, as caixas Gerbox, contendo os cotilédones de soja com os tratamentos e papel germtest umedecido, foram fechadas e depositadas em BOD a 26°C, no escuro. Passados 20h, os cotilédones foram retirados das caixas, colocados em tubos tipo falcon estéreis, contendo 10 mL de água destilada e agitados por uma hora em mesa agitadora para extração da gliceolina. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro whatman nº 40 e a absorbância medida a 285 nm em espectrofotômetro (LABANCA, 2002).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, sendo cada Gerbox considerada como repetição. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de Shapiro Wilk, apresentando normalidade. Em seguida, submeteram-se estes à análise de variância (ANOVA) e ao teste de agrupamento de Scott-Knott ( $\alpha= 0,05$ ), com auxílio do programa dos dados no *software* R (R CORE TEAM, 2019).

### 3.1.9 Toxicologia de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais em *Artemia salina*

Os cistos de *A. salina* adquiridos comercialmente foram colocados em aquário de vidro (capacidade de 2 L) com divisória de plástico perfurada. Este continha solução com 23g de cloreto de sódio (NaCl), 11g de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 4g de sulfonato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1,3g de cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e 0,7 g de cloreto de potássio (KCl) e 1000 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 9,0, com solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M) (MEYER et al., 1982).

Os cistos foram colocados para eclodir de um lado da divisória, enquanto do lado oposto havia incidência de luz direta fornecida por lâmpada incandescente de 20W. Desta forma, foram considerados como mais resistentes os náuplios que migraram, aproximando-se da luz, sendo então utilizados para as análises de toxicologia com OE e EV.

Em tubetes do tipo Falcon, com capacidade de 15 mL, colocou-se 10 mL dos tratamentos em estudo, preparados com solução salina, nas concentrações 1% para OE e 10% para EV, juntamente com 10 náuplios, mantendo-os em temperatura



ambiente. Realizou-se a contagem do número de náuplios vivos e mortos em 24h. Foram considerados mortos aqueles sem movimentação alguma por tempo superior a 10 seg (COSTA et al., 2008).

Para o controle negativo dos OE foi utilizado 10 mL de solução salina (utilizada para eclosão dos cistos) com 100  $\mu$ L de Tween 80. Para o controle negativo dos EV utilizou-se 2 mL de água potável e 8 mL de solução utilizada para eclosão dos cistos. Para controle positivo foi utilizado a mesma solução da eclosão dos cistos. Em todos os controles colocou-se 10 náuplios e seguiu com as mesmas contagens conforme descrito anteriormente.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições para cada tratamento, sendo cada tubete com 10 náuplios considerado como unidade experimental. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de Shapiro Wilk, apresentando-se normais. Em seguida, submeteram-se os mesmos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de agrupamento de Scott-Knott ( $\alpha= 0,05$ ), com auxílio do programa dos dados no *software* R (R CORE TEAM, 2019).

### 3.1.10 Ranking de tratamentos

Foi proposta escala (Tabela 1) a fim de ranquear os melhores tratamentos conforme o tipo de extração (extrato frio – EF, extrato quente – EQ, extrato hidroalcoólico – EH e óleo essencial – OE) e tipo de aplicação (contato direto – CD e contato indireto – CI) em cada experimento realizado, a fim de utilizá-los nos pêssegos *in natura*, conforme segue:

- Crescimento micelial (CM – cm): escala de 0 a 10, sendo atribuído quando não houve nenhum crescimento a escala 0 e total crescimento escala 10, ao final dos 7 dias de avaliação;
- Inibição do crescimento micelial (ICM - %): escala 0 para total inibição do crescimento micelial e 10 para nenhuma inibição. As demais escalas atribuíram-se conforme sua porcentagem, sendo avaliada no sétimo;
- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM): quanto menor o índice, menor o valor da escala, conseqüentemente, maior o índice, maior valor da escala (0 a 10), avaliado no sétimo dia de avaliação;

- Indução da fitoalexina gliceolina (IFG): escala 0 – para maior indução da fitoalexina, sendo aumentada conforme a diminuição da indução, escala 10 para tratamentos onde não ocorreu a indução.

**Tabela 1** - Escala de avaliação de tratamentos. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2021.

<b>Escala</b>	<b>CM (cm)*</b>	<b>ICM (%)</b>	<b>IVCM</b>	<b>IFG</b>
<b>0</b>	0,5	91 ≥ 100	0	0,055 ≥ 0,059
<b>1</b>	0,6 ≥ 1,0	81 ≥ 90	0,01 ≥ 0,10	0,050 ≥ 0,054
<b>2</b>	1,1 ≥ 2,0	71 ≥ 80	0,11 ≥ 0,20	0,045 ≥ 0,049
<b>3</b>	2,1 ≥ 3,0	61 ≥ 70	0,21 ≥ 0,30	0,040 ≥ 0,044
<b>4</b>	3,1 ≥ 4,0	51 ≥ 60	0,31 ≥ 0,40	0,035 ≥ 0,039
<b>5</b>	4,1 ≥ 5,0	41 ≥ 50	0,41 ≥ 0,50	0,030 ≥ 0,034
<b>6</b>	5,1 ≥ 6,0	31 ≥ 40	0,51 ≥ 0,60	0,025 ≥ 0,029
<b>7</b>	6,1 ≥ 7,0	21 ≥ 30	0,61 ≥ 0,70	0,020 ≥ 0,024
<b>8</b>	7,1 ≥ 8,0	11 ≥ 20	0,71 ≥ 0,80	0,015 ≥ 0,019
<b>9</b>	8,1 ≥ 9,0	0,01 ≥ 10	0,81 ≥ 0,90	0,001 ≥ 0,014
<b>10</b>	---	0	0,91 ≥ 1,00	0,000

\*CM (cm): crescimento micelial; ICM (%): inibição de crescimento micelial; IVCM: índice de velocidade do crescimento micelial; IFG: indução da fitoalexina gliceolina.

Após a atribuição da escala para cada tratamento, calculou-se a média das variáveis analisadas.

## 3.2 ESTUDO II – AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGOS

### 3.2.1 Incidência e Severidade de Podridão Parda em Pêssegos Tratados com Óleos Essenciais e Extratos Vegetais

O experimento foi conduzido no Laboratório Pós-Colheita da UFFS – Câmpus Chapecó - SC. Para avaliação utilizou-se frutos cultivar “Dourado”, colhidos no estágio ponto de colheita, aleatoriamente, no pomar comercial localizado no município de Floriano Peixoto - RS (27°07'06"S; 52°42'20"O; altitude de 677 metros). O clima local, conforme a classificação de Köppen, é de categoria C, subtipo Clima Subtropical Úmido (Cfa), com inverno frio e úmido e, verão moderado seco. O solo é denominado Neosolo Regolítico eutrófico (SANTOS et al., 2018).

A implantação do pomar ocorreu no ano de 2000, no espaçamento de 2,5m entre fileiras e 2m entre plantas. A condução das plantas foi no sistema em forma de “Y” (ípsilon), sem irrigação. As práticas de manejo foram realizadas conforme

recomendações gerais para cultura (SACHS; CAMPOS, 1998; MEDEIROS; RASEIRA, 1998).

A suspensão fúngica de *M. fructicola* foi preparada com placas contendo culturas com 10 dias após a repicagem, adicionadas de 20 mL de água destilada esterilizada, seguida de leve fricção do micélio do fungo com alça de Drigalski. A solução foi filtrada em gaze e adicionada de 80 mL de água destilada e esterilizada completando 100 mL de suspensão. Retirou-se 10  $\mu$ L para quantificar o número de conídios mL<sup>-1</sup> na câmara de Neubauer. Realizou-se sucessivas diluições até a concentração final de  $1,0 \times 10^5$  esporos mL<sup>-1</sup> (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007).

Após a colheita dos frutos, no laboratório fez-se nova seleção, retirando-se aqueles com doenças aparente ou danos mecânicos. Os pêssegos sem injúrias foram desinfestados, mergulhando-os em hipoclorito de sódio a 1% durante 5 min, seguido de três lavagens sucessivas com água destilada. Após, os frutos foram colocados sobre papel toalha para secagem natural, por uma hora. Aplicou-se nos frutos apenas os tratamentos que obtiveram resultados satisfatórios, para os dois tipos de aplicação – CD e CI – conforme descrito anteriormente no ranqueamento.

Os frutos foram separados em dois lotes:

- **Contato direto (CD):** após a desinfestação e secagem os frutos foram mergulhados em solução de OE ou nos EV, nas concentrações 1 e 10%, durante 10 min, respectivamente. Em seguida, estes foram retirados e deixados secar sobre papel toalha em temperatura ambiente. Após foram colocados sobre anéis de policloreto de polivinila (PVC) em embalagens de polipropileno transparente (34 cm de diâmetro), forradas com papel toalha umedecido. As embalagens foram fechadas, sendo que a tampa possuía orifícios para realização de trocas gasosas (Figura 6) (FABIANE, 2011).
- **Contato indireto (CI):** após a desinfestação e secagem os frutos foram colocados sobre anéis de PVC em embalagens de polipropileno transparente (34 cm de diâmetro), forradas com papel toalha umedecido. Na tampa foi colocado (cola quente), papel germtest de 3 cm<sup>2</sup>, aplicado 1 mL da solução de OE ou EV, na concentração 1 e 10%, respectivamente. As embalagens foram fechadas, sendo que a tampa possuía orifícios para realização de trocas gasosas (Figura 7) (FABIANE, 2011).

**Figura 6** - Aplicação dos tratamentos por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



**Figura 7** - Aplicação dos tratamentos contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



Todas as caixas foram mantidas em temperatura ambiente. Após 24 h foi inoculado sobre a epiderme dos frutos por aspersão, aproximadamente 3 mL da suspensão conidial de *M. fructicola* na concentração  $1 \times 10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , em todo o fruto, com auxílio de borrifador plástico (AQUINO et al., 2012). Para as testemunhas foram utilizados os mesmos procedimentos com água destilada e o princípio ativo captana, conforme orientações do fabricante.

Após 24, 60 e 96 h da inoculação foi determinado a incidência de podridão parda, pelo percentual de frutos que desenvolveram a doença e individualmente a severidade, baseados na escala de 0 a 4 (Tabela 2) (WAGNER JÚNIOR, 2003; WAGNER JÚNIOR et al., 2005).

**Tabela 2** - Escala da severidade da doença causada pelo fungo *M. fructicola* em pêssegos.

Escala	Severidade da doença
0	Fruto sem infecção
1	> 0% ≤ 25% da superfície do fruto com lesão
2	> 25% ≤ 50% da superfície do fruto com lesão
3	> 50% ≤ 75% da superfície do fruto com lesão
4	> 75% da superfície do fruto com lesão

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições com 12 frutos cada. Avaliou-se como testemunha negativa apenas aplicação de água destilada e positiva o ingrediente ativo captana, ambos por meio de dois tipos de aplicação, contato direto (CD) e contato indireto (CI).

Os dados da percentagem de incidência de patógenos e severidade da doença nos frutos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, os mesmos foram transformados previamente pela transformação Box-Cox. Em seguida os dados transformados ou não foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de agrupamento de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ), com auxílio do programa dos dados no *software* R (R CORE TEAM, 2019).

### 3.2.2 Análises Bioquímicas

Nas análises bioquímicas específicas utilizou-se os tratamentos que apresentaram severidade da doença inferior a 25% conforme escala apresentada na Tabela 2. Após 24, 60 e 96 h de aplicação da suspensão de *M. fructicola*, seccionou-se amostras dos frutos (epicarpo e mesocarpo) com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e 0,5 cm de profundidade cortados com estilete estéril, sendo o restante do fruto descartado.

Para preparação dos extratos enzimáticos utilizou-se 0,5 g da amostra do fruto, correspondente a cada tratamento, macerando mecanicamente em almofariz com 0,2 g de micropérolas de vidro, 0,1 g de resina Dowex<sup>®</sup>1-x8, e 0,2 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Adicionou-se 5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 8,8; contendo 1 mM de etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1 mM de Ditiotreitól (DTT) e 50 mM de ácido ascórbico. Após foram centrifugados a 19,979g por 30 min a 4°C (GUZZO; MARTINS, 1996). Os sobrenadantes foram utilizados para avaliar o teor de proteínas, atividade da quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase e FAL.

Para determinar o teor de proteínas foi utilizado o teste de Bradford (1976), com 40  $\mu$ L do sobrenadante, 460  $\mu$ L de água destilada e 1 mL do reagente Bio-Rad<sup>®</sup> [1/4

(v/v)], agitado em vortex, sendo após realizada leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

Para dose da atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase utilizou-se os procedimentos descritos por Wirth e Wolf (1992), com adequações. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de oligômeros solúveis de “chitin-azure”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta 5R -RBV (Sigma Aldrich®), sendo utilizado 500  $\mu$ L de extrato proteico misturado a 500  $\mu$ L do tampão de extração fosfato de sódio 0,2M e 100 mg de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg mL<sup>-1</sup>). Incubou-se em banho maria a 50 °C por 60 min, seguido de fervura por 5 min para cessar a atividade da enzima paralisando a reação. A centrifugação foi em 4,992g por 10 min e realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Para determinação espectrofotométrica da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase nos tratamentos utilizou-se como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich® - 4 mg mL<sup>-1</sup>), sendo preparada solução com 200  $\mu$ L do extrato proteico, 400  $\mu$ L do tampão de extração acetato de sódio 50mM e 200  $\mu$ L de CM-curdlan-RBB (4,0 mg mL<sup>-1</sup>), incubado a 40 °C por 120 min, paralisando a reação com 200  $\mu$ L de solução de HCl 1,0M, resfriando-a com gelo por 10 min, centrifugando a 10.000 g por 5 min e em seguida fez leitura da absorbância a 600 nm (GUZZO; MARTINS,1996).

A determinação da enzima FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico, utilizando-se 1,5 mL do extrato enzimático, acrescentando 1,0 mL do tampão de extração TRIS – HCl, pH 8,0 e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg mL<sup>-1</sup>), sendo centrifugado por 10 minutos, a 4 °C e a 6000 g. Incubou-se a mistura por uma hora a 40°C, interrompendo a reação com banho de gelo e realizando as leituras em espectrofotômetro a 290 nm, conforme Rodrigues et al. (2006).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, sendo transformados previamente em Box-Cox. Em seguida foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de agrupamento de Scott-Knott ( $\alpha$  =0,05), com auxílio do programa dos dados no *software* R (R CORE TEAM, 2019).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO I - ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS *in vitro*, INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E TOXICOLOGIA

#### 4.1.1 Análise Molecular

Baseado na análise filogenética, utilizando a Máxima Verossimilhança, foi realizada com as sequências depositadas no GenBank como sendo as mais similares à sequência do isolado em questão e outras de diferentes espécies obtidas da mesma base de dados (FISCHER et al., 2016). Assim, com base nos resultados e na literatura, postula-se que o isolado trata-se de *Monilinia fructicola* (Anexo 7). Também no Anexo 8 há a sequência das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS), 5.8S rDNA e partes de 18S e 28S rDNA.

#### 4.1.2 Cromatografia dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais

Com base na cromatografia do OE de alho utilizado, observou-se que possui compostos organossulfurados em sua composição química como dialil dissulfeto (26,3%), dialil trissulfeto (25,2%), alil metil dissulfeto (14,6%) e dialil tetrasulfeto (12,9%) (LASZLO, 2018) (Anexo 1). Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o extrato de alho frio apresentou 126,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de hesperidina e o extrato de alho hidroalcoólico têm 199,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico, 50,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de epicatequina e 380,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de quercetina (Tabela 3).

**Tabela 3** - Identificação (possível composto) e quantificação de compostos fenólicos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato) dos extratos hidroalcoólico de cravo-da-índia e alho e, do extrato aquoso a frio de alho.

Composto fenólico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato)	Extrato hidroalcoólico		Extrato aquoso a frio
	Cravo-da-índia	Alho	Alho
Ácido gálico	41,74	199,36	-
Catequina	55,45	-	-
Epicatequina	-	50,9	-
Epigallocatequina Galato	75,17	-	-
Hesperidina	-	-	126,9
Naringina	498,27	-	-
Quercetina	-	379,97	-

Os teores detectados dos compostos fenólicos nos extratos de alho apresentados na Tabela 3, também foram observados por Yashin et al. (2017), que avaliando o conteúdo de flavonoides do extrato de alho, encontraram  $1740 \mu\text{g g}^{-1}$  de quercetina.

Além destes, Kallel et al. (2014) e Fratianni et al. (2016) identificaram no extrato de alho, ácidos fenólicos (ácido gálico), flavan-3-ols (derivados de catequina e epicatequina); flavanonas (naringenina), flavonóis (derivados de quercetina) e flavonas (apigenina e luteolina). Porém, apesar de alguns dos compostos fenólicos estarem nas diferentes variedades de alho (*Allium sativum*), a concentração pode ser distinta entre elas (FRATIANNI et al., 2016).

O OE de alecrim apresenta em sua composição princípios ativos como 1,8 cineol (natureza química – óxido) (eucaliptol),  $\alpha$ -pineno (terpeno), borneol (álcool bicíclico), cânfora (terpeno monocíclico), sendo estes com atividade antimicrobiana conhecida. Os demais em menor quantidade são acetato de isobomila, valerianato de isonila, ácido cítrico, glicólico, glicínico, rosmarímico, nicotianamida, colina, pectina e rosmaricina (GACHKAR et al., 2007). O óleo utilizado possui em sua composição química 23,5% de cânfora, 18,5% de 1,8 cineol e 14,2% de  $\alpha$ -pineno (LASZLO, 2008) (Anexo 2).

O OE utilizado de cravo-da-índia apresenta em sua composição eugenol (61,2%),  $\beta$ -cariofileno (31,2%) e acetato de eugenila (3,4%) (LASZLO, 2008) (Anexo 3). Segundo Pereira et al. (2008) o eugenol contribui com atividade antifúngica e antibacteriana. A partir da cromatografia por CLAE, o extrato hidroalcoólico de cravo-da-índia apresentou  $41,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico,  $55,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de catequina,  $75,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de epigallocatequina galato e  $498,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de naringina (Tabela 3).

Em relação a cromatografia do extrato hidroalcoólico de cravo-da-índia também foram detectados compostos como ácido gálico (DUA; SINGH; MAHAJAN, 2015; YASHIN et al., 2017). Ghallab et al. (2020) ao comparar a preparação dos extratos de cravo-da-índia com diferentes diluentes, observaram que os extratos preparados com etanol tiveram maior conteúdo de ácido gálico, quercetina, além de catequina, o que corrobora com os compostos detectados no extrato utilizado nos experimentos deste trabalho.

O OE de orégano tem como componentes majoritários timol [Fenol (3 - hidroxip-cimeno) - natureza química] e carvacrol, com 3 e 96,4%, respectivamente (LASZLO,



2017) (Anexo 4). Blank et al. (2016) ao analisarem a composição química do OE, extrato vegetal aquoso e etanólico de *O. vulgare*, observaram que OE possui como compostos secundários majoritários  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ terpineno, linalol, 4-terpineol e timol, enquanto nos extratos aquoso e etanólico foram encontrados ácido rosmarínico, ácido luteolina, canferol, apigenina e quercetina.

Ao ser analisado o OE de losna por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas Judzentiene, Tomi e Casanova (2009) observaram a composição do OE em diferentes amostras, sendo que estas foram compostas por mirceno (5,1-9,2%),  $\beta$ -pineno (5,4-10,4%), linalol (4,7%), trans-sabinol (6,4%,) e 1,8-cineol (5,2-7,1%). O OE de losna utilizado possui crisantenona (12,6%), 1,8-cineol (12,2%),  $\alpha$ - curcumeno (8%) e  $\beta$ -cariofileno (7,7%) (LASZLO, 2014) (Anexo 5).

O OE de losna possui em sua composição em torno de 76,92% de monoterpenos, 13,87% de sesquiterpenos. Do total dos monoterpenos, 45,42% eram hidrocarbonetos e 31,05% oxigenados. Como hidrocarbonetos monoterpênicos, têm-se  $\alpha$  e  $\beta$  pineno, pseudolimoneno, brometo de geranil, terpinoleno (BERECHET et al., 2015).

O OE de pitangueira usado possui curzereno (25%), germacreno b (16,4%), germacreno d (8,2%) (LASZLO, 2010) (Anexo 6). Chang et al. (2011) ao estudarem OE de pitangueira observaram na cromatografia 64,7% de furanodieno, 21,6% de curzereno, sendo que quando reorganizados termicamente os mesmos formam apenas uma substância, o curzereno. Além de germacreno b e  $\gamma$ -elemeno, ambos 2,3%.

Com a identificação dos compostos presentes nos EV pode-se perceber a diferença de compostos fenólicos entre o extrato frio e hidroalcoólico de alho em cada extrato. Apesar desta diferença os três extratos apresentarem compostos antioxidantes que podem influenciar na atividade antifúngica (Tabela 3).

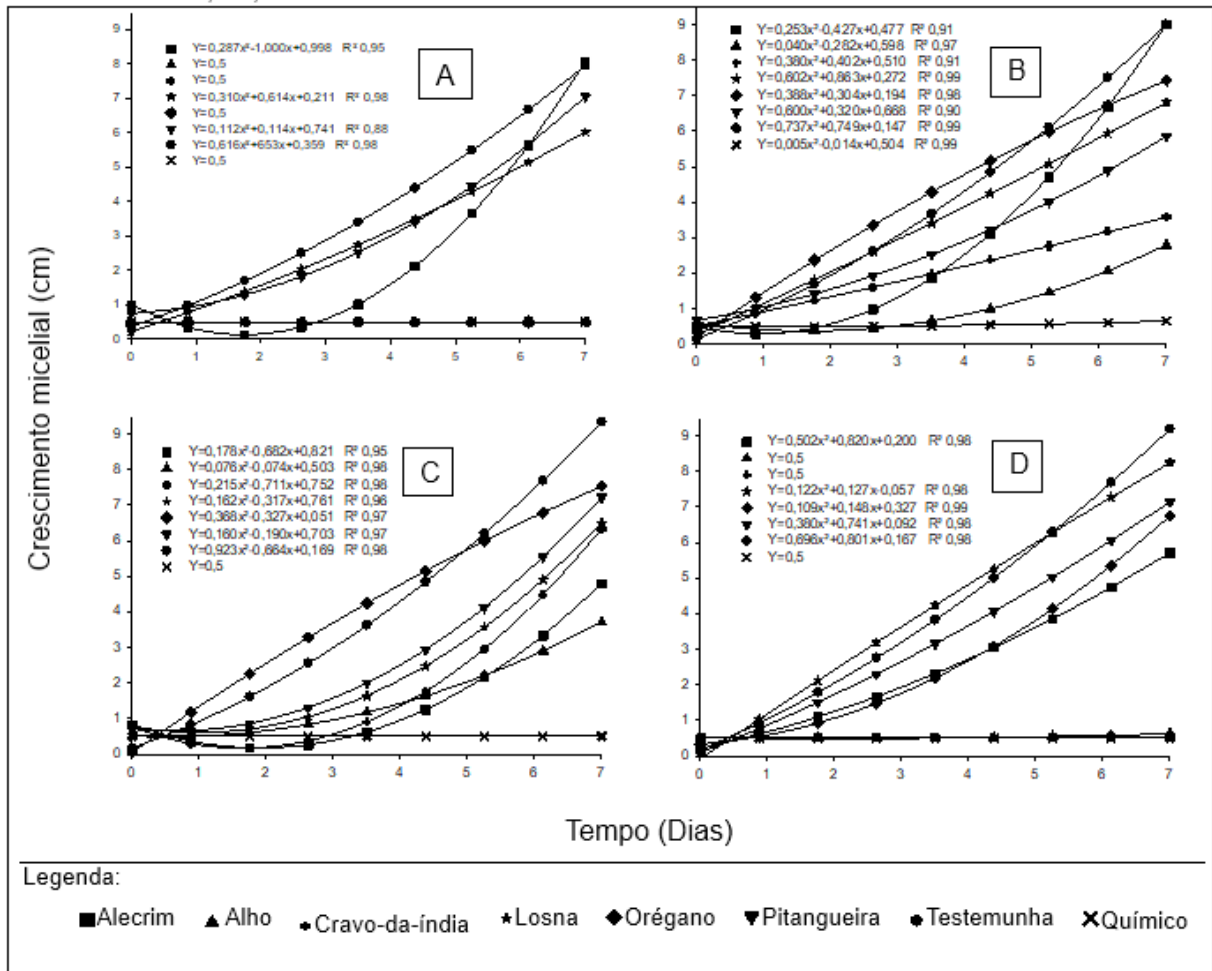
#### 4.1.3 Óleos Essenciais e Extratos Vegetais sobre o Crescimento Micelial de *M. fructicola* *in vitro*

Houve interação significativa entre os preparados dos materiais vegetais e o fator tempo para o controle de *M. fructicola* (Apêndices 1 a 8).

Os tratamentos contendo alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira em diferentes formas de extração, óleo essencial, extrato aquoso frio e a

quente e, hidroalcoólico foram significativos na inibição do crescimento de *M. fructicola* em CD (Figuras 8 e 9).

**Figura 8** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de: (A) óleo essencial, (B) extrato frio, (C) extrato quente e (D) extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto *in vitro* em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



No desenvolvimento do patógeno frente ao CD com os tratamentos à base de OE, não houve crescimento do fungo com uso dos óleos essenciais de alho, cravo-da-índia e orégano na concentração 1%, equivalendo-se ao tratamento com fungicida no controle *in vitro* (Figura 8A). Esses resultados foram promissores, apresentando mesma resposta quando comparado ao tratamento com ingrediente ativo captana, podendo ser estudados para substituição deste.

Os OE contêm diversidade de substâncias biocidas que as plantas possuem e podem ser utilizados na defesa eficiente contra fitopatógenos (RODRIGUES et al., 2006). A eficiência dos OE de cravo-da-índia, alho e orégano também foi observado por Borrego et al. (2012) ao utilizarem nos controles de *A. niger*, *A. clavatus*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Bacillus cereus*, *B. thuringensis*, *B. polymyxa*, *Enterobacter*

*agglomerans* e *Streptomyces* sp..

Acredita-se que os resultados observados no teste *in vitro* com OE de alho pode ser devido à presença dos compostos alil metil dissulfeto, dialil dissulfeto, trissulfeto e tetrasulfeto, que são bioativos altamente envolvidos nos mecanismos defensivos das plantas contra patógenos, sendo que a liberação destes causam danos celulares e lesões nos tecidos dos micro-organismos (HILE; SHAN; BLOCK, 2004).

O OE de pitangueira, losna e alecrim não diferiram significativamente quanto a seu efeito em comparação ao obtido pela testemunha com apenas água destilada, tendo eficiência máxima antes do primeiro de controle. Porém, observou-se na MEV que o OE de alecrim causou o murchamento dos conídios, como pode ser visualizado na Figura 10D.

Com esses resultados é necessário avaliar se a concentração utilizada não foi suficiente para obtenção da eficiência desejada, visto que em outros trabalhos esses óleos proporcionaram controle de patógenos (ALMEIDA; CAMARGO; PANIZZI, 2009; SILVA et al., 2018), pois com a utilização de alíquotas acima de 20  $\mu$ L de OE de alecrim afetaram o crescimento micelial de *Alternaria* sp., *Alternaria carthami* e *Rhizoctonia solani* (HILLEN et al., 2012).

Além disso, Hoyos et al. (2012) ao utilizarem óleos com bioativos como cineol, geraniol,  $\alpha$ -pineno, presentes no OE de alecrim, observaram atividade antifúngica sobre *Pseudocercospora griseola*, com danos na estrutura dos conídios, fusão de vacúolos, condensação do citoplasma, rompimento de organelas membranosas, ruptura de membrana plasmática e parede celular e, alterações estruturais nas mitocôndrias.

As alterações estruturais podem estar relacionadas a hidrofobicidade que os compostos dos OE possuem, podendo interagir com a camada lipídica das membranas tornando-as menos seletivas e, em muitos casos, com extravasamento de íons e demais constituintes das células (KUMAR et al., 2008).

Ao ser utilizado extrato frio na concentração 10%, em CD, diminuiu-se a eficiência dos tratamentos em relação ao óleo (Figura 8B). Isso pode ser decorrente do fato do uso da água fria não ter sido eficiente na extração dos compostos secundários presentes nas plantas.

Todos os extratos a frio utilizados, com exceção do alho, obtiveram sua eficiência máxima antes do primeiro dia de avaliação, não diferindo da testemunha (água). O extrato de alho conseguiu manter a eficiência até 3,5 dias, tendo menor

crescimento do fungo quando comparado aos demais tratamentos no final da avaliação (Figura 8B), o que pode ser devido a concentração de hesperidina ( $126,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) contida no extrato (Tabela 3), pois os flavonóides glicosídeos tem ação tóxica em microrganismos. Assim, quando o patógeno produzir enzimas para degradar os cristais formados pela ação da hesperidina na planta, substâncias tóxicas podem ser liberadas contra o mesmo (STANGARLIN et al., 2011).

Quando utilizado extratos quente na concentração 10%, em CD com o patógeno, extrato de alecrim e cravo-daíndia obtiveram máxima eficiência entre o primeiro e segundo dia, o alho entre o quarto e quinto dia, e os demais não diferiram da testemunha (água), porém nenhum tratamento obteve eficácia no controle até o final da avaliação (Figura 8C). Com isso, pode-se perceber que a concentração utilizada não foi eficiente ou mesmo a temperatura da água utilizada pode interferir sobre a extração e na conservação dos compostos secundários presentes nas plantas utilizadas, visto que se utilizou água a  $98^{\circ}\text{C}$ .

Segundo Tiwari et al. (2011) temperatura, tempo, solvente e método extrativo influenciam não somente no rendimento total do EV ou OE, mas também nos compostos secundários, uma vez que muitas substâncias são termolábeis ou quando submetidas as temperaturas elevadas podem sofrer modificações irreversíveis na estrutura.

O extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia em CD com o fungo (Figura 8D) mantiveram o mesmo comportamento de controle obtido com o tratamento fungicida. Os demais extratos hidroalcoólicos obtiveram comportamento de crescimento micelial semelhante a testemunha, com a máxima eficiência entre a montagem do experimento e o primeiro dia de avaliação. Porém, ao analisar as hifas de *M. fructicola* com extrato hidroalcoólico de alecrim na MEV, observou-se hifas com desordem celular (Figura 10C).

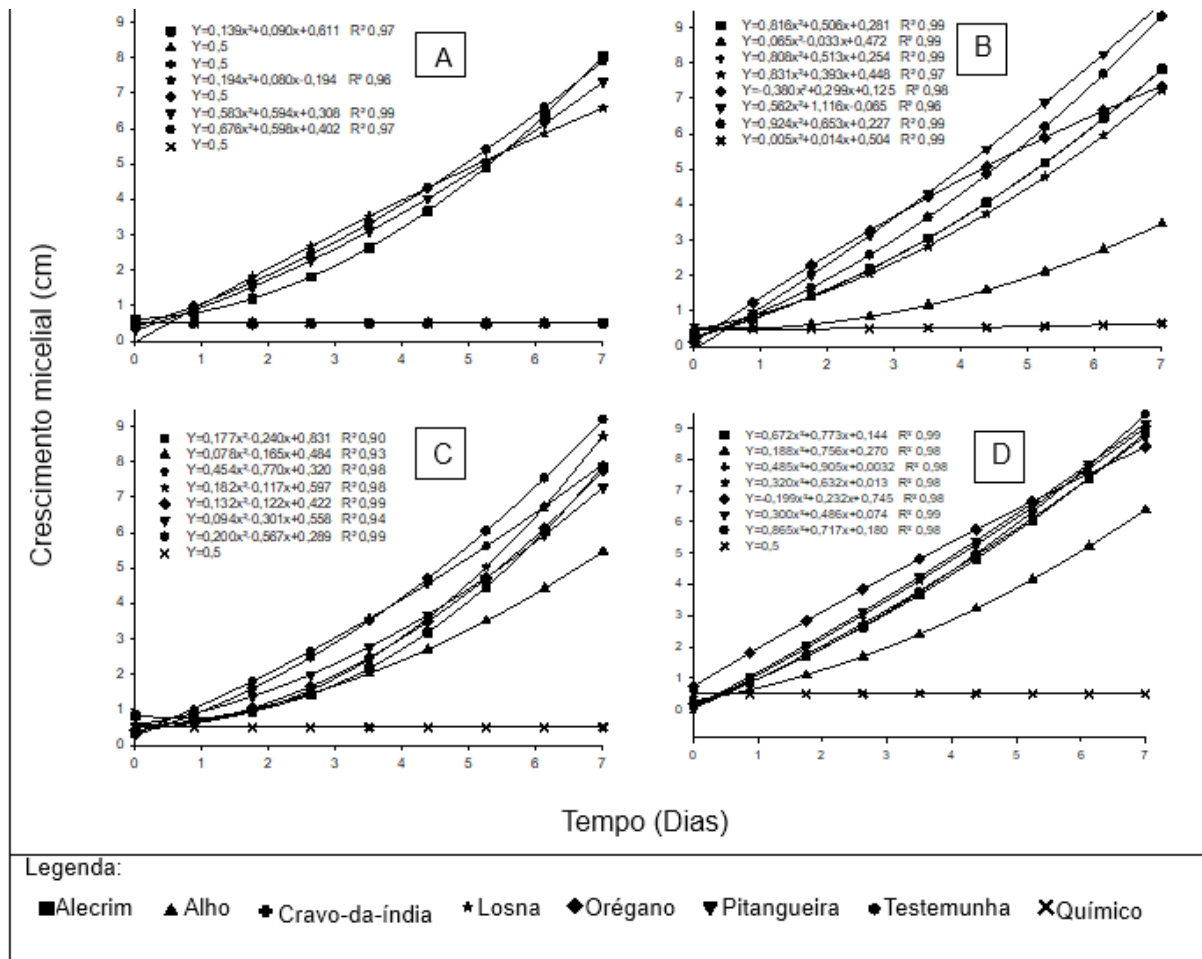
O que pode ser visualizado a partir dos resultados obtidos nas Figuras 8A-D em que o controle do crescimento micelial variou conforme o tipo de extrato utilizado, com menor eficiência naqueles obtidos a frio e a quente e, maior com uso do OE e extrato hidroalcoólico. Isso pode estar relacionado com a quantidade ou tipo de compostos secundários presentes, influenciado pelo método extrativo, visto que o extrato hidroalcoólico de alho possui  $199,36 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico e  $379,97 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quercetina. Além disso, o extrato hidroalcoólico de cravo-da-índia contém  $498,27$

$\mu\text{g mL}^{-1}$  de naringina (Tabela 3). Todos estes compostos possuem potencial antifúngico (ALAM et al., 2014; PAULA; SILVA et al., 2014).

Oliveira et al. (2016) observaram que o método extrativo e o solvente utilizado influenciam de maneira direta na qualidade do extrato, tendo nos métodos de extração a base de etanol maior concentração de picos cromatográficos para substâncias de caráter mais apolar, enquanto os hidroalcoólicos foram minimizados pela polaridade mais alta do solvente. Além disso, o extrato decantado hidroalcoólico apresentou maior rendimentos de flavonóides, polifenóis e proantocianidinas.

Quando analisado os tratamentos por meio do CI, os compostos voláteis dos óleos de alho, cravo-da-índia e orégano inibiram totalmente o crescimento de *M. fructicola*, ou seja, obtiveram o mesmo desempenho do tratamento fungicida, não ocorrendo o crescimento do fungo (Figura 9A). Isso pode ser devido ao cravo-da-índia e orégano possuírem compostos bioativos secundários como eugenol e carvacrol, respectivamente, que possuem atividade citotóxica para fitopatógenos (SACCHETTI et al., 2005).

**Figura 9** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de: (A) óleo essencial, (B) extrato frio, (C) extrato quente e (D) extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio do contato indireto *in vitro* em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.



O carvacrol interfere na atividade de enzimas da parede celular como a quitinase,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanases de fungos (ADAMS et al., 1996). Os mesmos autores ao utilizarem eugenol e carvacrol sobre *Cladosporium herbarum*, verificaram redução no número de conídios, deformação no centro da colônia, alterações nas hifas mais jovens ocorrendo diversidade de ramificações e nas mais antigas aumentou o diâmetro, o que não foi observado na cultura controle.

Costa et al. (2011) observaram alterações morfológicas em *R. solani*, com a diminuição da nitidez da parede celular, fragmentação e menor turgência das hifas, desorganização dos conteúdos celulares, ao utilizarem OE de cravo-da-índia.

As médias obtidas com os óleos essenciais de losna, alecrim e pitangueira apresentaram mesmo comportamento daquelas do tratamento testemunha com água destilada, ou seja, não foram eficientes para o controle do crescimento micelial tendo

o ponto de máxima eficiência antes de completar o primeiro dia de avaliação. Talvez seja necessário testes com utilização de concentrações maiores, porém, além da eficiência, deve-se observar o custo destes óleos ao utilizar maiores concentrações para que sejam viáveis também economicamente aos agricultores.

Ao avaliar o CI dos extratos frios (Figura 9B), apenas as médias com alho diferiram seu comportamento da testemunha, apresentando a máxima eficiência entre o segundo e terceiro dia de avaliação. A baixa eficiência destes extratos pode ser explicada pelos compostos secundários presentes nas plantas não terem sido extraídos em maior quantidade suficiente para inibir o crescimento do fungo, visto que a extração a frio é processo que demanda maior tempo, fazendo com que não seja possível a total extração dos metabólitos ou também ser necessário utilizar quantidade maior de plantas. Além disso não ocorre o CD entre o tratamento e o fungo o que também dificulta o controle.

Assim como no extrato frio, o extrato quente e hidroalcoólico em CI (Figuras 9C e 9D, respectivamente), o tratamento com alho demonstrou efeito com maior inibição do crescimento micelial em comparação aos demais, com a máxima eficiência entre o primeiro e segundo dia. Entretanto, tanto este como os demais tratamentos não obtiveram mesmo efeito do fungicida comercial. Apesar da aplicação do extrato quente de orégano por CI não controlar o crescimento micelial do fungo, causou alterações nas hifas de *M. fructicola* deixando-as murchas e retorcidas (Figura 10L).

Quando analisado a inibição do crescimento micelial causado pelos tratamentos em geral, observa-se que OE tanto no CD como CI, foram mais eficientes, o que pode ser explicado devido serem misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis, com grande quantidade de terpenos, podendo ter causado maior citotoxicidade quando comparados aos extratos (VITTI; BRITO, 2003). É importante salientar que a proporção de cada substância do metabolismo secundário pode variar devido as condições ambientais a qual a planta estava sujeita, época de colheita e processamento pós-colheita, afetando nas atividades citotóxicas e biológicas (GOBBO; LOPES, 2007).

Também os extratos vegetais podem ter menor eficiência na inibição do crescimento micelial no CI, devido a presença de compostos fenólicos não voláteis presentes extratos etanólicos e aquosos (TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Além da análise da inibição do crescimento por meio do uso dos tratamentos ao longo do tempo, fez-se comparação da interação forma de contato x tratamento

uma vez que mostraram efeito significativo (Apêndice 9) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial	
	Contato direto	Contato indireto
Testemunha	8,17 aA*	8,45 aA
Alecrim	8,88 aA	8,58 aA
Alho	0,50 cA	0,50 cA
Cravo-da-índia	0,50 cA	0,50 cA
Losna	5,50 bB	8,17 aA
Orégano	0,50 cA	0,50 cA
Pitangueira	8,47 aA	5,17bA
Químico	0,50 cA	0,50 cA
CV (%)	13,07	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao ser analisado o OE das plantas conforme o método de aplicação, seja pelo CD ou CI houve formação de três grupos, tendo em ambos, o agrupamento de maior inibição composto pelo tratamento químico, com OE de alho, cravo-da-índia e orégano, apresentando 100% de eficiência. Comparando-se as médias entre os métodos, o único a formar grupos distintos foi com OE de losna, tendo no uso do CD a maior inibição (Tabela 4).

Estudos demonstraram que os OE possuem atividade antimicrobiana tanto no CD como no CI na forma de vapor, sendo esta altamente bioativas (INOUE et al., 2003). Puškárová et al. (2017) ao compararem a utilização de difetente OE em CD e CI sobre *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus fumigatus* observaram que estes apresentaram diferentes atividades fungistática e fungicida nos dois tipos de aplicações.

A eficiência dos alguns OE no CI sobre patógenos pode ser devido a presença de moléculas lipofílicas responsáveis por uma parte da atividade e se associar na fase aquosa para formar micelas, suprimindo assim sua fixação ao fungo, enquanto a fase de vapor permite a fixação livre (INOUE; UCHIDA; ABE, 2006). Também a atividade antimicrobiana decorrente dos componentes volatilizados resultaria da combinação da exposição direta aos compostos voláteis, sendo que os fungos tendem a crescer mais na superfície do ágar e estariam mais expostos a estes (PUŠKÁROVÁ et al., 2017).

Em relação ao extrato frio (Apêndice 10) houve a formação de seis grupos para



CD e quatro para CI, sendo o de maior eficiência formado pelo controle químico, seguido pelo grupo formado pelo uso do alho. Os demais grupos envolveram os tratamentos que apresentaram menor eficiência. Quando comparados os tratamentos segundo forma de contato, a maioria das médias não diferiram estatisticamente entre si, sendo exceção para uso do cravo-da-índia e pitangueira com a maior inibição no crescimento micelial por meio do CD (Tabela 5).

**Tabela 5** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fruticola* com aplicação de extrato aquoso a frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

<b>Extrato aquoso frio</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Contato direto</b>	<b>Contato indireto</b>
<b>Testemunha</b>	8,74 aA*	9,00 aA
<b>Alecrim</b>	8,29 aA	7,72 bA
<b>Alho</b>	2,75 eA	5,37 cA
<b>Cravo-da-índia</b>	3,81 dB	7,80 bA
<b>Losna</b>	6,79 bB	7,62 bA
<b>Orégano</b>	7,49 bA	7,26 bA
<b>Pitangueira</b>	6,37 cB	9,00 aA
<b>Químico</b>	0,65 fA	0,65 dA
<b>CV (%)</b>	9,38	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A utilização do extrato frio de alho, assim como OE tanto no CD como CI apresentaram controle fúngico satisfatório, pois foi similar ao químico ou formou grupo próximo a este.

No extrato quente (Apêndice11), foram formados seis grupos no controle do CD e quatro com CI, sendo que em ambas formas o tratamento químico apresentou menor crescimento micelial. No CD, o segundo grupo formado com maior inibição de crescimento foi formado pelo alho, o terceiro grupo por alecrim, quarto grupo pelo cravo-da-índia e quinto grupo pelos demais tratamentos. No CI, repetiu-se a formação do alho no segundo grupo de maior inibição do crescimento, seguido do terceiro grupo com cravo-da-índia, orégano e pitangueira. O quarto grupo foi formado pelos demais tratamentos (Tabela 6).

**Tabela 6** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato aquoso quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato quente	
	Contato direto	Contato indireto
Testemunha	8,88 aA*	9,00 aA
Alecrim	5,23 dB	9,00 aA
Alho	3,87 eB	5,88 cA
Cravo-da-índia	6,34 cB	8,11 bA
Losna	7,73 bA	9,00 aA
Orégano	7,58 bA	7,78 bB
Pitangueira	7,41 bA	7,96 bA
Químico	0,50 fA	0,50 dA
CV (%)	8,64	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao se comparar os métodos de aplicação, o extrato quente formou grupo mais efetivo com alecrim, alho e cravo-da-índia via CD e, com alho por meio indireto. Nos demais, não houve diferença entre as médias segundo sua forma de aplicação (Tabela 6).

Observou-se que com a utilização dos extratos quente o alecrim obteve-se melhor resultado no CD do que no CI, e também não foi observado no extrato frio., Isso provavelmente ocorreu devido a temperatura da água ter auxiliado na extração das substâncias como monoterpenos que afetam a inibição do crescimento e germinação dos conídios de *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* (TSAO; ZHOU, 2000).

Além disso, Toubá; Zakaria; Tahereh (2012), analisaram a preparação de extratos a frio e quente, observando que a extração com água fria foi mais eficaz do que a com água quente no controle dos patógenos *Phoma exigua*, *Fusarium nygamai* e *Rhizoctonia solani*.

O CD pode ter sido mais eficiente pelo fato dos monoterpenos e sesquiterpenos, terem menor massa molecular, apresentarem volatilidade acentuada. Desta forma, sendo menos eficiente no CI (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014), enquanto moléculas de tamanho superior aos sesquiterpenos possuem baixa volatilidade (MENDES-PINTO, 2009), interferindo no controle do fungo devido ao extrato não estar em CD.

Segundo Oliveira et al. (2011) o mecanismo de ação dos monoterpenos causa efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular, possuindo variações na

ação fungicida, pois dependem da solubilidade e da capacidade de interação com a membrana citoplasmática. A hidrofobicidade destes compostos permite a interação entre o OE e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura, para que ocorra a penetração na parede celular dos fungos à base de quitina (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011).

Também é necessário que os compostos possuam certa lipofilicidade, a fim de inibir as reações enzimáticas da membrana plasmática, pois as enzimas metabolizadoras geralmente apresentam sítio de ligação lipofílico e aceitam moléculas lipofílicas e, com isso conseguem se movimentar através da membrana celular (BAKKALI et al., 2008; KIANI; JABEEN, 2019)

Torna-se importante salientar que a temperatura utilizada na preparação dos extratos influencia na ação biológica destes, visto que muitos compostos antifúngicos são termossensíveis, ocorrendo sua decomposição (YIN; TSAO, 1999), como relatado por Venturoso et al. (2010) ao autoclavarem extratos de alho.

A extração com o uso de álcool 70% (extrato hidroalcoólico) (Apêndice 12) (Tabela 7), permitiu a formação de três grupos em ambas as formas de aplicação dos tratamentos. Com uso do CD, o grupo de maior controle no crescimento micelial foi formado pelo tratamento químico, alho e cravo-da-índia. O alecrim formou o segundo grupo e o terceiro grupo ficou composto por orégano e pitangueira. Com o contato indireto, o grupo de menor crescimento micelial foi composto somente pelo químico, com o segundo formado por alho e o terceiro pelos demais.

**Tabela 7** - Crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de preparados com álcool (extrato hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

<b>Extrato hidroalcoólico</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Contato direto</b>	<b>Contato indireto</b>
<b>Testemunha</b>	8,73 Aa*	9,00 aA
<b>Alecrim</b>	5,49 dB	8,61 aA
<b>Alho</b>	0,63 eB	6,35 bA
<b>Cravo-da-índia</b>	0,50 eB	8,48 aA
<b>Losna</b>	8,00 bB	8,83 aA
<b>Orégano</b>	6,53 cB	8,57 aA
<b>Pitangueira</b>	6,88 cB	8,92 aA
<b>Químico</b>	0,50 eA	0,50 cA
<b>CV (%)</b>	8,23	

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que o cravo-da-índia apresentou melhor resultado no contato direto, não diferindo do controle químico para inibição do crescimento micelial, o que pode ser devido a capacidade do álcool de se ligar aos compostos polares e apolares e, desta forma conseguir retirar concentrações maiores de substâncias das inflorescências.

Comparando-se ambas formas de aplicação dos tratamentos, o CD mostrou-se mais eficiente que o indireto com uso do extrato hidroalcoólico para todos os tratamentos utilizados a base de plantas (Tabela 7).

Isso pode ser devido aos flavonoides presentes nos extratos hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia (Tabela 3). Os monômeros catequina e epicatequina podem formar oligômeros e polímeros, gerando as proantocianidinas. Estes polímeros podem ser despolimerizados pela ação de ácidos, gerando compostos como as antocianidinas (TSAO, 2010), ou seja, formam moléculas maiores dificultando a volatilização e controle do patógeno.

Pode-se observar ao avaliar o crescimento micelial conforme o tipo de extração e de contato que os tratamentos à base de plantas contêm componentes fungicidas em diferentes concentrações, tendo geralmente um majoritário (SIMÕES; SPITZER, 2000). Porém, esse controle pode ser devido ao sinergismo que ocorre entre os constituintes de menor quantidade presentes na planta que possuem efeito antimicrobiano (COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011; HOYOS et al., 2012). Além disso, pode ocorrer casos em que essas substâncias não foram extraídas de forma efetiva ou não foram liberadas adequadamente para controlar o patógeno, necessitando diferentes métodos de extração ou de contato para que sejam efetivos.

Nesta primeira etapa de avaliação dos tratamentos quanto ao crescimento micelial, observou-se que de maneira geral, os OE foram mais eficientes no controle, o que pode ser em decorrência por serem aromáticos e liberarem maior quantidade de compostos secundários como fenólicos, monoterpênicos e terpenóides, que inativam o desenvolvimento ou causam má formação na parede ou membranas do fungo (RASOOLI et al., 2006; GILLES et al., 2010).

#### 4.1.4 Inibição do Crescimento Micelial (ICM)

Ao ser avaliada a inibição do crescimento micelial (%) (ICM) obteve-se interação significativa para os tratamentos x tempo (dias) em ambas as formas de

contato (direto e indireto) (Apêndices 13 ao 20) (Tabelas 8, 10, 12 e 14 e; 9, 11, 13 e 15, respectivamente).

A avaliação de tais respostas tornam-se importantes, uma vez que, a partir delas ter-se-á noção do efeito de cada tratamento quanto ao início de sua eficácia para inibição do controle micelial, bem como, sua persistência ao longo do tempo, visto que um fruto após colhido necessita de tempo até chegar ao consumidor.

No primeiro dia, o grupo de maior inibição por meio do CD envolveu todos os tratamentos, com exceção da testemunha (água). Do segundo até o sétimo dia, os tratamentos de maior inibição foram o alho, cravo-da-índia, orégano e químico (Tabela 8). Tal comportamento mostra permanência da ação dos tratamentos ao longo dos dias.

Todavia, o tratamento com alecrim via CD teve no segundo dia maior inibição, juntamente com alho, cravo-da-índia e orégano, ou seja, o efeito esperado começou a ocorrer após um tempo, diferente da losna que as médias entre os dias não diferiram estatisticamente entre si e, com a pitangueira somente houve diferença no sétimo dia (Tabela 8).

**Tabela 8** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial (CD)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 cA	0,00 eA	0,00 eA	0,00 eA	0,00 cA	0,00 cA
Alecrim	37,62 aB	70,14 aA	47,90 bB	60,73 bA	47,87 bB	36,09 bB	6,86 cC
Alho	37,62 aC	71,52 aB	82,23 aA	86,54 aA	89,19 aA	93,07 aA	93,77 aA
Cravo-da-índia	37,62 aC	71,52 aB	82,25 aA	86,54 aA	89,19 aA	93,07 aA	93,77 aA
Losna	26,82 aA	28,84 bA	16,52 dA	16,83 dA	19,64 dA	28,05 bA	37,62 bA
Orégano	37,62 aC	71,52 aB	82,23 aA	86,54 aA	89,19 aA	93,07 aA	93,77 aA
Pitangueira	31,94 aA	38,19 bA	29,14 cA	33,86 cA	30,27 cA	46,24 bA	1,78 cB
Químico	37,62 aC	71,52 aB	82,23 aA	86,54 aA	89,19 aA	93,07 aA	93,77 aA
CV (%)	25,11						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O uso de OE por CI permitiu agrupar os tratamentos com maior inibição do crescimento micelial no primeiro dia com alho, cravo-da-índia, losna, orégano e controle químico. Do segundo ao sétimo dia manteve-se mesmo agrupamento de maior inibição com os mesmos tratamentos descritos, com exceção para losna. O alecrim, losna e pitangueira formaram o segundo maior grupo de inibição do

crescimento micelial do segundo ao sétimo dia, com exceção do dia 3, em que o alecrim e a losna formaram o terceiro grupo de inibição (Tabela 9).

**Tabela 9** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 cA*	0,00 cA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA
Alecrim	24,10 bA	25,69 bA	26,47 cA	28,76 bA	17,52 bA	22,28 bA	12,26 bA
Alho	37,62 aC	70,13 aB	82,23 aA	86,54 aA	88,14 aA	93,05 aA	93,68 aA
Cravo-da-índia	37,62 aC	70,13 aA	82,23 aA	86,54 aA	88,14 aA	93,05 aA	93,68 aA
Losna	37,62 aA	25,69 bB	24,00 cB	20,71 bB	20,68 bB	20,22 bB	19,34 bB
Orégano	37,62 aC	70,13 aB	82,23 aA	86,54 aA	88,14 aA	93,05 aA	93,68 aA
Pitangueira	26,24 bA	32,63 bA	35,75 bA	32,87 bA	19,40 bB	19,32 bB	8,81 bA
Químico	37,62 aC	70,13 aB	82,23 aA	86,54 aA	88,14 aA	93,05 aA	93,68 aA
CV (%)	21,92						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O que pode ser observado nas Tabelas 8 e 9 foi que, tanto o CD quanto CI permitiram, em alguns tratamentos (alho, cravo-da-índia e orégano), inibição acima de 90% do crescimento micelial, o que se mostra promissor o uso destes óleos para aplicação em frutos.

A utilização de OE em biofilmes apresentou variação da atividade antimicrobiana em diferentes concentrações e um efeito geral de melhoria da vida útil, mantendo a qualidade dos frutos de morango (RAHMAWATI et al., 2017). Os biofilmes podem reduzir a perda de peso, taxa de respiração, atividade de enzimas antioxidantes como catalase e polifenoloxidase, atrasando a decomposição, conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável, além de diminuir o desenvolvimento de patógenos e estender a vida útil dos morangos (SHEHATA et al., 2020).

A atividade antimicrobiana dos OE pode ser relacionada aos seus compostos químicos, como os compostos fenólicos, terpenos, cetonas, álcoois alifáticos, ácidos e aldeídos, nos quais são capazes de inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e prevenir a deterioração dos frutos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Assim, os OE de alho, cravo-da-índia e orégano demonstraram capacidade para serem utilizados como biofilme, visto que possuem eficiência antifúngica.

Com uso do extrato a frio CD, formou-se no primeiro dia, o grupo de maior inibição no crescimento micelial composto pelos tratamentos com alecrim, alho, cravo-da-índia, pitangueira e químico. No terceiro e quarto dia, o grupo de maior inibição foi

composto pelo alecrim, alho e químico, ficando no segundo dia apenas alho e o químico. Nos demais dias o alho formou o segundo grupo de maior inibição, diferenciando-se apenas do tratamento químico (Tabela 10).

**Tabela 10** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato frio (CD)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 dA	0,00 cA	0,00 eA	0,00 fA	0,00 fA	0,00 eA
Alecrim	32,89 aB	39,53 bB	74,53 aA	78,79 aA	19,58 eC	8,14 fD	6,45 eD
Alho	32,89 aD	59,28 aC	84,04 aA	87,42 aA	75,36 bB	72,69 bB	68,54 bB
Cravo-da-índia	32,89 aB	12,95 cC	37,63 bB	48,92 bA	60,56 cA	59,55 cA	56,14 cA
Losna	4,37 bB	6,21 dB	8,23 cB	21,10 dA	16,05 eA	22,54 eA	22,18 dA
Orégano	10,04 bB	12,12 cB	6,13 cB	32,50 cA	12,28 eB	12,55 fB	14,32 dB
Pitangueira	25,60 aB	15,26 cC	28,94 bB	36,85 cA	47,83 dA	39,07 dA	27,12 dB
Químico	32,89 aC	59,28 aB	84,04 aA	87,18 aA	90,26 aA	91,87 aA	92,48 aA
CV (%)	27,59						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Venturoso et al. (2011) testaram diferentes extratos aquosos a frio no controle de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *C. kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *F. solani* e *Phomopsis* sp., observando que a maior inibição ocorreu com EV de alho e cravo-da-índia a partir do terceiro dia de incubação e até o 12º dia.

Pelo CI o uso do extrato a frio no primeiro dia agrupou como tratamentos de maior inibição do crescimento micelial o extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna e químico. Tal agrupamento não manteve-se nos demais dias, uma vez que, do segundo ao sétimo dia, o grupo de maior controle foi composto por alho e químico (Tabela 11).

**Tabela 11** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato frio (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 CA*	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 cA
Alecrim	34,39 aA	17,87 bA	14,97 bA	18,52 bA	18,21 cA	17,50 bA	14,16 bA
Alho	34,39 aA	63,42 aA	71,72 aA	69,57 aA	66,37 aA	64,80 aA	52,59 aA
Cravo-da-índia	34,39 aA	16,06 bB	11,62 bB	18,63 bB	15,87 cB	20,44 bA	13,33 bA
Losna	34,39 aA	12,11 bB	16,45 bB	33,69 aA	27,68 bA	31,25 bA	15,37 bB
Orégano	10,43 bA	8,45 bA	13,18 bA	8,59 bA	20,01 bA	16,73 bA	19,35 bA
Pitangueira	25,59 bA	10,64 bA	10,58 bA	14,87 bA	5,62 cA	9,41 bA	0,00 cB
Químico	34,39 aA	63,42 aA	83,94 aA	87,12 aA	90,36 aA	92,33 aA	92,77 aA
CV (%)	24,29						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de

agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Souza (2010) analisou os compostos voláteis presentes no extrato aquoso de alho e observou que ocorreu aumento na inibição do crescimento micelial de *A. niger* proporcionalmente a concentração utilizada. Também descreveu que estes compostos têm ação fungitóxica, pois o crescimento micelial e a esporulação foram reduzidos com o tratamento com extrato de alho nas concentrações acima de 10% em CI.

Tal análise ao longo do tempo torna-se necessária, uma vez que, primeiro alguns tratamentos podem manifestar determinada inibição a posteriori da aplicação e outras imediatamente, mas sem contudo, manterem tal comportamento ao longo dos dias, conforme pode ser visualizado nos tratamentos de forma individual (Tabelas 10 e 11). Essa redução pode ser atribuída pela perda da eficiência dos constituintes presentes nos EV ou OE, devido a instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais modificando a atmosfera no interior das placas de Petri® (SIMÕES; SPITZER, 2000).

Todavia, diferente da aplicação dos OE (Tabelas 8 e 9), com o extrato frio (Tabelas 10 e 11), não foi possível obter valores inibitórios do crescimento micelial acima de 90%. Como mencionado anteriormente, isso pode ser devido à água fria utilizada na produção dos extratos não conseguir extrair de forma eficiente os compostos antifúngicos presentes nas plantas, pois a extração a frio geralmente é processo mais lento e desta forma deveria ter sido deixado maior tempo de descanso antes da filtração ou também pode ter ocorrido pelas plantas possuírem constituintes não solúveis em água fria.

A mesma faixa de valores (abaixo de 90%) quanto a inibição do crescimento micelial também ocorreu com uso do extrato quente, tanto por contato direto (Tabela 12) quanto indireto (Tabela 13).



**Tabela 12** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Quente (CD)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 cA	0,00 eA	0,00 dA	0,00 fA	0,00 eA	0,00 fA
Alecrim	26,88 aD	48,43 aC	81,68 aA	86,29 aA	66,28 bB	68,88 bB	41,08 cC
Alho	26,88 aC	47,67 aB	67,61 bA	63,50 bA	63,31 bA	70,08 bA	56,55 bA
Cravo-da-índia	26,88 aC	54,75 aB	83,82 aA	76,47 aA	54,16 cB	46,22 cB	41,08 cC
Losna	26,88 aC	12,44 bD	50,73 cA	59,53 bA	53,78 cA	41,61 cB	34,17 dC
Orégano	26,88 aA	16,32 bB	24,65 dA	31,80 cA	13,39 eB	20,50 dB	14,69 eB
Pitangueira	19,00 aC	17,54 bC	44,88 cB	57,74 bA	34,47 dB	37,11 cB	16,64 eC
Químico	26,88 aC	54,75 aB	83,82 aA	87,94 aA	91,21 aA	93,92 aA	94,36 aA
CV (%)	24,39						

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 13** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Quente (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 eA	0,00 dA	0,00 dA
Alecrim	34,39 aA	17,92 bA	32,66 bA	38,22 bA	47,54 bA	39,93 bA	0,00 dB
Alho	34,39 aA	26,36 bA	36,56 bA	46,53 bA	32,54 bA	43,55 bA	34,62 bA
Cravo-da-índia	34,39 aA	31,03 bA	20,27 bA	22,93 bA	13,64 dB	15,14 cA	9,81 cB
Losna	34,39 aA	38,05 bA	28,38 bA	37,81 bA	28,86 bA	15,85 cB	0,00 dC
Orégano	34,39 aA	28,00 bA	27,48 bA	34,88 bA	27,24 bA	21,53 cA	13,51 cA
Pitangueira	25,59 aB	24,17 bA	18,36 bA	20,21 bA	27,37 bA	34,38 bA	11,48 cB
Químico	34,39 aB	62,09 aA	83,78 aA	87,87 aA	91,00 aA	93,45 aA	94,44 aA
CV (%)	16,13						

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O que se observou em ambas as formas de contato (Tabelas 12 e 13) pelo uso do extrato quente foi que no primeiro dia todos os tratamentos formaram único grupo. Pelo contato direto, no segundo dia, o grupo de maior inibição foi composto pelo alecrim, alho, cravo-da-índia e químico. No terceiro e quarto dia, o grupo de maior controle foi composto por alecrim, cravo-da-índia e químico, mantendo-se o alecrim e químico, juntamente com alho no sexto dia. Do quinto ao sétimo dia houve o agrupamento de único tratamento, o químico, como aquele de maior inibição, sendo que no sétimo dia o alho foi agrupado no segundo maior grupo de inibição, alcançando 56,55% o crescimento do fungo em relação ao grupo da testemunha (Tabela 12).

Quando verificado o uso do extrato quente por via indireta, do segundo ao quarto dia, formou-se um segundo agrupamento com todos os EV utilizados. No quinto dia houve a exceção do tratamento com cravo-da-índia, no sexto dia este grupo

continuou formado por alecrim, alho e pitangueira, sendo que apenas o alho manteve a inibição até sétimo dia (Tabela 13), resultado este que divergiu do comportamento obtido com os demais descritos nas tabelas anteriores, em que o controle químico esteve no grupo de maior inibição isoladamente após o segundo dia de avaliação.

A utilização tanto da água em ebulição como de água fria para a fabricação dos extratos mostrou-se ineficiente em relação aos demais tratamentos, demonstrando capacidade inferior da extração dos compostos secundários das plantas. Além disso, o uso da água em temperatura elevada (98 °C) pode propiciar a perda de princípios ativos termolábeis.

A infusão de extratos aquosos de alecrim, alho, cravo-da-índia, orégano sobre o desenvolvimento *in vitro* de *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme* foram testadas por Marcondes et al. (2014), onde destacaram a eficiência dos EV de alho e cravo-da-índia na inibição do crescimento micelial, número e germinação de conídios.

Com o uso do extrato hidroalcoólico por CD obteve-se em alguns tratamentos inibição acima de 90% (Tabela 14), fato que não se manteve com mesma resposta ao adotar o CI (Tabela 15). Isso demonstra que os metabólitos secundários presentes no extrato precisam estar em contato com o patógeno, pois não são volatilizados de forma eficiente ao ponto de controlar o fungo.

No primeiro dia, por meio do extrato hidroalcoólico via CD formou-se único grupo, com exceção da testemunha com água. Do segundo ao sétimo dia, o grupo com melhores resultados foi formado por alho, cravo-da-índia e controle químico. Todos estes três tratamentos começaram a mostrar maior efeito inibitório a partir do terceiro dia (Tabela 14).

**Tabela 14** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Hidroalcoólico CD						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 eA	0,00 eA	0,00 d	0,00 dA	0,00 eA	0,00 eA
Alecrim	23,31 aC	58,04 bA	40,67 cB	31,31 bC	36,10 bB	41,93 bB	37,66 bB
Alho	23,31 aC	73,78 aB	84,46 aA	88,35 aA	91,16 aA	93,21 aA	92,81 aA
Cravo-da-índia	23,31 aC	73,78 aB	84,46 aA	88,35 aA	91,16 aA	93,82 aA	94,32 aA
Losna	17,72 aA	19,70 dA	2,62 eB	14,97 cA	7,74 dB	11,87 dB	9,16 dB
Orégano	23,31 aC	51,48 bA	54,00 bA	35,92 bB	31,02 bB	34,94 bB	25,91 cC
Pitangueira	20,10 aC	37,29 cA	16,85 dC	12,10 cC	15,85 cC	26,09 cB	21,84 cC
Químico	23,31 aC	73,78 aB	84,46 aA	88,35 aA	91,71 aA	93,82 aA	94,32 aA
CV (%)	16,74						

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de

agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Por meio do contato indireto, com mesmo extrato (hidroalcoólico) houve no primeiro dia a formação de dois grupos, mas o de maior eficiência para inibição do crescimento micelial foi formado por alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e químico. No segundo dia, o grupo de maior controle envolveu os tratamentos alho, cravo-da-índia e químico, ficando do terceiro ao sétimo dia somente com o químico, presente no grupo de melhor resultado (Tabela 15).

**Tabela 15** - Inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Hidroalcoólico (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 bA*	0,00 cA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Alecrim	37,00 aA	19,05 bA	13,09 cA	14,64 bA	10,26 bA	10,14 bB	4,26 cC
Alho	37,00 aA	42,64 aA	28,73 cA	28,23 bA	37,97 aA	37,47 aA	29,44 bA
Cravo-da-índia	37,00 aA	28,36 aA	9,05 cB	7,84 bB	5,93 bB	9,97 bB	5,74 cB
Losna	37,00 aA	9,89 bA	17,79 cA	12,60 bA	8,27 bA	8,22 bA	1,85 dB
Orégano	16,04 aA	18,47 bA	27,60 bA	14,26 bB	13,19 bA	9,58 bB	4,82 cB
Pitangueira	28,00 bA	7,75 bB	4,75 cB	19,86 bA	8,98 bB	5,87 bB	0,92 dC
Químico	37,00 aA	63,58 aA	84,64 aA	88,55 aA	91,75 aA	93,85 aA	94,44 aA
CV (%)	29,95						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao analisar os dados em relação a utilização de água fria, quente e o álcool 70% para extração dos princípios antifúngicos das plantas, nota-se que a água fria possuiu a menor eficiência, seguida por água quente e hidroalcoólico com maior eficiência para o contato direto, o que corroborou com Saldanha (2005) em que a utilização de solventes possibilitou a extração de compostos com maior polaridade no extrato aquoso e compostos polares e apolares com extratos etanólicos. Desta forma, a utilização do extrato hidroalcoólico é capaz de extrair tanto compostos com polaridades diferentes, tendo vantagem na extração.

Assim como os dados observados para inibição do crescimento micelial, Celoto et al. (2008) também observaram que os EV hidroalcoólicos foram mais eficientes sobre a inibição do crescimento e germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* em relação aos extratos fabricados com água quente. Quando os extratos foram autoclavados, o processo de aumento de temperatura diminuiu a eficiência dos mesmos.

Chaicouski et al. (2014) também observaram que a elevação da temperatura da água promoveu a evaporação dos compostos fenólicos de *Ilex paraguariensis*, sendo que somente a água quente não foi suficiente para a extração dos compostos, sendo necessário solução hidroalcoólica para a completa extração.

#### 4.1.5 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)

Houve interação significativa quanto ao tipo de tratamento x tempo para o índice de velocidade de crescimento micelial por meio dos contatos direto (Apêndices 21, 23, 25 e 27) (Tabelas 16, 18, 20 e 22) e indireto (Apêndices 22, 24, 26 e 28) (Tabelas 17, 19, 21 e 23).

Quanto a este índice, os tratamentos via contato direto, no primeiro dia, formaram único grupo, uma vez que não houve crescimento micelial, diferente do que ocorreu nos demais dias. No segundo dia, o grupo de menores médias foi formado pelo alecrim, alho, cravo-da-índia, orégano e químico e, no terceiro ao sétimo dia envolveu a formação do grupo com alho, cravo-da-índia, orégano e químico (Tabela 16).

**Tabela 16** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial (CD)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aD*	0,87 aA	0,81 aA	0,73 aB	0,67 aB	0,83 aA	0,46 cC
Alecrim	0,00 aC	0,09 bC	0,76 aB	0,00 bC	0,71 aB	0,75 aB	0,89 aA
Alho	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Cravo-da-índia	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Losna	0,00 aA	0,82 aA	0,80 aA	0,73 aA	0,66 aB	0,69 aB	0,62 cB
Orégano	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Pitangueira	0,00 aE	0,75 aB	0,66 bC	0,66 aC	0,54 bD	0,55 bD	0,89 aA
Químico	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
CV (%)	35,33						

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Importante enfatizar que, os tratamentos dos OE por CD utilizando alho, cravo-da-índia, orégano e químico não apresentaram índice de velocidade de crescimento micelial, ou seja, controlaram o estabelecimento e a velocidade de colonização deste fungo, assim como pode ser observado na inibição do crescimento micelial.

Resultados semelhantes aos apresentados na Tabela 16 foram observados por Ramos et al., (2016) que ao utilizarem óleo de cravo-da-índia na concentração 6,25% obtiveram atividade fungicida sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*. Romero et al. (2015) ao avaliarem o OE de orégano, verificaram que a partir de 500 mg L<sup>-1</sup> houve inibição completa do crescimento micelial e germinação de esporos de *Corynespora cassicola*, *Fusarium sp.*, *C. gloeosporioides* e *R. solani*.

Quando observado o CI, se obteve mesmo comportamento ocorrido no primeiro dia por meio do contato direto, tendo único grupo formado por todos os tratamentos já que não houve crescimento micelial (Tabela 17). A partir do segundo até o sétimo dia obteve formação de dois a quatro grupos, mas o de menor índice de crescimento micelial ocorreu com composto de alho, cravo-da-índia, orégano e químico, todos estes com média zero, ou seja, sem índice.

**Tabela 17** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC*	0,86 aA	0,81 aA	0,73 aA	0,61 aB	0,85 aA	0,54 cB
Alecrim	0,00 aC	0,88 aA	0,68 bB	0,72 aB	0,64 aB	0,73 bB	0,83 aA
Alho	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA
Cravo-da-índia	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA
Losna	0,00 aD	0,84 aA	0,92 aA	0,72 aB	0,68 aB	0,64 cB	0,53 cC
Orégano	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA
Pitangueira	0,00 aC	0,83 aA	0,77 bA	0,76 aA	0,64 aB	0,55 cB	0,71 bA
Químico	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA
CV (%)	29,56						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se que os compostos voláteis presentes nos OE, conseguem inibir a velocidade de crescimento do patógeno e como são misturas de substâncias, ocorre o sinergismo destas, causando toxicidade ao patógeno por meio da ação presente na composição como os compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides (GILLES et al. 2010).

Conforme BAKKALI et al. (2008) a inibição que os óleos essenciais causam sobre os fungos se deve a sua característica lipofílica, sendo que a hidrofobicidade do OE permite interação com os lipídeos causando danos na membrana celular, alterações na estrutura, deixando-as solúveis, expondo o conteúdo celular (COSTA et al., 2011), interrompendo e alterando sua fluidez e permeabilidade (BARD et al., 1988).

Além disso, atuam em diferentes mecanismos de sobrevivência e reprodução, muitas vezes inibindo a síntese de DNA e RNA ou ainda interferindo na respiração celular (HARRIS, 2001).

O OE de cravo-da-índia utilizado neste experimento possui compostos, como eugenol (61,2%),  $\beta$ -cariofileno (31,2%) e acetato de eugenila (3,4%). Resultados semelhantes foram observados por Costa et al. (2011) através de análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa, em que detectaram a presença de eugenol (83,6%), acetato de eugenila (11,6%) e cariofileno (4,2%), com ação sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos analisados.

Além disso, os mesmos autores realizaram avaliação microscópica dos micélios dos fungos e observaram diversas alterações morfológicas, como a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas. O OE de cravo-da-índia apresentou atividade fungicida na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. solani*, não tendo mesma atividade sobre *M. phaseolina*.

O uso do extrato com água fria, via CD, permitiu no segundo e quinto dia agrupar o alho e o controle químico no grupo de menor índice de crescimento micelial. No terceiro dia o grupo de menor crescimento foi formado pelo alho, cravo-da-índia, pitangueira e químico, ficando estes dois últimos juntamente com cravo-da-índia no quinto dia, com mesma resposta de controle (Tabela 18). No sexto e sétimo dia, os resultados permitiram a formação de dois grupos segundo suas médias de índice de crescimento micelial, mas em ambas o controle químico formou único grupo pela resposta de maior controle.

**Tabela 18** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato frio (CD)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC*	0,76 bB	0,91 aA	0,76 aB	0,65 bB	0,75 aB	0,70 aB
Alecrim	0,00 aD	0,64 bB	0,19 bC	0,29 cC	1,00 aA	0,64 aB	0,72 aB
Alho	0,00 aB	0,00 cB	0,00 cB	0,08 dB	0,69 bA	0,62 aA	0,59 aA
Cravo-da-índia	0,00 aC	0,93 aA	0,08 cC	0,46 bB	0,17 cC	0,64 aB	0,55 aB
Losna	0,00 aC	0,93 aA	0,76 aB	0,73 aB	0,70 bB	0,67 aB	0,64 aB
Orégano	0,00 aD	1,00 aA	0,83 aB	0,71 bC	0,67 bC	0,69 aC	0,64 aC
Pitangueira	0,00 aD	0,95 aA	0,00 cD	0,60 bC	0,00 cD	0,77 aB	0,74 aB
Químico	0,00 aA	0,00 cA	0,00 cA	0,16 dA	0,07 cA	0,15 bA	0,14 bA
CV (%)	29,24						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tal comportamento repetiu-se, pela aplicação de mesmo extrato por via CI, uma vez que o químico permaneceu único e com menor índice do terceiro ao sétimo dia. A exceção ocorreu no segundo e terceiro dia com a inclusão do alho no grupo de menor índice juntamente com o químico e da pitangueira no sétimo dia que se destacou dos demais tratamentos formando grupo isolado (Tabela 19).

**Tabela 19** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água fria (extrato frio) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato frio (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aB*	0,79 aA	0,89 aA	0,75 aA	0,78 bA	0,77 aA	0,68 aA
Alecrim	0,00 aC	0,86 aA	0,85 aA	0,62 bB	0,75 bA	0,77 aA	0,70 aB
Alho	0,00 aB	0,00 bB	0,65 bA	0,61 bA	0,65 bA	0,66 aA	0,61 aA
Cravo-da-índia	0,00 aD	0,82 aA	0,90 aA	0,60 bC	0,76 bB	0,74 aB	0,73 aB
Losna	0,00 aC	0,90 aA	0,81 aA	0,58 bB	0,67 bB	0,71 aB	0,68 aB
Orégano	0,00 aE	0,96 aA	0,83 aB	0,76 aC	0,71 bC	0,66 aC	0,57 aD
Pitangueira	0,00 aD	0,89 aA	0,90 aA	0,61 bB	0,91 aA	0,67 aB	0,32 bC
Químico	0,00 aB	0,00 bB	0,00 cB	0,06 cA	0,07 cB	0,15 bA	0,14 cA
CV (%)	19,92						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isso mostrou que os tratamentos aplicados por meio dos extratos de água fria tiveram médias com comportamentos distintos, seja via direta ou indireta, mas o único que manteve controle deste índice até o sétimo dia foi o químico (Tabelas 18 e 19). Relacionando estes resultados com análise de regressão (Figuras 8B e 9B) observa-se que o extrato frio de alho obteve sua eficiência máxima do terceiro para o quarto

dia no CD e segundo para o terceiro no CI e, conseqüentemente entre estes dias o menor IVCM.

O uso do extrato quente por CD teve no segundo dia a formação de cinco grupos, estando no de menor IVCM os tratamentos cravo-da-índia e químico, no terceiro dia por alecrim, cravo-da-índia e químico, no quarto pelo alecrim e químico e, a partir do quinto dia pelo químico, reforçando sua eficiência sobre o fungo (Tabela 20).

**Tabela 20** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Extrato Quente (CD)							
Tratamentos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC*	0,66 cB	0,91 aA	0,77 aA	0,73 aB	0,81 aA	0,61 bB
Alecrim	0,00 aD	0,36 dC	0,00 dD	0,00 dD	0,76 aA	0,62 bB	0,76 aA
Alho	0,00 aC	0,48 dB	0,65 bA	0,66 aA	0,63 aA	0,48 cB	0,71 bA
Cravo-da-índia	0,00 aB	0,00 eB	0,00 dB	0,65 aA	0,76 aA	0,79 aA	0,70 bA
Losna	0,00 aC	0,85 bA	0,09 dC	0,44 bB	0,71 aA	0,80 aA	0,76 aA
Orégano	0,00 aD	1,00 aA	0,86 aB	0,69 aC	0,70 aC	0,67 bC	0,67 bC
Pitangueira	0,00 aC	0,87 bA	0,26 cB	0,32 cB	0,82 aA	0,74 aA	0,79 aA
Químico	0,00 aA	0,00 eA	0,00 dA	0,00 dA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA
CV (%)	24,16						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Esses resultados divergem dos obtidos por Devi et al. (2017), que verificaram a inibição de 100% no crescimento de *Alternaria solani* com concentrações de 3 e 4% do extrato de alho. Além disso, os autores também observaram inibição total da esporulação do patógeno em todas as concentrações avaliadas. O uso da infusão de cravo-da-índia na concentração 10%, apresentou menor IVCM e crescimento micelial, conseqüentemente maior percentual de inibição de *M. fructicola* (FONTANA et al., 2017).

Tal eficiência também pode ser observada por meio do mesmo extrato via CI, em que o controle químico formou o grupo de menor índice de velocidade de crescimento micelial do segundo ao sétimo dia (Tabela 21).



**Tabela 21** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com água quente (extrato quente) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Quente (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aB*	0,78 bA	0,89 aA	0,76 aA	0,74 aA	0,78 aA	0,71 aA
Alecrim	0,00 aC	0,76 bA	0,75 aA	0,52 bB	0,00 bC	0,75 aA	0,90 aA
Alho	0,00 aD	0,72 bA	0,59 bB	0,40 bC	0,74 aA	0,55 bB	0,69 aA
Cravo-da-índia	0,00 aC	0,97 aA	0,70 bB	0,63 aB	0,71 aB	0,76 aB	0,73 aB
Losna	0,00 aC	0,70 bA	0,79 aA	0,49 bB	0,74 aA	0,82 aA	0,80 aA
Orégano	0,00 aB	0,76 bA	0,81 aA	0,66 aA	0,73 aA	0,78 aA	0,75 aA
Pitangueira	0,00 aC	0,90 aA	0,83 aA	0,55 bB	0,66 aB	0,65 bB	0,83 aB
Químico	0,00 aA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA
CV (%)	27,01						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que ocorreu menor eficiência do CI em relação ao CD, o que pode ser pelo fato dos composto majoritários não serem voláteis ou também devido à necessidade do sinergismo entre os compostos para ocorrer o controle do patógeno.

Além disso, o aumento da temperatura pode liberar os compostos que fariam o controle do fungo, como por exemplo a alicina presente no alho que, por ser composto instável sofre rápida degradação, tanto em temperatura ambiente, como em aquecimento, dando origem a outros compostos organosulfurados mais estáveis (MAJEWSKI, 2014), e que podem não ter a mesma eficiência no controle dos patógenos.

Isso também poderia explicar a diferença em relação ao OE, visto que no processo de sua obtenção, ocorre menor volatilização de compostos secundários e por ser processo mais lento comparado a produção dos EV, ocorre a retirada dos componentes da planta de forma exaustiva.

O uso do extrato hidroalcoólico por via direta permitiu no segundo e terceiro dia agrupá-lo como de menores médias os tratamentos alho, cravo-da-índia e químico. No quarto ao sétimo dia, somente manteve-se no grupo de menor média os tratamentos alho, cravo-da-índia e químico (Tabela 22).

**Tabela 22** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato direto (CD). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Hidroalcoólico CD						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aD*	0,90 aA	0,84 aB	0,76 aB	0,80 aB	0,82 aB	0,49 bB
Alecrim	0,00 aC	0,67 cB	0,81 aA	0,76 aA	0,70 aB	0,67 bB	0,64 aB
Alho	0,00 aC	0,00 dC	0,00 cC	0,00 bC	0,15 bB	0,07 cC	0,28 cA
Cravo-da-índia	0,00 aA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 aA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Losna	0,00 aC	0,92 aA	0,87 aA	0,84 aA	0,71 aB	0,67 bB	0,65 aB
Orégano	0,00 aC	0,72 cB	0,71 bB	0,79 aA	0,76 aA	0,71 bB	0,70 aB
Pitangueira	0,00 aD	0,78 bB	0,86 aA	0,78 aB	0,74 aB	0,68 bC	0,65 aC
Químico	0,00 aA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
CV (%)	16,56						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A perda da eficiência do extrato hidroalcoólico de alho quando comparado ao frio, quente e em relação ao extrato de cravo-da-índia, pode ser devido a formação de pasta pegajosa no momento da produção do extrato. Isso também pode ser explicado com os compostos fenólicos encontrados na cromatografia (Tabela 3). Além disso, esse extrato passou por processo de evaporação do álcool em banho maria, o que pode ter contribuído para liberação das substâncias voláteis e desta forma apresentou menor controle do patógeno.

Quanto ao CI, com uso do extrato hidroalcoólico, os resultados mantiveram-se como o de menor média no grupo formado exclusivamente pelo controle químico (Tabela 23), assim como já havia ocorrido com uso dos extratos frio (Tabela 19) e quente (Tabela 21).

**Tabela 23** - Índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após sete dias de exposição aos tratamentos de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e, das testemunhas água e controle químico obtidos com álcool 70% (extrato hidroalcoólico) e aplicados por contato indireto (CI). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Extrato Hidroalcoólico (CI)						
	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC	0,78 bA	0,90 aA	0,76 aA	0,79 aA	0,80 aA	0,65 aB
Alecrim	0,00 aC	0,92 aA	0,84 aA	0,73 aB	0,82 aA	0,72 aB	0,70 aB
Alho	0,00 aD	0,65 cB	0,86 aA	0,70 aB	0,53 bC	0,70 aB	0,70 aB
Cravo-da-índia	0,00 aC	0,88 bA	0,87 aA	0,80 aA	0,77 aB	0,72 aB	0,69 aB
Losna	0,00 aC	0,94 bA	0,87 aA	0,79 aB	0,78 aB	0,70 aB	0,70 aB
Orégano	0,00 aC	0,92 bA	0,62 bB	0,66 aB	0,61 bB	0,60 aB	0,70 aB
Pitangueira	0,00 aC	0,94 bA	0,86 aA	0,76 aB	0,80 aB	0,72 aB	0,68 aB
Químico	0,00 aA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA
CV (%)	17,04						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao comparar a eficiência de extrato aquoso e etanólico de alho, Daniel, Lennox e Vries (2015) observaram que o aquoso foi mais eficiente nos parâmetros analisados em CD contra os fungos *B. cinerea*, *P. expansum* e *Neofabraea alba*. Os mesmos autores analisaram a capacidade de inibição do crescimento micelial e germinação de conídios proporcionada pelos compostos voláteis do extrato aquoso, tendo como conclusão para atividade antifúngica mais potente em relação ao CD.

Esta análise não condiz com o observado neste experimento em que a utilização de extratos hidroalcoólicos em CD foram mais eficazes do que o CI. Porém, ao comparar os extratos frio e hidroalcoólico os resultados foram semelhantes com o trabalho de Daniel, Lennox e Vries (2015).

#### 4.1.6 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos Óleos Essenciais e Extratos Vegetais a *M. fructicola*

Na determinação da CMI, os diferentes preparados (OE e EV) de losna, alecrim e pitangueira não apresentaram qualquer tipo de controle nas concentrações aplicadas. Isso foi comprovado na CFM por meio do método *spot-test*, ou seja, antes da aplicação do revelador retirou-se alíquota de 5  $\mu$ L e transferiu-se para os poços no meio de cultura BDA, ocorrendo em todos crescimento do fungo (Tabela 24).

**Tabela 24** - Concentrações inibitória mínima (MIC) (%)\* e fungicida mínima (CFM) (%) dos óleos essenciais e extratos vegetais de alecrim, alho, cravo-da-india, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água contra *Monilinia fructicola* in vitro. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Métodos de extração			
	Óleo Essencial	Extrato frio	Extrato quente	Extrato hidroalcoólico
Testemunha	--	--	--	--
Alecrim	--	--	--	--
Alho	0,04	0,31	2,50	0,31
Cravo-da-india	0,16	--	--	0,31
Losna	--	--	--	--
Orégano	0,16	--	--	--
Pitangueira	--	--	--	--
Químico**			--	

\*Concentrações tomadas considerando a % inicial utilizada (10%).

\*\*Concentração recomendada para a cultura do pessegueiro: 2,4g L<sup>-1</sup> de água.

Com alho, a MIC foi utilizando OE, tendo como menor concentração o valor de 0,04% (Tabela 24), tendo efeito fungicida, pois ao ser colocado no spot-test não ocorreu o crescimento de *M. fructicola*.

Os OE de cravo-da-índia e orégano obtiveram mesmo efeito, mas na CMI de 0,16%, valor quatro vezes maior que o OE de alho (Tabela 24). Desta forma, estes resultados foram mais satisfatórios do que observado por Ramos et al. (2016) que utilizaram OE de cravo-da-índia no controle de *Colletotrichum gloesporioides*, obtendo a MIC na concentração 6,5% com efeito fungicida. Souza et al. (2010) com OE de orégano apresentou valor de CMI 80 µL/mL sobre *C. albicans* causando efeito fungicida após 4 h de exposição.

Ao ser utilizado os EV, somente com alho obteve-se efeito de inibição em todos os métodos de extração, sendo este fungistático, pois no método spot-test ocorreu o crescimento do fungo em menor velocidade quando comparado a testemunha. A MIC para o extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia foi a mesma (0,31%), porém sem efeito fungicida.

A utilização de diferentes preparações do extrato de alho demonstra que a eficiência deste é interferida pelo tipo de preparo e solvente utilizado, como no trabalho realizado por Rodrigues et al. (2009) que observaram a menor CMI dos extratos aquoso e alcoólico de bulbilhos de alho macerado sobre cepas de *Candida albicans*.

O OE de alho obteve eficiência na CFM sobre *Penicillium funiculosum*, sendo 0,125 e 0,0313% em meio ágar e meio caldo, sugerindo que o óleo de alho apresentou forte atividade antifúngica, respectivamente (LI et al., 2014).

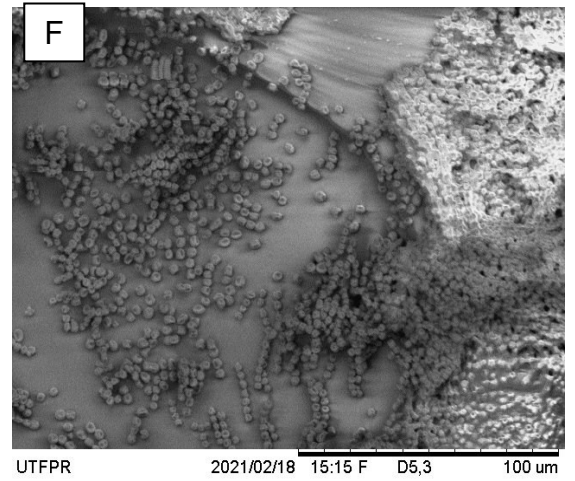
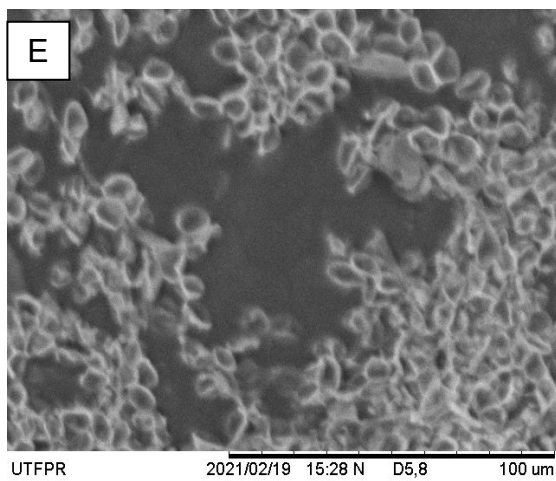
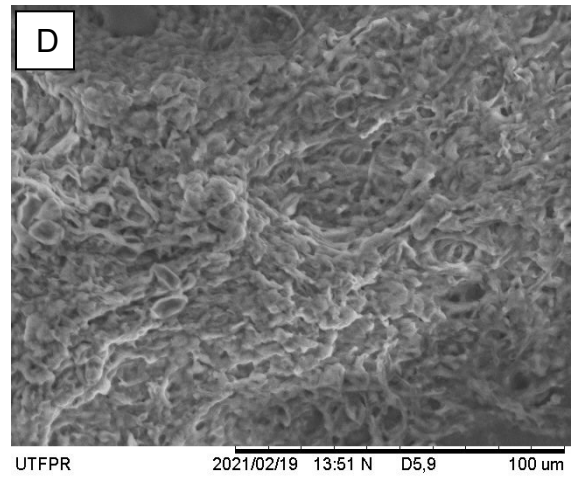
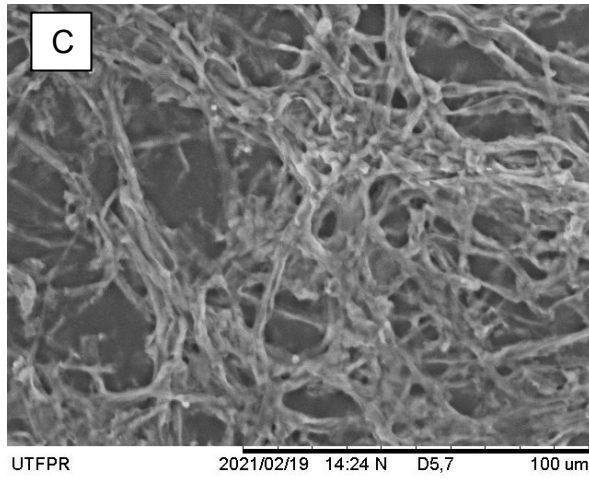
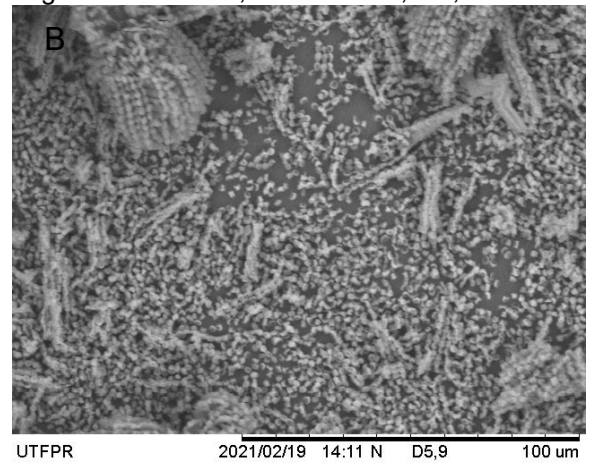
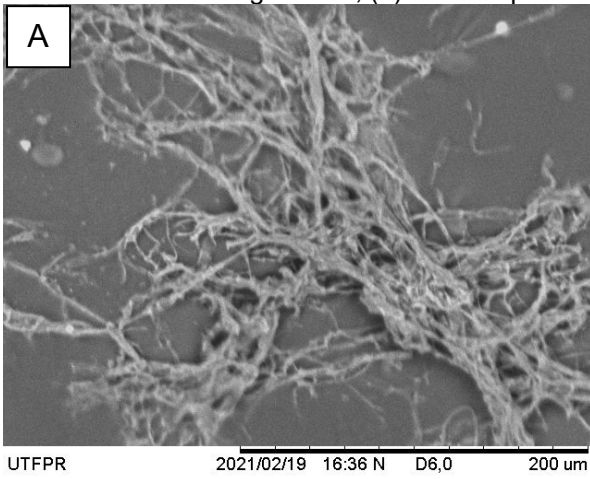
Os resultados da MIC serviram para comprovar o efeito dos tratamentos sobre o crescimento micelial *in vitro*, pois os OE e EV que não obtiveram controle eficiente, no teste da CFM permaneceram com ineficiência do controle.

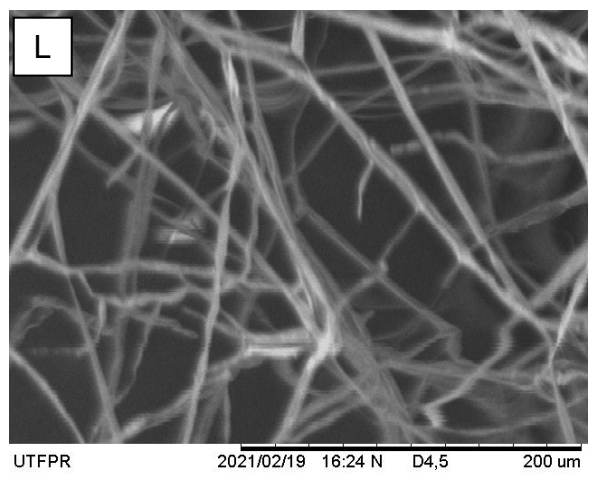
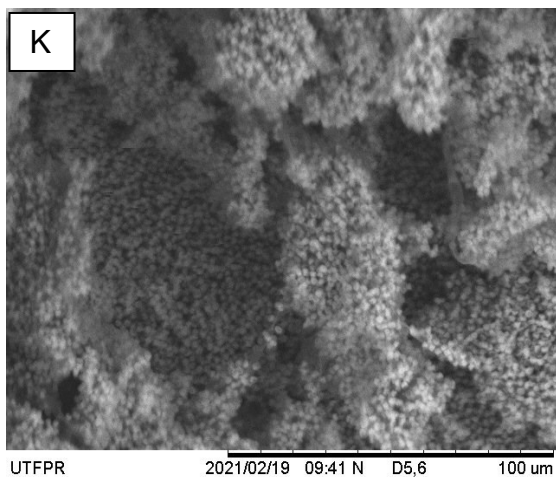
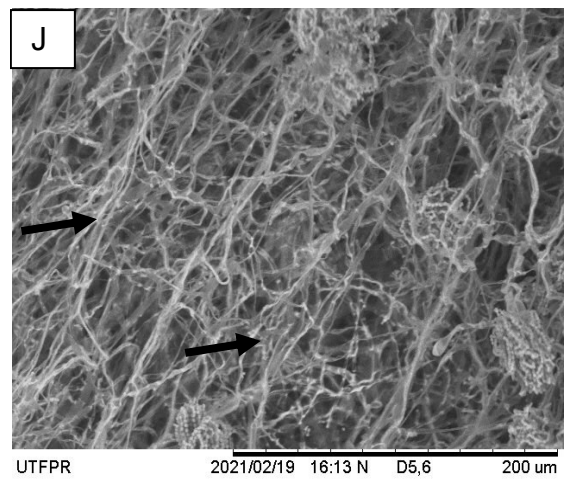
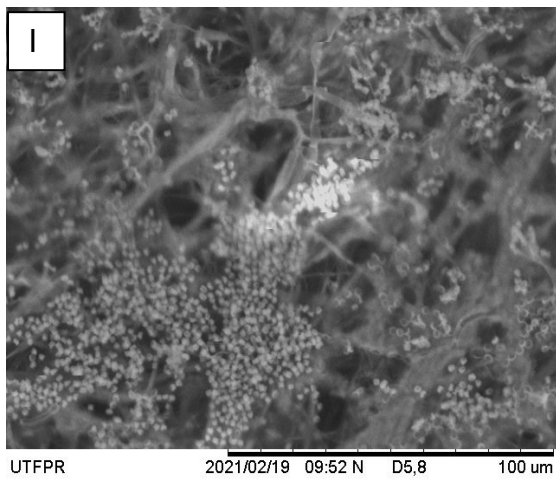
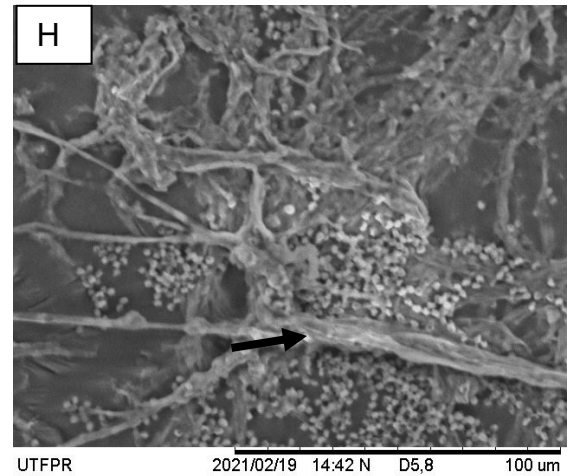
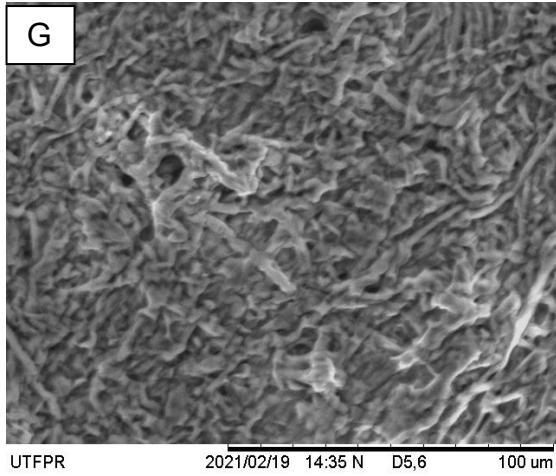
#### 4.1.7 Microscopia Óptica e Varredura

A partir das imagens obtida na MEV, foi comparado a testemunha (Figura 10A), como os demais tratamentos, sendo que nesta as hifas apresentam tamanho normal e intacto.

**Figura 10** - Hifas e conídios de *M. fructicola* submetidas a tratamentos. (A) Testemunha; (B) Extrato frio de alecrim CD; (C) Extrato hidroalcoólico de alecrim; (D) Óleo essencial de alecrim CD; (E) Óleo essencial de alecrim CI; (F) Extrato frio de alho CD; (G) Extrato quente de alho CD; (H) Extrato frio cravo-da-índia CD; (I) Extrato quente de losna CD; (J) Óleo essencial de losna CI; (K) Extrato

hidroalcoólico de orégano CD; (L) Extrato quente de orégano CI. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021





Observou-se que quando aplicado extrato frio de alecrim em CD com *M. fructicola* não ocorreu alteração nos conídios (Figura 10B), enquanto o CD do extrato hidroalcoólico de alecrim ocasionou desorganização celular nas hifas (Figura 10C) e o OE desta planta em CD e CI, ocasionou murchamento dos conídios (Figura 10D e

10E, respectivamente).

Os tratamentos realizados com extrato frio (Figura 10F) e quente (Figura 10G) de alho no CD; extrato quente de losna CD (Figura 10I); extrato hidroalcoólico de orégano CD (Figura 10K) não causaram alteração nas hifas e conídios quando comparado a testemunha (Figura 10A).

O tratamento realizado com extrato frio de cravo-da-índia no CD, causou alterações nos septos, deixando-os mais espessos (Figura 10H), enquanto o OE de losna no CI, ocasionou o murchamento das hifas e aumento de septação (Figura 10J). O extrato quente de orégano no CI, além das hifas ficarem murchas deixou as mesmas retorcidas (Figura 10L).

O OE de cravo-da-índia a 0,15% foi testado por Costa et al. (2011) sobre *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *M. faseolina*, observando-se alterações morfológicas nas hifas, como degeneração celular devido menor turgência; presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares; elevada fragmentação e diminuição na nitidez da parede celular.

O OE de orégano também ocasionou alterações nas hifas de *A. flavus*, com degeneração da parede fúngica, pois ocorreu rompimento da estrutura celular, vazamento do citoplasma, além da diminuição da conidiação e perda de pigmentação (SOUZA et al., 2010).

Além disso, Bianchi et al. (1997) observaram que o extrato aquoso de alho confeccionado a partir do pó, causou engrossamento da parede celular de *Rhizoctonia solani*; aumento de vacúolos e alterações na membrana citoplasmática de *Pythium ultimum* e, redução no diâmetro das hifas de *Fusarium solani*.

Neste experimento não pode ser observado alterações nas hifas de *M. fructicola*, após aplicação do OE de alho, pois este foi fungicida, não ocorrendo o crescimento do fungo. Porém, Li et al. (2014) observaram alterações nas hifas de *P. funiculosum* após aplicação de OE e alho nas concentrações 0,125 e 0,5% por 5 e 24 h, deixando estas enrugadas, colapsadas e dobradas, com descolamento do citoplasma da parede celular, sendo que as hifas que receberam o tratamento 0,5% por 24 h foram totalmente destruídas.

As alterações morfológicas em fungos causados pela exposição aos compostos secundários de OE ou EV de plantas caracteriza o modo de atividade antifúngica com ataque à parede celular e retração do citoplasma nas hifas, podendo resultar na morte de micélio, caracterizando o tratamento como fungicida, além de interferir nas reações

enzimáticas de síntese da parede celular afetando o crescimento e morfogênese do patógeno (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008).

#### 4.1.8 Óleos Essenciais e Extratos Vegetais na Indução de Fitoalexina Gliceolina em Cotilédones de Soja

A análise da produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja teve efeito significativo para interação extratos x tratamentos (Apêndice 29) (Tabela 25).

**Tabela 25** - Indução da fitoalexina gliceolina [(nm) g p f<sup>-1</sup>]\*\* em cotilédones de soja por meio da aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais (frio, quente e hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água, avaliado pela absorvância de 285nm. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial	Extrato Frio	Extrato Quente	Extrato Hidroalcoólico
Testemunha	0,006 cA <sup>*</sup>	0,012 bA	0,015 dA	0,007 bA
Alecrim	0,050 aA	0,039 aB	0,052 aB	0,014 bC
Alho	0,033 bA	0,036 aA	0,039 bA	0,011 bB
Cravo-da-índia	0,041 aA	0,021 bB	0,050 aA	0,016 bB
Losna	0,048 aA	0,041 aB	0,049 aA	0,031 aB
Orégano	0,025 bA	0,014 bB	0,031 cA	0,012 bB
Pitangueira	0,029 bA	0,025 bA	0,023 dA	0,022 aA
Químico	0,024 bA	0,021 bA	0,018 dA	0,021 aA
CV(%)			31,02	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

\*\*nanômetros por grama de peso fresco.

Com OE houve a formação de três grupos, sendo o primeiro formado por alecrim, cravo-da-índia e losna, o segundo por alho, orégano, pitangueira e químico e, o terceiro pela testemunha. Com uso do extrato de água fria formou-se dois grupos, com o primeiro formado por alecrim, alho e losna e, o segundo pelos demais. O extrato de água quente possibilitou formar quatro grupos, com o de maior média formado pelo alecrim, cravo-da-índia e losna, o segundo por alho, o terceiro pelo orégano e, o último pela pitangueira, testemunha e químico.

Com uso do extrato hidroalcoólico houve a formação de dois grupos, com o de maior média composto pela losna, pitangueira e químico e, o segundo pelos demais tratamentos (Tabela 25).

Ao comparar os extratos dentro de cada tratamento, obteve-se como grupo de maior média com o alecrim pelo uso do OE, com alho o OE e extratos frio e quente, com cravo-da-índia, losna e orégano com OE e extrato quente e, com a pitangueira



com formação de único grupo com todos os extratos.

A indução de fitoalexina proporcionado pelos EV de alho, também foram observadas por Brand et al. (2010) que ao utilizarem extratos de alho e alecrim induziram a produção de fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão, sendo todas as doses testadas superiores a testemunha.

Analisando-se tais resultados, independente do tipo de tratamento, todos tiveram de alguma forma o OE como pertencente ao grupo de maior média. Esses resultados comprovaram que a utilização de OE ativam rotas metabólicas precursoras de fitoalexinas, como dos fenilpropanóides. Além disso, as fitoalexinas podem ter ação direta sobre o fungo (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005), como pode ser observado na MEV, os OE de alecrim CD e CI e losna CI (Figuras 10D, 10E e 10J, respectivamente) causaram alterações nos conídios e hifas de *M. fructicola*. Assim a utilização principalmente dos OE inibiu o crescimento micelial, como descrito nas tabelas anteriores.

#### 4.1.9 Toxicologia de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais em *Artemia salina*

A toxicidade frente a náuplios de *A. salina* é utilizado para determinação da toxidez, pois demonstra a sensibilidade destes as substâncias tóxicas dos tratamentos utilizados (UTYAMA et al., 2007). Observou-se no presente trabalho que todos os tratamentos com plantas, de acordo com o tipo de extrato mostraram toxidez, diferente do que ocorreu com a testemunha e solução salina (Apêndice 30) (Tabela 26).

**Tabela 26** - Taxa de mortalidade (%) de *Artemia salina* em relação a toxicidade de diferentes tratamentos oriundos de cada tipo de extração, após 24 h. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Óleo Essencial	Extrato Frio	Extrato Quente	Extrato Hidroalcoólico
Testemunha + Solução salina	7,5 aA*	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Alecrim	100,0 cB	100,0 cB	100,0 cB	70,0 cA
Alho	100,0 cA	100,0 cA	100,0 cA	100,0 eA
Cravo-da-índia	100,0 cA	100,0 cA	100,0 cA	100,0 eA
Losna	100,0 cB	100,0 cB	100,0 cB	85,0 dA
Orégano	100,0 cB	100,0 cB	100,0 cB	32,5 bA
Pitangueira	30,0 bA	70,0 bB	70,0 bB	100,0 eC
CV (%)			18,89	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para o alho e cravo-da-índia ocorreu 100% de morte de *A. salina* em todos os tipos de extrações. Similarmente, Gomes et al. (2018) verificaram que ao utilizar o

óleo de cravo-da-índia para testar a toxicidade em *A. salina*, resultou na morte de todos os indivíduos devido ao componente majoritário. Estes autores também descreveram que o OE foi mais tóxico quando comparado somente ao eugenol. Desta forma, a interação entre os compostos minoritários possui toxicidade maior.

Outros tratamentos com os mesmos 100% de mortalidade foram obtidos com alecrim, losna e orégano com uso de OE e dos extratos aquosos frio e quente (Tabela 26). Estes resultados divergem dos autores a seguir, pois a principal diferença entre os experimentos foi na concentração dos extratos uma vez que Chaves et al. (2018) ao utilizarem OE de orégano apresentaram  $CL_{50}$  de  $172,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Jaramillo et al. (2016) utilizaram extrato etanólico de losna e observaram que este é moderadamente tóxico ao microcrustáceo, obtendo-se 66,67% de mortos com dose  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kabubii, Mbaria e Mathiu (2015) obtiveram mortalidade total com extrato aquoso de alecrim na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e nenhuma mortalidade em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Todos os tratamentos com 100% de mortalidade, independente do extrato foram agrupados em mesmo grupo, sendo seguidos pelo grupo com pitangueira e o grupo formado pela testemunha e água salina com uso do OE e EV frio e quente. Com extrato hidroalcolólico houve a formação de cinco grupos, sendo o de maior mortalidade com a pitangueira, cravo-da-índia e alho, seguido pelos grupos 2 (losna), 3 (alecrim), 4 (orégano) e 5 (testemunha e água salina).

Segundo Henriques, Simões-Pires e Apel, (2009), o 1,8-cineol apresenta algum grau de citotoxicidade o que pode explicar os resultados acentuados com OE de alecrim e losna. Os mesmos ao utilizarem extrato hidroalcolólico de losna a taxa de mortalidade de *A. salina* foi de 15%, sendo uma das mais baixas quando comparada aos demais tratamentos.

Para o extrato bruto de orégano, Manzanares et al. (2015) obtiveram com a concentração de  $500 \mu\text{L}$ , a morte de 100% de náuplio de *A. salina* após 48 h de exposição, tendo com o dobro desta concentração mesma mortalidade, porém em 24 h. Isso pode ter ocorrido devido a degeneração do segundo par de antenas que faz a filtração dos alimentos. Também verificaram que a taxa de mortalidade de *A. salina* foi diretamente proporcional ao nível de concentração do extrato foliar e tempo de exposição, sendo que o maior número observado com incremento destes.

Neste experimento, o extrato de pitangueira apresentou menor toxidez nos extratos quente e frio, diferente do que ocorreu no hidroalcolólico, que foi extremamente tóxico. Montanher, Pizzolatti e Costa-Brighente (2002), ao utilizarem

extrato hidroetanólico de *E. uniflora* verificou pouca toxicidade frente a *A. salina* com dose letal (LC<sub>50</sub>) acima de 1000 mg L<sup>-1</sup>. A diferença entre os dois experimentos possivelmente ocorreu devido a concentração da planta utilizada, sendo que neste foi de 10%.

Pode-se observar que os tratamentos que inibiram o crescimento micelial com maior eficiência e induziram maior quantidade de fitoalexina gliceolina (Tabela 25) em contrapartida foram os mais tóxicos para *A. salina* (Tabela 26). Desta forma, estudos de toxicidade são importantes na identificação e isolamento de novos compostos a partir de extratos brutos, visto que as atividades dos bioativos presentes nos extratos se manifestam como toxicidade para os náuplios (SASIDHARAN et al., 2011). Segundo Fatope (1995) uma substância é considerada citotóxica se inibe processos metabólicos vitais ou causa distúrbios em organismos vivos, resultando em alteração de comportamento ou morte.

#### 4.1.10 Ranking de tratamentos

A partir da escala de avaliação de tratamentos (Tabela 1), calculou-se média de cada um, conforme o tipo de extração e aplicação, apresentados na Tabela 27. Foi adotado ponto de corte, com os tratamentos cuja média foi inferior ou igual a 5,00 seriam utilizados para aplicar nos pêssegos *in natura*.

**Tabela 27** - Média dos experimentos avaliados, conforme tipo de extração (óleo essencial: OE; EF: extrato frio; EQ: extrato quente; EH: extrato hidroalcoólico) e aplicação (CD: contato direto e CI: contato indireto). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	OE		EF		EQ		EH	
	CD	CI	CD	CI	CD	CI	CD	CI
Testemunha	8,25	8,50	8,50	8,75	8,50	8,75	8,25	8,75
Alecrim	7,00	6,75	7,25	6,75	5,00	7,00	7,00	8,50
Alho	1,25	1,25	4,00	5,25	5,00	5,75	3,25	7,50
Cravo-da-índia	0,75	0,75	5,25	7,75	5,00	6,75	2,00	8,25
Losna	5,25	6,25	6,00	6,50	6,25	7,25	7,25	7,50
Orégano	1,50	1,50	8,00	7,75	7,00	7,25	7,50	8,50
Pitangueira	8,25	7,25	7,00	7,25	7,75	8,00	7,00	8,00
Químico	1,75	1,75	2,50	2,50	2,00	2,00	1,75	1,75

Com isso, determinou-se a utilização como tratamentos para aplicação nos frutos o OE de alho, cravo-da-índia e orégano CD e CI; extratos frio de alho; quente de alecrim, alho e cravo-da-índia e; hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia CD.

## 4.2 ESTUDO II – AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGOS

### 4.2.1 Incidência e Severidade de Podridão Parda em Pêssegos Tratados com Óleos Essenciais e Extratos Vegetais e Análises Bioquímicas

A partir das médias dos experimentos apresentados na Tabela 27, os tratamentos foram utilizados *in vivo*, ou seja, utilizou-se extrato frio de alho; extrato quente de alecrim, alho e cravo-da-índia; extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia; OE de alho, cravo-da-índia e orégano em CD com os frutos de pessegueiro. E para o CI utilizou-se OE de alho, cravo-da-índia e orégano.

Obteve-se interação significativa quanto aos tratamentos x tempo para incidência da podridão parda (Apêndice 31) (Tabela 28).

**Tabela 28** - Incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aB*	0,31 aB	1,49 aA	1,55 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
EF alho	0,00 aB	0,00 bB	1,46 aA	1,54 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
EQ alecrim	0,00 aB	0,00 bB	1,41 aA	1,54 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
EQ alho	0,00 aB	0,00 bB	1,42 aA	1,54 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
EQ cravo-da-índia	0,00 aB	0,00 bB	1,51 aA	1,55 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
EH alho	0,00 aB	0,00 bB	1,36 aA	1,54 aA	1,57 aA	1,58 aA	1,58 aA
EH cravo-da-índia	0,00 aC	1,04 aB	1,49 aA	1,53 aA	1,58 aA	1,58 aA	1,58 aA
OE alho	0,00 aC	0,00 bC	0,00 bC	0,62 bB	0,62 bB	0,62 bB	1,10 bA
OE cravo-da-índia	0,00 aB	0,31 bB	0,31 bB	0,31 bB	0,62 bA	0,62 bA	0,62 cA
OE orégano	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
Químico	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA
CV (%)				33,99			

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No segundo e terceiro dia formou-se dois grupos quanto a incidência, aumentando-se para três grupos do quarto ao sexto dia e para quatro no sétimo dia.

No segundo dia, o grupo de maior incidência foi formado pela testemunha e pelo uso do extrato hidroalcoólico de cravo-da-índia. Estes juntamente com os tratamentos extrato frio de alho, extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia e, extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia ficaram agrupados como o de maior incidência do terceiro ao sétimo dia, cuja diferença nestes dias foram ao número de grupos formados e ao agrupamento obtido com os demais tratamentos (Tabela 28).

A diferença de inibição do crescimento do patógeno com uso dos extratos *in vivo* e *in vitro* pode ser devido ao efeito preventivo no meio de cultura, ou seja, houve

tempo da liberação dos compostos no meio até o fungo começar seu desenvolvimento. Além disso, não havia o metabolismo do fruto que pode ter degradado ou intergido com os compostos presentes nos extratos e desta forma não obtiveram efeito curativo.

Fontana et al. (2017) ao aplicarem extrato de cravo-da-índia em pêssegos cultivares Chimarrita e Precocinho, observaram resposta semelhante a este experimento, sendo que para a primeira não houve diferença da testemunha e a segunda diferiu, porém, com a incidência da doença elevada.

Resultados semelhantes foram obtidos quanto a severidade da podridão parda (Apêndice 32) (Tabela 29), com formação do segundo e terceiro dia de dois grupos e a partir do quarto de três grupos. No segundo e terceiro dia, o grupo de maior severidade foi composto pelo extrato hidroalcoólico cravo-da-índia ficando os demais tratamentos no outro grupo. Assim como na incidência (Tabela 28), a severidade obtida do quarto ao sétimo dia teve no grupo de maiores médias a formação da testemunha, extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia, extrato frio de alho, extrato quente de alecrim, alho e cravo-da-índia (Tabela 29).

**Tabela 29** - Severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aB*	0,25 bB	1,04 aA	1,08 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EF alho	0,00 aB	0,00 bB	1,00 aA	1,06 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EQ alecrim	0,00 aB	0,00 bB	1,01 aA	1,05 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EQ alho	0,00 aB	0,00 bB	1,00 aA	1,03 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EQ cravo-da-índia	0,00 aB	0,00 bB	1,04 aA	1,07 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EH alho	0,00 aB	0,00 bB	1,00 aA	1,02 aA	1,09 aA	1,09 aA	1,09 aA
EH cravo-da-índia	0,00 aB	0,75 aA	1,02 aA	1,05 aA	1,08 aA	1,08 aA	1,09 aA
OE alho	0,00 aB	0,00 bB	0,00 bB	0,50 bA	0,50 bA	0,50 bA	0,77 aA
OE cravo-da-índia	0,00 aB	0,25 bB	0,25 bB	0,26 bB	0,51 bA	0,51 bA	0,51 bA
OE orégano	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA
Químico	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA
CV (%)				38,78			

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

É válido destacar que o OE de orégano juntamente com o tratamento químico apresentou ausência na incidência e severidade de podridão parda até o sétimo dia (Tabelas 28 e 29, respectivamente).

O OE de orégano possui alta concentração de timol da mesma forma que o tomilho. Santoro et al. (2018) utilizaram OE de tomilho com alta concentração de p-cimeno e timol em câmaras com difusores (CI) no armazenamento de pêssegos e

nectarinas, obtendo controle da podridão parda, sem alteração na cor dos frutos. Além disso, os autores ressaltam que não houve perda de peso dos frutos o que pode estar relacionado com a formação de revestimento na superfície da fruta, interferindo na troca de gases, reduzindo a taxa de respiração e perda de água. Desta forma, este óleo torna-se promissor na utilização em pós-colheita.

Infere-se que os extratos não controlaram a incidência e severidade da doença, possivelmente água e o álcool 70% não extraíram e/ou conservaram de forma eficiente os compostos secundários de interesse presentes nas plantas ou a concentração utilizada foi inferior a necessária, visto que a quantidade de inóculo aplicado foi maior no fruto, em relação ao que havia nas placas de Petri®.

Ainda, os EV testados podem não ter ativado a síntese de moléculas sinalizadoras do metabolismo secundário dos frutos, como etileno, ácido salicílico e jasmônico que desempenham importante função nas reações de defesa a patógenos induzindo a RSA (SÁ et al., 2008).

Além disso, estresses causados por danos físicos, como infecção por patógenos, levam a distúrbios fisiológicos que, por meio de sinais de expressão gênica, levam à indução de proteínas específicas do metabolismo dos fenilpropanóides (COLTRO et al., 2014). Estes estresses podem induzir a atividade de enzimas oxidativas como peroxidases, diminuindo o conteúdo de compostos fenólicos e também podem aumentar a atividade da FAL (ANDERSEN ; MARKHAM, 2005).

Cabe salientar que quando os frutos foram imersos nos OE, estes apresentaram alteração na coloração, principalmente nos OE de cravo-da-índia e orégano, ficando marrom, com degradação da epiderme (aparência esfarelada). Com o passar dos dias de avaliação a mudança de coloração passou do epicarpo chegando até o endocarpo.

Porém, os frutos não apresentaram sintomatologia de podridão parda, nem surgimento de fungos, principalmente os tratados com OE de orégano até o sétimo dia de avaliação. Com exceção da alteração de coloração, o OE de orégano obteve a mesma sanidade que o tratamento químico (Tabela 28).

Espíndola (2017) também verificou alterações nos frutos ao utilizar OE de citronela (*Cymbopogon nardus*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) na dose de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , causando fitotoxidez nos pêssegos 'Chimarrita', sendo que o primeiro deixou a epiderme e a camada imediatamente abaixo dela com aspecto amolecido, sem causar alterações na polpa e, o segundo causou amolecimento da polpa e aparente perda de

suculência. Conforme o autor, essas alterações fisiológicas poderiam estar relacionadas ao maior controle da incidência da doença, aumento da taxa respiratória e produção de etileno, sendo que esse dano foi superficial preservando a firmeza da polpa.

Quando foram analisados os tratamentos no CI (Apêndices 33 e 34) (Tabelas 30 e 31), observou-se nos dois primeiros dias de avaliação que a incidência e severidade não apresentou tratamentos com médias estatisticamente diferentes, formando-se único grupo. No terceiro dia formou-se três grupos e do quarto ao sexto dia dois grupos, porém, em todos estes dias o agrupamento de menor incidência e severidade foi formado pelo tratamento químico e com uso do OE de alho (Tabelas 30 e 31, respectivamente). No sétimo dia houve a formação de três grupos, sendo o de menores médias para ambas as variáveis com tratamento químico formando-se grupo de único tratamento, seguido pelo OE de alho que formou outro grupo único e o terceiro grupo abrangeu os demais tratamentos.

**Tabela 30** - Incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com *M. fructicola*. (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC*	0,58 aC	4,92 aB	5,74 aA	6,31 aA	6,31 aA	6,31 cA
OE alho	0,00 aA	0,00 aA	0,58 cA	0,58 bA	0,58 bA	0,58 bA	1,17 bA
OE cravo-da-india	0,00 aD	0,00 aD	2,98 bC	5,11 aB	5,97 aA	6,31 aA	6,31 cA
OE orégano	0,00 aD	0,00 aD	2,84 bC	5,42 aB	6,31 aA	6,31 aA	6,31 cA
Químico	0,00 aA	0,00 aA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA
CV (%)	21,76						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade

O OE de alho no CI diferenciou estatisticamente apenas no sétimo dia do tratamento químico para incidência da doença, ou seja, apenas um fruto desenvolveu a doença até o sexto dia, e no último dia mais um fruto. Para severidade desta até o sexto dia menos de 25% do fruto foi acometido e no último dia a severidade aumentou, mas não ultrapassando a metade deste. Desta forma, o óleo de alho torna-se promissor na substituição de produtos químicos para a manutenção de frutos em prateleira.

Com isso, acredita-se que a maior eficiência do OE de alho pode ter tido maior liberação dos compostos voláteis do que os demais, fazendo com que ocorresse tal controle sobre o patógeno nos primeiros seis dias. Todavia, trata-se de resultado promissor que exige pesquisas em maiores ambientes, como câmaras frias para que

possa ser observado o tempo de ação durante o período de prateleira dos frutos.

**Tabela 31** - Severidade (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com *M. fructicola*. (EF: extrato frio, EQ: extrato quente, EH: extrato hidroalcoólico, óleo essencial: OE). UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Testemunha	0,00 aC*	0,25 aC	1,80 aB	2,90 aA	3,25 aA	3,25 aA	3,25 aA
OE alho	0,00 aA	0,00 aA	0,25 cA	0,25 cA	0,25 cA	0,25 bA	0,50 bA
OE cravo-da-índia	0,00 aE	0,00 aE	1,00 bD	1,60 bC	2,36 bB	3,25 aA	3,25 aA
OE orégano	0,00 aD	0,00 aD	1,00 bC	1,80 bB	3,07 bA	3,25 aA	3,25 aA
Químico	0,00 aA	0,00 aA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
CV (%)	21,78						

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados de incidência e severidade no CD e CI, sugere-se que a ação dos compostos secundários provenientes dos OE teve resultados satisfatórios e sua aplicação nos frutos deve ser melhor observado visando elucidar a causa da alteração na coloração dos mesmos, para quiçá ter-se componente orgânico com o mesmo potencial químico.

O efeito da não incidência da doença nos frutos pode ser evidenciado devido aos frutos consumirem a proteína disponível para o processamento dos metabólitos secundários de defesa (Tabela 32), bem como ativação das PR-proteína quitinase (Tabela 34) e da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Tabela 33), ou seja, esse aumento do teor de proteínas pode estar associado ao desencadeamento da RSA, tendo relação direta com as PR proteínas relacionadas à patogênese que atuam na defesa das plantas contra os patógenos (VAN LOON et al., 2006).

Quanto ao teor de proteínas (Apêndice 35) (Tabela 32) observou-se que nos três tempos de análise, o grupo de menor teor de proteínas foi formado pelo tratamento testemunha com água e químico. Nas primeiras 24 horas, formou-se dois grupos com o de maior média composto pelo CD e CI com OE de alho, cravo-da-índia e orégano. Nas 60 horas, formou-se três grupos, com o de maior média sendo composto apenas pelo OE de alho em contato indireto, diferentemente do que ocorreu nas 96 horas, em que este formou o segundo grupo de maiores médias, sendo o de maior composto pelo CD e CI de OE de cravo-da-índia e orégano e, CD do OE de alho.



**Tabela 32** - Teor de proteína (mg g<sup>-1</sup> tecido) presente em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (h)		
	24	60	96
Testemunha	8,29 bA*	6,77 cA	7,92 cA
OE alho CD	14,04 aB	11,20 bB	17,46 aA
OE cravo-da-índia CD	13,40 aA	11,50 bA	15,30 aA
OE orégano CD	13,11 aA	14,96 bA	14,33 aA
OE alho CI	13,74 aB	22,78 aA	11,65 bB
OE cravo-da-índia CI	12,42 aA	11,52 bA	15,38 aA
OE orégano CI	13,75 aA	13,87 bA	15,26 aA
Químico	5,00 bA	5,84 cA	7,75 cA
CV (%)		20,51	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O efeito satisfatório dos OE de orégano e cravo-da-índia em CD para incidência e severidade da doença pode ser explicado pela ativação da FAL (Apêndice 36), que nas 24 horas de avaliação formou três grupos, com OE de orégano no CD e tratamento químico agrupados no de maior média. Nas 60 horas formaram-se dois grupos com alteração do OE de cravo-da-índia juntamente com OE de orégano em CD com a maior média. A avaliação nas 96 horas permitiu formar quatro grupos, mas o de maior média foi formado exclusivamente com OE de orégano em CD (Tabela 33).

**Tabela 33** - Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Uabs min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>proteína<sup>-1</sup> x 10<sup>-2</sup>) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (h)		
	24	60	96
Testemunha	0,009 cA*	0,007 bA	0,008 dA
OE alho CD	0,011 cA	0,008 bB	0,011 dA
OE cravo-da-índia CD	0,013 bB	0,016 aB	0,020 bA
OE orégano CD	0,018 aB	0,017 aB	0,024 aA
OE alho CI	0,010 cB	0,010 bB	0,015 cA
OE cravo-da-índia CI	0,009 cA	0,008 bA	0,011 dA
OE orégano CI	0,005 dB	0,006 bB	0,010 dA
Químico	0,018 aB	0,009 bB	0,015 cA
CV (%)		15,14	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que nos três tempos, o OE de orégano em CD esteve sempre no grupo de maior média, reforçando-se a hipótese de que houve resposta da enzima ativando metabólitos de defesa sobre a podridão parda.

O aumento da atividade da FAL também foi observado por KHUMALO et al. (2017) utilizando vapor de OE de tomilho na incidência de podridão parda (*Monilinia*

*laxa*). Os frutos expostos ao vapor com óleo de tomilho ( $96 \mu\text{L L}^{-1}$ ) por 24 h, com posterior inoculação com o patógeno ( $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) e armazenados por 14 dias a  $0^\circ\text{C}$ , seguidos por 6 dias de validade em  $15^\circ\text{C}$  reduziu a incidência de podridão parda e aumentou a atividade da FAL, bem como, conteúdo de catequina, ácidos clorogênico e cafeico, elevando desta forma a capacidade de eliminação de antioxidantes. Desta forma, supõe-se que assim como óleo de tomilho rico em timol, o de orégano também ativou as rotas de defesa com a mesma substância, pois o óleo utilizado possui 3% de timol.

Além da ativação da FAL, os OE principalmente no CD ativaram as PR-proteína, com ênfase para quitinase (Apêndice 37) (Tabela 34), que avaliada nas 24 horas permitiu a formação de três grupos, com OE de cravo-da-índia e alho ambos em CD e CI agrupados no de maior média. Nas 60 horas, o grupo de maior média foi composto por estes tratamentos com CD somente, mantendo-se com tal resposta de superioridade nas 96 horas, uma vez que se manteve tal formação.

**Tabela 34** - Atividade da enzima quitinase (U.E  $\text{mg}^{-1}$  proteína $^{-1}$ ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

Tratamentos	Tempo (h)		
	24	60	96
Testemunha	0,33 bA*	0,31 bA	0,33 bA
OE alho CD	0,43 aA	0,43 aA	0,43 aA
OE cravo-da-índia CD	0,42 aA	0,43 aA	0,41 aA
OE orégano CD	0,29 cA	0,20 cB	0,27 cA
OE alho CI	0,42 aA	0,34 bB	0,32 bB
OE cravo-da-índia CI	0,38 aA	0,32 bB	0,32 bB
OE orégano CI	0,36 bA	0,33 bA	0,33 bA
Químico	0,29 cB	0,34 bA	0,27 cB
CV (%)		11,40	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade

A ativação da quitina induziu repostas de defesa nos pêssegos e desta forma reduziu ou até inibiu o processo infeccioso da doença, pois a ativação da quitinase e/ou glucanase interferem na lignificação, ativam espécies reativas de oxigênio (EROS), na biossíntese de fitoalexina, na formação de calose e na expressão de genes de resposta de defesa. Além disso, a atividade da enzima hidrolítica quitinase presente nos vegetais interfere na integridade das paredes dos fungos liberando quitina para gerar ligantes solúveis aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (PUSZTAHELYI, 2018).

Quando analisada a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase não houve interação significativa entre os tratamentos x tempo, nem sobre os fatores analisados isoladamente (Apêndice 38). Supõe-se que isso pode ser devido ao fungo *M. fructicola* pertencer ao filo Ascomycota e a parede celular ser composta por glucanas e quitina (MASSOLA; KRUGNER, 2011). Nesse patossistema o processo de defesa pode ter priorizado a síntese de quitinase.

A utilização dos OE de alho, cravo-da-índia e orégano principalmente no CD proporcionaram resultados promissores, pois além do controle da doença em pós-colheita ativaram respostas de defesa dos frutos. Desta forma, necessita-se estudos com óleos desodorizados para o contato direto, visto que o CI não obteve alta eficiência ou realizar testes com concentrações mais elevadas ou em ambiente controlado, como realizado por Servili et al. (2017) que ao avaliarem o controle dos compostos voláteis presentes em OE de alecrim, hortelã-pimenta e tomilho, com elevado teor de timol, no controle do fungo *Botrytis cinerea* em uvas de mesa obtiveram com OE de alecrim redução de 65% na incidência do mofo cinzento quando combinado com tratamento hipobárico a 50 kPa (0,5 atm). Porém, houve percepção organolépticas dos OE após 24 h aplicação, desaparecendo com 48 h.

## 5 CONCLUSÃO

No Estudo I, em relação ao crescimento micelial os óleos essenciais de alho (*Allium sativum* L.), cravo-da-índia (*Sizygium aromaticum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) em contato direto e indireto e extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia no contato direto tiveram maior potencial de inibição e menor índice de velocidade de crescimento micelial de *M. fructicola*, pois o efeito é similar ao tratamento com fungicida.

O óleo essencial de alho teve efeito fungicida com a menor concentração utilizada, seguido do óleo essencial de cravo-da-índia, orégano extrato frio de alho, extrato hidroalcoólico de alho e cravo-da-índia, estes com efeito fungistático.

Análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que óleo essencial de alecrim em contato direto e indireto, losna no contato indireto, extrato frio de cravo-da-índia em contato direto, extrato quente de orégano no contato indireto e extrato hidroalcoólico de alecrim no contato direto ocasionaram alterações morfológicas nas hifas de *M. fructicola*.

A indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja ocorreu com a utilização do óleo essencial de alecrim, cravo-da-índia e losna; extrato frio de alecrim, alho e losna; extrato quente de alecrim, alho e losna; extrato hidroalcóolico de losna e pitangueira.

Na análise da toxicologia em *Artemia salina* todos os tratamentos apresentaram toxicidade.

No Estudo II, os óleos essenciais de alho por contato indireto e orégano por contato direto tiveram potencial para controlar a incidência e severidade da podridão parda na pós-colheita de pêssegos. Esses óleos induziram a RSA pela ativação das enzimas fenilalanina amônia-liase e quitinase.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano no contato direto obtiveram resultados satisfatórios nos Estudos I e II, sendo promissores para mais estudos no controle da *M. fructicola*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A podridão parda é a principal doença do pessegueiro e apresenta resistência aos fungicidas registrados para a cultura. Com isso, faz-se necessário estudos com tratamentos alternativos utilizando-se plantas com potencial de controle da doença. No presente trabalho identificou-se plantas com este potencial que a aplicação dos tratamentos em pós-colheita ativou rotas metabólicas de defesa dos frutos.

Observou-se que a forma de preparação dos tratamentos interfere na extração dos metabólitos secundários e conseqüentemente no controle do patógeno, além da quantidade de planta utilizada. Assim, estudos futuros devem continuar buscando formas alternativas do controle de *M. fructicola* em pré e pós-colheita.

As plantas utilizadas nos testes deste trabalho (alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira) apresentaram potencial no controle alternativo de *M. fructicola* via CD e CI do patógeno e também algumas como indutores de resistência. A identificação de seus componentes majoritários forneceu subsídios para a prospecção de novos produtos naturais, sabendo-se da ação sinérgica de seus compostos sobre parâmetros relativos à toxicidade, pois muitas vezes a utilização do componente isolado não tem o mesmo efeito de quando aplicado com os demais compostos que apresentam-se em menor concentração.

Espera-se também que esse trabalho sirva como base para utilização destes

OE e EV em outros patossistemas de interesse para a fruticultura, visto que estes tratamentos não são específicos apenas para um patógeno e desta forma contribuir com os objetivos do desenvolvimento sustentável.

A partir dos resultados obtidos e observados neste trabalho, espera-se novos estudos contemplando:

- Analisar o modo de ação de um composto específico comparando-o ao efeito sinérgico apresentado neste trabalho;
- Estudar concentrações menores dos OE que obtiveram resultados satisfatórios em CD e verificar se não haverá alteração na coloração dos frutos;
- Testar concentrações maiores para os EV, visto a facilidade de preparação destes pelos agricultores e disponibilidade das plantas;
- Testar temperaturas inferiores ao ponto de ebulição para confecção de extratos utilizando água quente, analisando se compostos secundários;
- Avaliar o efeito dos tratamentos por CD na pré-colheita de pêssegos;
- Examinar o efeito dos tratamentos nos processos fisiológicos envolvidos na fisiologia pós-colheita de pêssegos relacionando temperatura, respiração e vida útil de prateleira, visto que alguns tratamentos como OE de orégano não ocorreu a deterioração dos frutos até sete dias após aplicação;
- Analisar o efeito dos tratamentos sobre as propriedades organolépticas, por exemplo: odor, textura e sabor.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERHAM, A.; CICEK, S. S.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Analysis of Sesquiterpene Lactones, Lignans, and Flavonoids in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)–Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC–Solid Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10817–10823, 2010.
- ADAMS, S.; KUNZ, B.; WEIDENBÜRNER, M. Mycelial Deformations of *Cladosporium herbarum* due to the Application of Eugenol or Carvacrol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 535–540, 1996.
- AERTS, R. J.; SNOEIJER, W.; VAN DER MEIJDEN, E.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona alkaloids*? **Phytochemistry**, v. 30, p. 2947–2951, 1991.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4 ed. ed. San Diego CA: Academic Press, 1997.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. ed. Elsevier. San Diego CA: Academic Press, 2005.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida isolates*. **Journal of medical microbiology**, v. 59, p. 1178–1184, 2010.
- ALAM, M. A.; SUBHAN, N.; RAHMAN, M. M.; UDDIN, S. J.; REZA, H. M.; SARKER, S. D. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **American Society for Nutrition**, v. 5, p. 404–417, 2014.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R. G. Produção, determinação e calibração da concentração de inóculo em suspensão. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**, Viçosa, 2007. p. 103–160.
- ALI, M.; KIM, B.; BELFIELD, K. D.; NORMAN, D.; BRENNAN, M.; ALI, G. S. Inhibition of *Phytophthora parasitica* and *P. capsici* by silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Artemisia absinthium*. **Phytopathology**, v. 105, p. 1183–1190, 2015.
- ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Biologia experimental em pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. **Revista do setor de Ciências agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 177–193, 2012.
- ALMEIDA, T. F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. D. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa phytopathologica**, v. 35, p. 196–201, 2009.
- ALMEIDA, T. F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. DE C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 196–201, 2009.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de resistência**

de plantas a patógenos. Maringá. 2014. p. 73–85.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10–15, 2001.

AMAGASE, H. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. **Journal of nutrition**, v. 136, p. 716S-723S, 2006.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo, 2011.

ANDERSEN O.M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton, CRC Press. 2005.

ANDREU, V.; LEVERT, A.; AMIOT, A.; COUSIN, A.; AVELINE, N.; BERTRAND, C. Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 29971–29982, 2018.

ANTHONY, S.; ABEYWICKRAMA, K.; WIJERATNAM, S. W. The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on postharvest diseases and storage life of *Embul banana*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, p. 780–785, 2003.

ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, p. 351–366, 2010.

AQUINO, C. F.; SALES, N. D. L. P.; SOARES, E. P. S.; MARTINS, E. R. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 1059–1067, 2012.

ARK, P. A.; THOMPSON, J. P. Control of certain diseases of plants with antibiotics from garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Disease Reporter**, v. 43, p. 276–282, 1959.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016.

BARAVALIA, Y.; GHASIYA Y.; CHANDA, S. Brine shrimp cytotoxicity, anti inflammatory and analgesic properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 851–861, 2012.

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe. **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, p. 26–29, 2004.

BARBOSA, A. J.; FERREIRA, S. D.; SALVALAGGIO, A. C.; COSTA, N. V.; MORAES, E. M. Allelopathy of aqueous *Pachyrhizus erosus* L. Extracts on *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 48, p. 59–65, 2018.

BARROS GOMES, P. R.; MOUCHREK FILHO, V. E.; RABÊLO, W. F.; NASCIMENTO, A.A.; LOUZEIRO, H.C.; LYRA, W. S.; FONTENELE, M. A. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia

(*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, p. 37–52, 2018.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H. . Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989–4006, 2012.

BATRA, L. R. **World species of Monilinia (fungi): their ecology, biosystematics and control**. Mycologia Memoir, 1991.

BEDOYA-SERNA, C. M., DACANAL, G. C., FERNANDES, A. M., & PINHO, S. C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 929–935, 2018.

BERECHET, M. D.; STELESCU, M. D.; MANAILA, E.; CRACIUN, G. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Romania. **Rev Chim (Bucareste)**, v. 66, p. 1814–1818, 2015.

BERNARDI, C. **Caracterização química e potencial biotecnológico do extrato de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) no tratamento de sementes**. 96 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, PR, 2020. Disponível em: <[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4949/1/potencialquimicoantioxidanteal\\_cachofra.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4949/1/potencialquimicoantioxidanteal_cachofra.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2020.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BIANCHI, A.; ZANBONELLI, A.; D'AURELIO, A. Z.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease**, v. 81, p. 1241–1246, 1997.

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

BLANK, D. E.; ALVES, G. H.; FREITAG, R. A.; CORREA, R. A.; OLIVEIRA H. S.; CLEFF, M. B. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. **Science And Animal Health**, v. 4, p. 117–130, 2016.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Influence of fertilizer practices on scontaining metabolites in garlic (*Allium sativum* L.) under field conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 10690–10696, 2010.

BORLINGHAUS, J.; ALBRECHT, F.; GRUHLKE, M. C.; NWACHUKWU, I. D.; SLUSARENKO, A. J. Allicin: Chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, p. 12591–12618, 2014.

BORREGO, S.; VALDÉS, O.; VIVAR, I.; LAVIN, P.; GUIAMET, P.; BATTISTONI, P.; SARAVIA, S. G.; BORGES, P. Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

BOSTOCK, R. M.; WILCOX, S. M.; WANG, G.; ADASKAVEG, J. E. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 54, p. 37–50, 1999.



- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, M. R. **Fitoalexinas e a defesa das plantas**. Disponível em: < [www.s bq.org.br/PN-NET/texto5/defesa.htm](http://www.s bq.org.br/PN-NET/texto5/defesa.htm)>. Acesso em 12 ago. 2018.
- BRAND, S. C.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; SCHEREN, M. B.; ANTONELLO, L. M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1881–1887, 2010.
- BYRDE, R. J. W.; WILLETTS, H. J. **The brown rot fungi of fruit: their biology and control**. Oxford: Pergamum Press, 1977, 171p.
- CARMO, E. S.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. D. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362–367, 2008.
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, p. 1914–1920, 2002.
- CASTRO, A. S.; BARBIERI, R. S. Botânica e morfologia do pessegueiro. In: RASEIRA, M. C. B; PEREIRA, J.F.M.; CARVALHO, F. L. (Ed.). **Pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, p. 25–44, 2014.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81–124, 2005.
- CAVALLITO, C. J.; BAILEY, J. H. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, p. 1950–1952, 1944.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. D. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S. D.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, p. 1–5, 2008.
- CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. D.; TRINDADE, J. D.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, p. 33–41, 2014.
- CHANG, R.; MORAIS, S. A.; NAPOLITANO, D. R.; DUARTE, K. C.; GUZMAN, V. B.; NASCIMENTO, E. A. D. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene: a case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (pitangueira) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 392–396, 2011.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food chemistry**, v. 100, p. 1044–1048, 2007.

- CHAVES, M. V.; OLIVEIRA, G. M. G.; NETO, M. J., NEVES, F. M. D. L.; BARBOSA, I. M. L. Potencial fungicida de plantas medicinais do cerrado da costa leste do estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 53, p. 1689–1699, 2018.
- CHENG, Z. H.; TONG, F.; JIN, R. Primary study on the inhibitory effects on plant pathogen and the inhibitory ingredient of garlic straw aqueous extracts. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 28, p. 324, 2008.
- CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. **Agriculture**, v. 2, p. 228–243, 2012.
- COLTRO, S.; BROETTO, L.; ROTILLI, M. C. C.; MORAES, A. J. D.; BARP, F. K.; BRAGA, G. C. Heat shock and salicylic acid on postharvest preservation of organic strawberries. **Revista Ceres**, v. 61, p. 306–312, 2014.
- COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344–349, 2011.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 7, p. 1820–1830, 2008.
- COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J., MARTINS, P. M., PAULA, J. A. M., FIUZA, T. D. S., TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J.R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 240–245, 2011.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**, v. 88, p. 170–175, 2000.
- DANIEL, C. K.; LENNOX, C. L.; VRIES, F. A. In-vitro effects of garlic extracts on pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba*. **South African Journal of Science**, v. 111, p. 1–8, 2015.
- DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; MAZARO, S. M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 793–799, 2008.
- DE CAL, A.; SANDÍN-ESPAÑA, P.; MARTINEZ, F.; EGÜEN, B.; CHIEN-MING, C.; LEE, M.H.; MELGAREJO, P.; PRUSKY, D. Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 418–423, 2013.
- DEVI, N. O.; SINGH, N. I.; DEVI, R. T.; CHANU, W. T. In vitro evaluation of *Alternaria solani* (ellis and mart.) jones and grout causing fruit rot of tomato by plant extracts and bio-control agents. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 652–661, 2017.
- DIXIT, S. N.; CHANDRA, H.; TIWARI, R.; DIXIT, V. Development of a botanical fungicide against blue mould of mandarins. **Journal of stored products research**, v.

31, p. 165–172, 1995.

DUA, A., SINGH, A.; MAHAJAN, N. Antioxidants of clove (*Syzygium aromaticum*) prevent metal induced oxidative damage of biomolecules. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 6, p. 273–278, 2015.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. Annual Review of components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131–137, 2004.

EMERY, K. M.; SCHERM, H.; SAVELLE, A. T. Assessment of interactions between components of fungicide mixtures against *Monilinia fructicola*. **Crop Protection**, v. 21, p. 41–47, 2002.

ESPÍNDOLA, B. P. **Indução de resistência e vaporização de óleos essenciais no controle de podridões pós-colheita em pêssegos "Chimarrita"**. 84 p. Tese (Doutorado), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), LAGES, SC, 2017. Disponível em: <

[http://www.cav.udesc.br/arquivos/id\\_submenu/988/tese\\_bruno\\_pansera\\_espindola\\_digital.pdf](http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/988/tese_bruno_pansera_espindola_digital.pdf) >. Acesso em: 07 ago. 2018.

FABIANE, K. C. Reação de pessegueiros a *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey e sua relação com componentes bioquímicos. 139 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Pato Branco, PR, 2011. Disponível

em: <[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/264/1/PB\\_PPGAG\\_M\\_Fabiane%2c%20Keli%20Cristina\\_2011.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/264/1/PB_PPGAG_M_Fabiane%2c%20Keli%20Cristina_2011.pdf)>. Disponível em: 26 out. 2019.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. D. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 109–120, 2011.

FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J. C. Principais doenças das plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. (Ed.). **Fruticultura Fundamentos e práticas**. p. 139–157, 2008.

FARIA, T. D. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P. D.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. D. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, p. 867–871, 2006.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. In: MOTAJERMI, Y. (Ed.). **Encyclopedia of Food Safety**. Foods, Materials, Technologies and Risks. Elsevier, 2014. p. 324–330.

FATOPE, M. O. Phytocompounds: their biomassy and diversity. **Discovery and Innovation**, v. 7, p. 229–236, 1995.

FERNÁNDEZ, V.; KHAYET, M.; MONTERO-PRADO, P.; HEREDIA-GUERRERO, J. A.; LIAKOPOULOS, G.; KARABOURNIOTIS, G.; DEL RÍO, V.; DOMÍNGUEZ, E.; TACCHINI, I.; NERÍN, C.; VAL, J.; HEREDIA, A. New insights into the properties of pubescent surfaces: peach fruit as a model. **Plant Physiology**, v. 156, p. 2098–2108, 2011.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. Factors

affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213–226, 2008.

FISCHER, J. M. M.; SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; MAY DE MIO, L. L.; GLIENKE, C. Characterization of *Monilinia* species associated with brown rot in stone fruit in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 423–436, 2016.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, p. 21–31, 2008.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. D. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J. D.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 45–50, 2015.

FONTANA, D. C.; KULCZYNSKI, S. M.; TREVISAN, R.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; PINHEIRO, M. V. M.; PRETTO, M. M.; DIEI, M. I. Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pessegueiro. **Revista Cultivando o Saber**, v. 10, p. 1–18, 2017.

FORTES, J.F.; MARTINS, O. Sintomatologia e controle das principais doenças. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. C. B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Pelotas, Embrapa CPECT. 1998, p. 243–264.

FRATIANNI, F.; OMBRA, M. N.; COZZOLINO, A.; RICCARDI, R.; SPIGNO, P.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 240–248, 2016.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy research**, v. 21, p. 989–994, 2007.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 839–863, 2013.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898–904, 2007.

GARCIA-BENITEZ, C.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A.; FONTANIELLA, B. Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1–16, 2016.

GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 48–57, 2012.

GARRIDO, L. D. R.; SÔNEGO, O. R. Doenças do pessegueiro na região da serra gaúcha. Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica: Embrapa**, 2005. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPUV/8139/1/cir061.pdf>>. Acesso em: 18 jun 2018.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Doenças fúngicas e bacterianas do pessegueiro**. Disponível em:<

<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegoDeMe saRegiaoSerraGaucha/doenca.htm>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

GHALLAB, Y. E.; JAHID, A.A.; EDDINE, J.J.; SAID, A.A.H.; ZARAYBY, L.; DERFOUFI, S. *Syzygium aromaticum* L.: phytochemical investigation and comparison of the scavenging activity of essential oil, extracts and eugenol. **Advances in Traditional Medicine**, v. 20, p. 153–158, 2020.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 731–737, 2010.

GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, p. 374–381, 2007.

GOMES, L. A. O. **Cultivo de crustáceos e moluscos**. São Paulo: Nobel, 1986, 226p.

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 70–78, 2011.

GRADZIEL, T.M.; BOSTOCK, R.M.; ADASKAVEG, J. E. Resistance to brown rot disease in peach is determined by multiple structural and biochemical components. **Acta Horticulturae**, v. 622, p. 347–352, 2003.

GUIMARÃES, L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividade antioxidante e fungitóxica do óleo essencial do capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, p. 464–472, 2011.

GURGEL, L. M. S.; COELHO, R. S. B.; OLIVEIRA, S. M. A.; SILVA, R. L. X.; ROSA, R. C. T.; ASSIS, T. C.; ANDRADE, D. E. G. T. Efeito de indutores de resistência no controle da antracnose do bastão do imperador (*Etlíngera elatior*). **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 13, p. 223–233, 2016.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 256 p. Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2004. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64132/tde-24082004-105153/publico/Sylvia.pdf>>. Acesso em: 09 set. 2018.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 449–454, 1996.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p. 177–199, 1997.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, p. 83–91, 2001.

HAYAT, S.; CHENG, Z.; AHMAD, H.; ALI, M.; CHEN, X.; WANG, M. Garlic, from remedy to stimulant: evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin alliin content among garlic cultivars; alliin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in cucumber. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1235, 2016.

HENNIG, J.; MALAMY, J.; GRYNKIEWICZ, G.; INDULSKI, J.; KLESSIG, D. F. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. **The Plant Journal**, v. 4, p. 593–600, 1993.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e Perspectivas Terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Ed.). **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 2 ed. Itajaí, p. 221–249, 2009.

HERTER, F.G.; SACHS, S.; FLORES, S. A. Condições edafoclimáticas para instalação do pomar. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. C. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, p. 221–249, 1998.

HILE, A. G.; SHAN, Z.; BLOCK, E. Aversion of European starlings (*Sturnus vulgaris*) to garlic oil as an avian repellent. Garlic oil analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2192–2196, 2004.

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

HOLB, I. J. Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 397, 2008.

HOLTZ, B. A.; MICHAILIDES, T. J.; HONG, C. Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. **Plant disease**, v. 82, p. 1375–1380, 1998.

HONG, C.; HOLTZ, B.A.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. **Plant Disease**, v. 81, p. 519–524, 1997.

HOYOS, J. M. A.; ALVES, E.; ROZWALKA, L. C.; SOUZA, E. A. D.; ZEVIANI, W. M. Atividade antifúngica e alterações ultraestruturais em *Pseudocercospora griseola* tratado com óleos essenciais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 270–284, 2012.

HRUSTIĆ, J., MIHAJLOVIĆ, M., GRAHOVAC, M., DELIBAŠIĆ, G., BULAJIĆ, A., KRSTIĆ, B., & TANOVIĆ, B. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 27, p. 283–297, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 1–24, 2012.

INOUYE, S.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; ASAKURA, M. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, p. 33–41, 2003.

INOUYE, S.; UCHIDA, K.; ABE, S. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, p. 210–216, 2006.

JARAMILLO JARAMILLO, C.; JARAMILLO-ESPINOZA, A.; D'ARMAS, H.;

TROCCOLI, L.; ROJAS DE ASTUDILLO, L. Concentrations of alkaloids, cyanogenic glycosides, polyphenols and saponins in selected medicinal plants from Ecuador and their relationship with acute toxicity against *Artemia salina*. **Revista de biologia tropical**, v. 64, p. 1171–1184, 2016.

JIMOH, S. O.; AROWOLO, L. A.; ALABI, K. A. Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of *Syzygium aromaticum* extract and essential oil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 4557–4567, 2017.

JINGA, C.; ZHAOB, J.; HANB, X.; HUANGA, R.; CAIC, D.; ZHANGA, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104, p. 41–46, 2018.

JUDZENTIENE, A.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Analysis of essential oils of *Artemisia absinthium* L. from Lithuania by CC, GC (RI), GC-MS and <sup>13</sup>C NMR. **Natural product communications**, v. 4, p. 1113–1118, 2009.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 683–687, 2002.

JÚNIOR, I. T. S.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, v. 22, p. 77–83, 2009.

KABUBII, Z. N.; MBARIA, J.; MATHIU, M. Acute toxicity studies of *Myrsine africana* aqueous seed extract in male Wistar rats on some hematological and biochemical parameters. **Clinical Phytoscience**, v. 1, p. 1–4, 2015.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, p. 813–829, 2003.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; BELGHITH, L.; BOUAZIZ, F.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 34–41, 2014.

KHADRI, S.; BOUTEFNOUCHET, N.; DEKHIL, M. Antibacterial activity evaluation of *Allium sativum* essential oil compared to different *Pseudomonas aeruginosa* strains in eastern algeria. **Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 11, p. 421–428, 2010.

KHUMALO, K. N.; TINYANE, P.; SOUNDY, P.; ROMANAZZI, G.; GLOWACZ, M.; SIVAKUMAR, D. Effect of thyme oil vapour exposure on the brown rot infection, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenolic content and antioxidant activity in red and yellow skin peach cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 195–199, 2017.

KIANI, Y. S.; JABEEN, I. Lipophilic metabolic efficiency (lipmete) and drug efficiency indices to explore the metabolic properties of the substrates of selected cytochrome P450 isoforms. **ACS omega**, v. 5, p. 179–188, 2019.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v. 5, p. 120–132, 2010.

KOCIĆ-TANACKOV, S. D.; DIMIĆ, G. R.; TANACKOV, I. J.; PEJIN, D. J.; MOJOVIĆ, L. V.; PEJIN, J. D. Antifungal activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. **Hemijska industrija**, v. 66, p. 33–41, 2012.

KOCIĆ-TANACKOV, S.; DIMIĆ, G.; MOJOVIĆ, L.V.; PEJIN, J.D.; TANACKOV, I.J., E. Effect of caraway, basil, and oregano extracts and their binary mixtures on fungi in growth medium and on shredded cabbage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 426–432, 2014.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C. S.; DUBEY, N. K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 9, p. 575–580, 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicéolinas em soja (*Glycine max*)**. 118 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 169–174, 2012.

LANE, C. R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. **EPPO Bulletin**, v. 32, p. 489–493, 2002.

LANZOTTI, V.; SCALA, F.; BONANOMI, G. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 769–791, 2014.

**LASZLO**. Disponível em: <<http://www.laszlo.ind.br/cromatografiaslaszlo.rar>>. Acesso em: 26 out 2017.

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

LEE, H. I.; LEÓN, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, p. 4076–4079, 1995.

LEE, M.; BOSTOCK, R. M. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v. 96, p. 1072–1080, 2006.

LEEUWEN, V. G. C. M.; HOLB I. J.; JEGER, M. J. Factors affecting mummification and sporulation of pome fruit infected by *Monilinia fructigena* in Dutch orchards. **Plant Pathology**, v. 51, p. 787–793, 2002.

LI, J.; OU-LEE, T. M.; RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LAST, R. L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**, v. 5, p. 171–179, 1993.



- LI, W. R.; SHI, Q. S.; LIANG, Q.; HUANG, X. M.; CHEN, Y. B. Antifungal effect and mechanism of garlic oil on *Penicillium funiculosum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 8837–8846, 2014.
- LINO, L. O.; PACHECO, I.; MERCIER, V.; FAORO, F.; BASSI, D.; BORNARD, I.; QUILOT-TURION, B. Brown rot strikes Prunus fruit: an ancient fight almost always lost. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4029–4047, 2016.
- LOPEZ-REYES, J.G.; SPADARO, D.; PRELLE, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. . Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 631–639, 2013.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- MA, C.; LI, S.; MIAO, Z.; GUO, R.; YANG, S.; GU, Z. Efficacy evaluation of applying organic sulfide fumigants to plant pathogens-polluted soil in vegetable greenhouse. **Acta Agriculturae Shanghai**, v. 25, p. 41–46, 2009.
- MADAIL, J.C.M.; RASEIRA, M. C. B. **Aspectos da produção e mercado do pêssego no Brasil**. Circular Técnica, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.
- MAJEWSKI, M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, v. 65, p. 1–8, 2014.
- MANZANARES, D. L.; MORILLA, L. J. G.; MALAWANI, A. D.; LAGARE, N. J. S.; ABRENICA-ADAMAT, L. R. Effects of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extract on early life stages of *Artemia salina*. **Advances in Environmental Sciences**, v. 7, p. 468–474, 2015.
- MARCONDES, M. M.; MARTINS MARCONDES, M.; BALDIN, I.; MAIA, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 896–904, 2014.
- MARI, M.; NERI, F.; SPADONI, A. **Natural compounds: an alternative in postharvest disease control**. III International Symposium on Postharvest Pathology: Using Science to Increase Food Availability. **Anais...2015**.
- MARI, M.; NERI, F.; SPADONI, A. Natural compounds: An alternative in postharvest disease control. **Acta Horticulturae**, v. 1144, p. 385–390, 2016.
- MARTINS, M.C.; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; AMORIM, L. Doenças das rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. . B.; FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 545–557, 2005.
- MASSOLA, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. 704p.
- MATIELLO, J.; BONALDO, S. M. Eliciting activity of phytoalexins in Soybean and Sorghum by extracts and tinctures of medicinal species. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 541–550, 2013.
- MAY-DE-MIO, L.L.; GARRIDO, L.; UENO, B. Doenças de frutíferas de caroço. In:

**Frutíferas de caroço: uma visão ecológica.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004.

MAY-DE-MIO, L.L.; MOREIRA, L.M.; MONTEIRO, L.B.; JÚNIOR, P. R. J. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 227–234, 2008.

MAY DE MIO, L.L.; GARRIDO, L.R.; UENO, B.; FARJADO, T. V. M. Doenças da cultura do pessegueiro e métodos de controle. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. (Ed.). **Pessegueiro**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2014. p. 780.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 7, p. 1824–1829, 2008.

MCLAUGHLIN J. L., R. L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513–524, 1998.

MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do pessegueiro**. Pelotas: Embrapa – CPACT, 1998, 351 p.

MENDES-PINTO, M. M. Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 236–245, 2009.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 35–36, 1982.

MITCHELL, T.C.; STAMFORD, T.L.M.; SOUZA, E.L.D.; LIMA, E.D.O.; CARMO, E. S. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 755–760, 2010.

MOGHTADER, M.; SALARI, H.; FARAHM, A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Biodiversity and Ecological Sciences**, v. 2, p. 224–230, 2012.

MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; COSTA-BRIGHENTE, I. M. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, p. 755–760, 2002.

MORAIS, L. A. S.; GONÇALCES, G. G.; BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, v. 17, 2009.

MORELLI, L. L. L. **Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo)**. 154 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010. Disponível em: <  
[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/254817/1/Morelli\\_LuciulaLemosLima\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/254817/1/Morelli_LuciulaLemosLima_M.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2019.

NASCIMENTO, P. F.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade

antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108–113, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (PubChem). **PubChem Compound Summary for CID 31253, Myrcene**, 2021. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myrcene>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

NATIONS, F. AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE U. **Statistics division**. Disponível em: <[Faostat3.fao.org/download/QC/E](http://Faostat3.fao.org/download/QC/E)>. Acesso em: 23 jul. 2020.

NAZER, A.I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, p. 391–398, 2005.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451–1474, 2013.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada**. NCCLS document M38-A, Pennsylvania USA, 2002.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B.F.; DANGL, J. L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 579–609, 2003.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E. I.; BIRD, G. W.; RITCHIE, D. F.; URIU, L.; UYEMOTO, J. E. **Compendium of stone fruit diseases**. Saint Paul: APS PRESS, 1995.

OJEDA-SANA, A. M.; VAN BAREN, C. M.; ELECHOSA, M. A.; JUÁREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, p. 189–195, 2013.

OLEA, A. F.; BRAVO, A.; MARTÍNEZ, R.; THOMAS, M.; SEDAN, C.; ESPINOZA, L.; ZAMBRANO, E.; CARVAJAL, D.; SILVA-MORENO, E.; CARRASCO, H. Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis cinerea*. **Molecules**, v. 24, p. 1239, 2019.

OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M.P.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Quantificação de açúcares em pêssegos da variedade Biuti, armazenados sob condições de ambiente e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 424–427, 2001.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 8–16, 2011.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 131 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, MG, 1991. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/33483/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Efeito%20do%20tratamento%20fungicida%20em%20sementes%20e%20no%20controle%20de%20tombamento%20de%20pl%C3%A2ntulas%20de%20pepino%20%28Cucumis%20sativus%20L.%29%20e%20piment%C3%A3o%20%28Capsicum%20annuum%20L.%29.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/33483/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Efeito%20do%20tratamento%20fungicida%20em%20sementes%20e%20no%20controle%20de%20tombamento%20de%20pl%C3%A2ntulas%20de%20pepino%20%28Cucumis%20sativus%20L.%29%20e%20piment%C3%A3o%20%28Capsicum%20annuum%20L.%29.pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2019.

- PAOLI, S.; GIANI, T.S.; PRESTA, G.A.; PEREIRA, M.O.; FONSECA, A.S.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A. DA C.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the Labeling of blood constituents with technetium and on the morphology of red blood cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 175–182, 2007.
- PARVEEN, S.; WANI, A. H.; GANIE, A. A.; PALA, S. A.; MIR, R. A. Antifungal activity of some plant extracts on some pathogenic fungi. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, p. 279–284, 2014.
- PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4ª ed. São Paulo, p. 593–636, 2011.
- PAULA E SILVA, A. C. A.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GULLO, F. P.; SANGALLILEITE, F.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SCORZONI, L.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S.; A.; BENADUCCI, T.; WOLF, V. G.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H.; S.; BOLZANI, V. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M. DAS G.; ABREU, L.R. DE; MORAIS, A.R.DE; GUIMARÃES, L.G. DE L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 887–893, 2008.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. Disponível em: <http://files.farmacia-unig-20160.webnode.com/200000038-10ef411e95/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2019.
- PHILLIPS, C.; LAIRD, K. **Vapour of a citrus essential oil blend and its antimicrobial properties**. U.S, Patente Application n. 14/048,454, 2014.
- POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. **Current Topics in Biophysics**, v. 26, p. 217–227, 2002.
- PONCE, A. G.; ROURA, S. I.; DEL VALLE, C. E.; MOREIRA, M. R. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. **Postharvest biology and technology**, v. 49, p. 294–300, 2008.
- PONIATOWSKA, A; MICHALECKA, M.; BIELENIN, A. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, p. 855–865, 2013.
- PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381–391, 2015.
- PRUSK, Y D.; SHALOM, Y.; KOBILER, I.; AKERMAN, M. F. Y. Postharvest fungicide treatments in mango fruits according to the level of quiescent infection of pathogens at harvest. **Acta Horticulturae**, v. 645, p. 605–615, 2003.

- PUŠKÁROVÁ, A.; BUČKOVÁ, M.; KRAKOVÁ, L.; PANGALLO, D.; KOZICS, K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.
- PUSZTAHELYI, T. Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions. **Mycology**, v. 9, p. 189–201, 2018.
- RAHMAWATI, D.; CHANDRA, M.; SANTOSO, S.; PUTERI, M. Application of lemon peel essential oil with edible coating agent to prolong shelf life of tofu and strawberry. In: **AIP Conference Proceedings**. Melville, NY, USA: AIP Publishing LLC, 2017. p. 020037.
- RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY- ANDREANI, D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 605–612, 2016.
- RASEIRA, M.C.B.; NAKASU, B.H.; BARBOSA, W. Cultivares: Descrição e recomendação. In: EMBRAPA (Ed.). **Pessegueiro**. Brasília, DF, p. 73–142, 2014.
- RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. **Food Control**, v. 17, p. 359–364, 2006.
- REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 43–74, 2003.
- RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B. **A CULTURA DO ALHO**, EMBRAPA, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355126/9124396/Sistema+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Alho/64258d94-6bb8-4826-a0e9-ece47aa434ff>>. Acesso em: 04 mar. 2018.
- RICHTER, C.; SCHLEGEL, J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. **Toxicology letters**, v. 67, p. 119–127, 1993.
- RODRIGUES, M. D. M.; SANTOS, S. S. F. D.; CLARO, C. A. D. A.; SCHERMA, A. P. Avaliação in vitro da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal. **Periodontia**, v. 19, p. 124–132, 2009.
- RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto in vitro e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, 2006.
- ROMERO, A. L.; DE OLIVEIRA, R. R.; ROMERO, R. B.; ALMEIDA, A. L.; SOUZA DINIZ, S. P. S. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, p. 3–7, 2013.
- ROMERO, A. L.; SPECIAN, V.; DE OLIVEIRA, R. C.; SOUZA DINIZ, S. S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, p. 15–18, 2009.
- ROMERO, A.L.; ROMERO, R.B.; SILVA, E.L.; SOUZA DINIZ, S.P.S.; OLIVEIRA, R.R.; VIDA, J. B. Chemical composition and activity of *Origanum vulgare* essential oil

against phytopathogenic fungi. **Journal of Health Sciences**, v. 14, p. 231–235, 2015.

RYALS J.; NEUENSCHWANDER U.; WILLITS M.; MOLINA A.; STEINER H.Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1809–1819, 1996.

SÁ, C. R. L.; SILVA, E. D. O.; TERAÓ, D.; SARAIVA, A. C. M. **Métodos de controle do etileno na qualidade e conservação pós-colheita de frutas**. Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E), 2008.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O Pessegueiro. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. C. B. (Ed.) **A cultura do pessegueiro**. Pelotas, Embrapa: CPACT. 1998, p. 13–19.

SAHPAZ, S.; BORIS, C. H.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D.; HACQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Médica**, v. 60, p. 538–540, 1994.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 120 p. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-15042008-104510/publico/LucianeArias.pdf>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

SANTORO, K.; MAGHENZANI, M.; CHIABRANDO, V.; BOSIO, P.; GULLINO, M. L.; SPADARO, D.; GIACALONE, G. Thyme and savory essential oil vapor treatments control brown rot and improve the storage quality of peaches and nectarines, but could favor gray mold. **Foods**, v. 7, p. 1–17, 2018.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBREAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF, 2018.

SANTOS, J.; BASSOLS RASEIRA, M.D.C.; ZANANDREA, I. Resistência à podridão parda em pessegueiro. **Bragantia**, v. 71, p. 219–225, 2012.

SANTOS, J. F. S.; ROCHA, J. E.; BEZERRA, C. F.; NASCIMENTO SILVA, M. K.; MATOS, Y. M. L. S.; FREITAS, T. S.; SANTOS, A. T. L.; CRUZ, R. P.; MACHADO, A.J. P.; RODRIGUES, T.H.S.; BRITO, E.D.; SALES, D.L.; ALMEIDA, W.; COSTA, J.D.M.; COUTINHO, H., M. F. B. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SANTOS, C. **Novas alternativas de testes de agrupamento avaliados por meio de simulação Monte Carlo**. 85f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants'

extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, p. 1–10, 2011.

SCARIOTTO, S.; QUILOT-TURION, B.; POËSSEL, J.; RASEIRA, M.; DINI, M.; ROTH, F. Caracterização de compostos fenólicos e triterpenos em pêssegos e nectarinas do Banco de Germoplasma da Embrapa. **Embrapa Clima Temperado-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2018.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; H. A. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 137–142, 1994.

SCHUMANN K. **Artemia (brine shrimp) FAQ 1.1**. Portland State University, 1995.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p. 129–137, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. **Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais**. II Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Anais...São Pedro: USP**, 2003

SEIXAS, P.T.L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G.R.; CARDOSO, D. P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 523–526, 2011.

SERVILI, A.; FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 133, p. 36–40, 2017.

SHAOJIE, D.; WENLI, Z. Response of growth and development of *Artemia salina* to four kinds of heavy metals stress. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, p. 1164–1171, 2012.

SHEHATA, S. A.; ABDELDAYM, E. A.; ALI, M. R.; MOHAMED, R. M.; BOB, R. I.; ABDELGAWAD, K. F. Effect of some citrus essential oils on post-harvest shelf life and physicochemical quality of strawberries during cold storage. **Agronomy**, v. 10, p. 1466, 2020.

SILVA, A. C. R. D.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B. D.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305–6316, 2012.

SILVA, M.B.; MORANDI, M.A.B.; JUNIOR, T.J.P.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: PALLINI, V. M. J. T. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: EPAMIG, p. 33–54, 2010.

SILVA, W. R.; MOREIRA-NUÑEZ, V.; GAVIRIA-HERNANDÉZ, V.; GONÇALVES, V. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; FARIAS, C. R. J. Fungitoxicidade de extratos vegetais e óleo essencial de alecrim no crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris oryzae*. **MAGISTRA**, v. 29, p. 257–265, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES.; A, C. M. O. E. T (Eds.).

**Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Santa Catarina, p. 394–412, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 467–495, 2000.

SIMÕES, K. **Caracterização do eliciador do fungo *Mucor ramosissimus* e estudo da supressão de sua atividade indutora de soja por fragmentos de polissacarídeos pécticos.** 101 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004. Disponível em: <  
[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317717/1/Simoes\\_Kelly\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317717/1/Simoes_Kelly_M.pdf)  
>. Acesso em: 08 mar. 2020.

SIMON, J. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; JARDINETTI, V. D. A.; OLIVA, L. S. D. C.; SILVA, J. B. D.; SCARABELI, I. G. R. Atividade fungitóxica de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Diplocarpon rosae*. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 351–356, 2016.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27–37, 2014.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; LEITE, N. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. . Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sobleianum* Proença & Landrum contra metais pesados. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 12, p. 401–409, 2014.

SOUZA, D.C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L.A.; MAY DE MIO, L.L.; ANGELI, S.S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot on peaches in Brazil. **Phytopathology**, v. 98, p. 148–149, 2008.

SOUZA, N. A. B.; LIMA, E. D. O.; GUEDES, D. N.; PEREIRA, F. D. O.; SOUZA, E. L. D.; SOUSA, F. B. D. Efficacy of Origanum essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 499–508, 2010.

SOUZA, L. S. S. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal.** 79 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L. .; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. ; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 18–46, 2011.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 16–21, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235–270, 1997.



- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 45–62, 2004.
- TAVARINI, S.; INNOCENTI, E. D.; REMORINI, D.; MASSAI, R.; GUIDI, L. Original article preliminary characterisation of peach cultivars for their antioxidant capacity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 810–815, 2008.
- TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>
- TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 1–13, 2004.
- THOMIDIS, T.; MICHAILIDES, T. J. Development and implementation of cost-effective strategies to manage brown rot of peach trees in Imathia, Greece. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 575–582, 2010.
- THOMIDIS, T.; SOTIROPOULOS, T.; KARAGIANNIDIS, N.; TSIPOURIDIS, C.; PAPADAKIS, I.; ALMALIOTIS, D.; BOULGARAKIS, N. Efficacy of three calcium products for control of peach brown rot. **Horticulture Technology**, v. 17, p. 234–237, 2007.
- TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, p. 98–106, 2011.
- TOUBA, E. P.; ZAKARIA, M.; TAHEREH, E. Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in vitro. **Microbial pathogenesis**, v. 52, p. 125–129, 2012.
- TSAO, R.; ZHOU, T. Antifungal activity of monoterpenoids against post harvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 113–121, 2000.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231–1246, 2010.
- TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593–606, 2007.
- UTYAMA, I. K. A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; PIMENTA, F.C.; ITO, I. Y. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia IV**, v. 4, p. 202–207, 2007.
- VAN DE VEL, E.; SAMPERS, I.; RAES, K. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 357–378, 2017.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-

related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

VAZQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VAZQUEZ, M. J.; CEPEDA, A. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **International journal of food microbiology**, v. 67, p. 157–163, 2001.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M. (Ed.). **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, 2002, p. 111–122.

VENTUROSO, L. D. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 18–23, 2011.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; CONUS, L. A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 449–505, 2010.

VERBENE, M.C.; VERPOORTE, R.; BOL, J.F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 779–783, 2000.

VERDI, L.G; BRIGHENTE, I.M.C; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85–94, 2005.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; SILVA NASCENTE, P. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.

VILLARINO, M.; MELGAREJO, P.; USALL, J.; SEGARRA, J.; LAMARCA, N.; DE CAL, A. Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 585–598, 2012.

VILLARINO, M.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 224, p. 22–27, 2016.

VISMARA, L. D. S. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea* in vitro e ação toxicológica**. 213 p. Tese (Doutorado), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Brnco, PR, 2019.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v. 17, p. 1–26, 2003.

WAGNER JÚNIOR, A.; RASEIRA, M. C.B.; PIEROBOM, C. R.; FORTES, J. F.; SILVA, J. B. Non-Correlation of Flower and Fruit Resistance to Brown Rot (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) Among 27 Peach Cultivars and Selections. **Journal of the**

**American Pomological Society**, v. 59, p. 148–152, 2005.

WAGNER JÚNIOR, A. **Avaliação de germoplasma de pessegueiro, quanto à reação à *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey**. 74 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2003.

WAITHAKA, P. N.; GATHURU, E. M.; GITHAIGA, B. M.; KIMANI, S. N. Control of passion fruit fungal diseases using essential oils extracted from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and eucalyptus (*Eucalyptus agglomerata*) in Egerton University Main Campus Njoro, Kenya. **International journal of microbiology**, v. 2017, 2017.

WANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, H.; FAN, Y.; SHI, Z. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 137–143, 2010.

WANG, Y.; WEI, K.; HAN, X.; ZHAO, D.; ZHENG, Y.; CHAO, J.; GOU, J.; KONG, F.; ZHANG, C. S. The antifungal effect of garlic essential oil on *Phytophthora nicotianae* and the inhibitory component involved. **Biomolecules**, v. 9, p. 632, 2019.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, p. 1306–1320, 2012.

WESTWOOD, N. . **Fruticultura de zonas temperadas**. Madrid. Mundiprensa, 1982.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.B.T. J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, W. T. (Ed.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc., New York, 1990, p. 315–322.

WIRTH, S.J.; WOLF, G. A. Micro-plate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 511–519, 1992.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A Review. **Antioxidants**, v. 6, p. 70, 2017.

YIN, M. C.; TSAO, S. M. I. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Journal of food microbiology**, v. 49, p. 49–56, 1999.

YOON, H. S.; MOON, S. C.; KIM, N. D.; PARK, B. S.; JEONG, M. H.; YOO, Y. H. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, p. 151–156, 2000.

YUAN, Y.; HUANG, M.; PANG, Y. X.; YU, F. L.; CHEN, C.; LIU, L. W.; CHEN, Z.X.; ZHANG, Y.B.; CHEN, X. L.; HU, X. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. **Molecules**, v. 21, p. 1024, 2016.

YUN, J.; LEE, H.; KO, H. J.; WOO, E.-R.; LEE, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, p. 695–701, 2015.

ZAKER, M. Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control – a review. **The Agriculturists**, v. 14, p. 134–141, 2016.

ZHANG, H. Q.; LAI, R. Q.; CHEN, Z. M.; ZENG, W. L.; ZHONG, X. J. Inhibitory effects of garlic extracts on *Ralstonia solanacearum* in laboratory. **Tobacco Science and Technology**, v. 3, p. 62–64, 2009.

ZWIETERING, M. H.; DE WIT, J. C.; CUPPERS, H. G. A. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 204–213, 1994.

## ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS

- APÊNDICE 1** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 137
- APÊNDICE 2** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 137
- APÊNDICE 3** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 137
- APÊNDICE 4** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 137
- APÊNDICE 5** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 138
- APÊNDICE 6** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato

- indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 138
- APÊNDICE 7** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 138
- APÊNDICE 8** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 138
- APÊNDICE 9** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 139
- APÊNDICE 10** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 139
- APÊNDICE 11** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 139
- APÊNDICE 12** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 139
- APÊNDICE 13** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 140
- APÊNDICE 14** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 140
- APÊNDICE 15** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato

- direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 140
- APÊNDICE 16** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 140
- APÊNDICE 17** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos com extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 141
- APÊNDICE 18** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 141
- APÊNDICE 19** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 141
- APÊNDICE 20** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos com extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 141
- APÊNDICE 21** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 142
- APÊNDICE 22** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 142
- APÊNDICE 23** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 142
- APÊNDICE 24** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna,

- orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 142
- APÊNDICE 25** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 143
- APÊNDICE 26** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 143
- APÊNDICE 27** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 143
- APÊNDICE 28** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 143
- APÊNDICE 29** - Análise de variância (ANOVA) para indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por meio da aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais (frio, quente e hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água, avaliado pela absorvância de 285nm. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 144
- APÊNDICE 30** - Análise de variância (ANOVA) para taxa de mortalidade (%) de *Artemia salina* em relação a toxicidade de diferentes tratamentos oriundos de cada tipo de extração. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021. .... 144
- APÊNDICE 31** - Análise de variância (ANOVA) para incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 144
- APÊNDICE 32** - Análise de variância (ANOVA) para severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 144
- APÊNDICE 33** - Análise de variância (ANOVA) para incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021..... 145

<b>APÊNDICE 34</b> - Análise de variância (ANOVA) para severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com <i>M. fructicola</i> . UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	145
<b>APÊNDICE 35</b> - Análise de variância (ANOVA) para teor de proteína (mg g <sup>-1</sup> tecido) presente em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	145
<b>APÊNDICE 36</b> - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Uabs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> x 10 <sup>-2</sup> ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	145
<b>APÊNDICE 37</b> - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima quitinase (U.E mg <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	146
<b>APÊNDICE 38</b> - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima β-1,3-glucanase (U.E min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.....	146
<b>ANEXO 1</b> - Cromatografia do óleo essencial de alho.....	148
<b>ANEXO 2</b> - Cromatografia do óleo essencial de alecrim.....	149
<b>ANEXO 3</b> - Cromatografia do óleo essencial de cravo-da-índia.....	150
<b>ANEXO 4</b> - Cromatografia do óleo essencial de orégano.....	151
<b>ANEXO 5</b> - Cromatografia do óleo essencial de losna.....	152
<b>ANEXO 6</b> - Cromatografia do óleo essencial de pitangueira.....	153
<b>ANEXO 7</b> - Análise molecular do fungo <i>Monilinia fructicola</i> .....	154



**APÊNDICES**

**APÊNDICE 1** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fruticola* após aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	383.4	383.4	567.597***
Tratamentos	7	762.4	108.9	161.266***
Trat*Tempo	7	395.1	56.4	83.558***
Resíduos	319	215.5	0.7	
Total	334	1756.4		
C.V.(%)			9,52	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 2** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fruticola* após aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	411.7	411.7	1165.604***
Tratamentos	7	968.8	138.4	391.810***
Trat*Tempo	7	415.2	59.3	167.900***
Resíduos	319	112.7	0.4	
Total	334	1908.4		
C.V.(%)			6,72	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 3** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fruticola* após aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	879.1	879.1	1471.809***
Tratamentos	7	672.9	96.1	160.959***
Trat*Tempo	7	296	42.3	70.802***
Resíduos	319	190.5	0.6	
Total	334	2038.5		
C.V.(%)			7,5	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 4** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fruticola* após aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	1330.6	1330.6	3.425***
Tratamentos	7	731.3	104.5	269***
Trat*Tempo	7	291.2	41.6	107***
Resíduos	319	123.9	0.4	
Total	334	2477		
C.V.(%)			11,43	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 5** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	960.5	960.5	1.526***
Tratamentos	7	603	86.1	137***
Trat*Tempo	7	224.4	32.1	50.94***
Resíduos	319	200.8	0.6	
Total	334	1988.7		
C.V.(%)			20%	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 6** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	1363.4	1363.4	1579.903***
Tratamentos	7	469.4	67.1	77.710***
Trat*Tempo	7	234.8	33.5	38.876***
Resíduos	319	275.3	0.9	
Total	334	2342.9		
C.V.(%)			22,4	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 7** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato direto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	687.6	687.6	5.331***
Tratamentos	7	993.5	141.9	1.101***
Trat*Tempo	7	432.2	61.7	478.78***
Resíduos	319	41.1	0,1	
Total	334	2154.4		
C.V.(%)			5,09	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 8** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* após aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, por meio de contato indireto in vitro em função do tempo de incubação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tempo	1	1737.6	1737.6	3.909***
Tratamentos	7	689.3	98.5	222***
Trat*Tempo	7	276.3	39.5	88.8***
Resíduos	319	141.8	0.4	
Total	334	2845		
C.V.(%)			10,52	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 9** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	9	9.44	1.823 <sup>ns</sup>
Tratamentos	1	219	219.11	42.321***
Ext*Trat	1	1	0.8	0.155*
Resíduos	667	3453	5.18	
Total	670	3682		
C.V.(%)			13,07	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 10** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	21.2	21.19	3.206 <sup>ns</sup>
Tratamentos	1	143.5	143.52	21.715***
Ext*Trat	1	1.3	1.29	0,194*
Resíduos	91	601	6.61	
Total	94	767.4		
C.V.(%)			9,38	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 11** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	42.8	42.8	7.869**
Tratamentos	1	158.9	158.91	29.215***
Ext*Trat	1	8.5	8.51	1.565*
Resíduos	91	495	5.44	
Total	94	705.2		
C.V.(%)			8,64	

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 12** - Análise de variância (ANOVA) para crescimento micelial (cm) de *Monilinia fructicola* com aplicação de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	181.4	181.36	20.980***
Tratamentos	1	104.4	104.44	12.081***
Ext*Trat	1	11.6	11.63	1.346*
Resíduos	91	787	8.64	
Total	94	1084.1		
C.V.(%)			8,23	

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 13** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	46510	46510	43.131***
Tempo	1	9852	9852	9.136**
Trat*Tempo	1	3742	3742	3.470*
Resíduos	331	356.938	1078	
Total	334	417042		
C.V.(%)				25,11

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 14** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com óleo essencial de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	64895	64895	62.478***
Tempo	1	12049	12049	11.600***
Trat*Tempo	1	1372	1372	1.321*
Resíduos	331	343.802	1039	
Total	334	422118		
C.V.(%)				21,92

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 15** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	3072	3072	1.257 <sup>ns</sup>
Tempo	1	59049	59049	24.156***
Trat*Tempo	1	36894	36894	15.093***
Resíduos	331	809.120	2444	
Total	334	908135		
C.V.(%)				27,59

<sup>ns</sup> não significativo. \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 16** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	8951	8951	5.318*
Tempo	1	12233	12233	7.268**
Trat*Tempo	1	6717	6717	3.990*
Resíduos	331	557.143	1683	
Total	334	585044		
C.V.(%)				24,29

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ .

**APÊNDICE 17** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos com extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto e indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	59596	59596	107.709***
Tempo	1	332	332	0,599 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	3070	3070	5.548*
Resíduos	331	183.145	553	
Total	334	246143		
C.V.(%)				24,39

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 18** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	59596	59596	107.709***
Tempo	1	332	332	0.599 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	3070	3070	5.548*
Resíduos	331	183145	553	
Total	334	246143		
C.V.(%)				16,13

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 19** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, após dias de exposição aos tratamentos com extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	18739	18739	17.112***
Tempo	1	12329	12329	11.259***
Trat*Tempo	1	315	315	0,288*
Resíduos	331	362.469	1095	
Total	334	393852		
C.V.(%)				16,74

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 20** - Análise de variância (ANOVA) para inibição (%) do crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos com extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	55377	55377	104.687***
Tempo	1	2433	2433	4.599*
Trat*Tempo	1	3949	3949	7.465**
Resíduos	331	175.090	529	
Total	334	236849		
C.V.(%)				29,95

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 21** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.288	0.2884	3.644 <sup>ns</sup>
Tempo	1	0.058	0.0576	0,728 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.452	0.4521	5.712*
Resíduos	331	26.197	0.0791	
Total	334	26197.8		
C.V.(%)				35,33

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 22** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos dos óleos essenciais de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.284	0.28406	4.775*
Tempo	1	0.073	0.07337	1.233 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.142	0.14156	2.380*
Resíduos	331	19.691	0.05949	
Total	334	19691.5		
C.V.(%)				29,56

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 23** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.288	0.2884	3.644 <sup>ns</sup>
Tempo	1	0.058	0.0576	0,728 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.452	0.4521	5.712*
Resíduos	331	26.197	0.0791	
Total	334	26197.8		
C.V.(%)				29,24

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 24** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato frio de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.284	0.28406	4.775*
Tempo	1	0.073	0.07337	1.233 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.142	0.14156	2.380*
Resíduos	331	19.691	0.05949	
Total	334	19691.5		
C.V.(%)				19,92

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 25** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.157	0.157	3.270 <sup>ns</sup>
Tempo	1	0.37	0.3697	7.701**
Trat*Tempo	1	0.222	0.2215	4.615*
Resíduos	331	15.888	0.048	
Total	334	15888.75		
C.V.(%)			24,16	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ .

**APÊNDICE 26** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato quente de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.914	0.9143	15.540***
Tempo	1	0.111	0.1111	1.888*
Trat*Tempo	1	0.011	0.0113	0.191*
Resíduos	331	19.474	0.0588	
Total	334	19475.04		
C.V.(%)			27,01	

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 27** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato direto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.229	0.22926	6.372*
Tempo	1	0.023	0.02333	0,649 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.003	0.00279	0.078*
Resíduos	331	11.909	0.03598	
Total	334	11909.26		
C.V.(%)			16,56	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 28** - Análise de variância (ANOVA) para índice de velocidade de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* após dias de exposição aos tratamentos de extrato hidroalcoólico de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano e pitangueira e das testemunhas água e controle químico, aplicados por contato indireto. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.736	0.7359	13.528***
Tempo	1	0.207	0.2073	3.810 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.046	0.0463	0.85*
Resíduos	331	18.006	0.0544	
Total	334	18006.99		
C.V.(%)			17,04	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$



**APÊNDICE 29** - Análise de variância (ANOVA) para indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por meio da aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais (frio, quente e hidroalcoólico) de alecrim, alho, cravo-da-índia, losna, orégano, pitangueira, além dos controles químicos e com água, avaliado pela absorvância de 285nm. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	0,002318	0,0023180	10,383**
Tratamentos	1	0,000016	0,0000164	0,073 <sup>ns</sup>
Extr*Trat	1	0,000228	0,0002279	1,021*
Resíduos	123	0,027461	0,0002233	
Total	126	0,30023		
C.V.(%)			31,02	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ .

**APÊNDICE 30** - Análise de variância (ANOVA) para taxa de mortalidade (%) de *Artemia salina* em relação a toxicidade de diferentes tratamentos oriundos de cada tipo de extração. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Extração	1	681	681	0,539 <sup>ns</sup>
Tratamentos	1	73752	73752	58,361***
Extr*Trat	1	810	810	0,641*
Resíduos	123	155439	1264	
Total	126	230682		
C.V.(%)			18,89	

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE 31** - Análise de variância (ANOVA) para incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar "Dourado" expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	170016	170016	339,94***
Tempo	1	205202	205202	410,29***
Trat*Tempo	1	72365	72365	145***
Resíduos	303	151543	500	
Total	306	599126		
C.V.(%)			33,99	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 32** - Análise de variância (ANOVA) para severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar "Dourado" expostos aos diferentes tratamentos em contato direto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	235.1	235.1	371.874***
Tempo	1	348.2	348.2	550.757***
Trat*Tempo	1	111.5	111.5	176.333***
Resíduos	303	191.6	0.6	
Total	306	886.4		
C.V.(%)			38,78	

\*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 33** - Análise de variância (ANOVA) para incidência (%) de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	14285	14285	12.008***
Tempo	1	83994	83994	70.605***
Trat*Tempo	1	3783	3783	3.180*
Resíduos	135	160600	1190	
Total	138	262662		
C.V.(%)				21,76

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 34** - Análise de variância (ANOVA) para severidade de podridão parda em frutos de pessegueiro cultivar “Dourado” expostos aos diferentes tratamentos em contato indireto e após inoculados com *M. fructicola*. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	28.29	28.29	17.309***
Tempo	1	132.11	132.11	80.833***
Trat*Tempo	1	7.07	7.07	4.327*
Resíduos	135	220.64	1.63	
Total	138	388.11		
C.V.(%)				21,78

\* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 35** - Análise de variância (ANOVA) para teor de proteína ( $\text{mg g}^{-1}$  tecido) presente em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	1.10	1.070	0.0630 <sup>ns</sup>
Tempo	1	1.30	1.349	0.0790*
Trat*Tempo	1	6.10	6.134	0.3610*
Resíduos	91	1545.10	16.979	
Total	94	1553.60		
C.V.(%)				20,51

<sup>ns</sup> não significativo. \* Significativo a  $0,01 \geq p \leq 0,05$ .

**APÊNDICE 36** - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) ( $\text{Uabs min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}^{-1} \times 10^{-2}$ ) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.0002326	0.0002326	16,524***
Tempo	1	0.0005958	0.0005958	42,336***
Trat*Tempo	1	0.0001109	0.0001109	7,877**
Resíduos	91	0.0012807	0.0000141	
Total	94	0.0022200		
C.V.(%)				15,14

\*\*Significativo a  $0,01 < p < 0,001$ . \*\*\*Significativo  $p < 0,001$

**APÊNDICE 37** - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima quitinase (U.E mg<sup>-1</sup> proteína<sup>-1</sup>) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	6.006e <sup>-05</sup>	6.006e <sup>-05</sup>	41,604 <sup>ns</sup>
Tempo	1	2.929e <sup>-05</sup>	2.929e <sup>-05</sup>	20,289 <sup>***</sup>
Trat*Tempo	1	1.000e <sup>-08</sup>	1.000e <sup>-08</sup>	0,0080 <sup>***</sup>
Resíduos	91	1.314e <sup>-04</sup>	1.440e <sup>-06</sup>	
Total	94			
C.V.(%)			11,40	

<sup>ns</sup> não significativo. <sup>\*\*\*</sup>Significativo p<0,001

**APÊNDICE 38** - Análise de variância (ANOVA) para atividade da enzima β-1,3-glucanase (U.E min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína<sup>-1</sup>) em pêssegos cultivar “Dourado” tratados na pós-colheita em contato direto e indireto com óleo essencial de alho, cravo-da-índia e orégano em função do tempo de avaliação. UTFPR, Pato Branco, PR, 2021.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0.000189	0.000189	4.008 <sup>ns</sup>
Tempo	1	0.000362	0.000362	7.669 <sup>ns</sup>
Trat*Tempo	1	0.000019	1.86E <sup>-05</sup>	0,394 <sup>ns</sup>
Resíduos	91	0.004293	4.72E <sup>-05</sup>	
Total	94	0.004863		

<sup>ns</sup> não significativo.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 - Cromatografia do óleo essencial de alho.



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: nucleo@qui.ufmg.br

UFMG

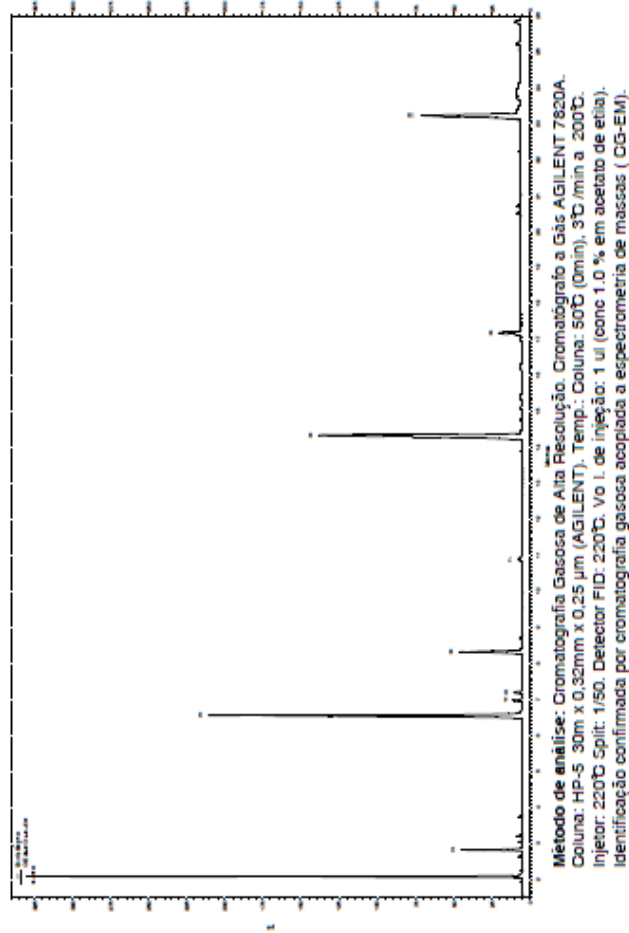
### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA.

CNPJ: 07.997.093/0001-10

#### ÓLEO ESSENCIAL de ALHO - LN

Nome comercial: Óleo de Alho  
 Nomenclatura botânica: Allium sativum  
 Parte da planta: Rizoma  
 Origem : China



#### Composição Química

Pico	IR	Constituintes	%
1	953	alli metil disulfeto	14.6
2	973	dimetiltrisulfeto	2.8
3	1075	dialil disulfeto	26.3
4	1086	dipropil disulfeto	0.9
5	1092	alli propenil disulfeto	0.8
6	1123	alli metil trisulfeto	5.5
7	1192	dimetil tetrasulfeto	0.7
8	1286	dialil trisulfeto	25.2
9	1362	alli metil tetrasulfeto	2.7
10	1526	dialil tetrasulfeto	12.9
		outros	7.7

*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 09/08/2018



## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

### ÓLEO ESSENCIAL de ALECRIM da HORTA QT3

Nome comercial: Alecrim da Horta Qt3.

Lote:

Nomenclatura botânica: *Rasmarinus officinalis*.

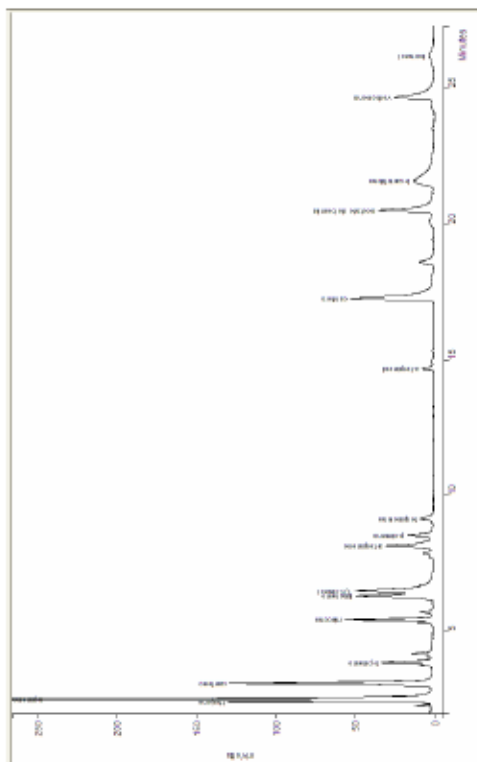
Extração: Destilação por arraste à vapor.

Método de cultivo:

Parte da planta: Folhas e galhos.

Origem: Brasil.

Composição Química:	
Pico	Constituinte ID %
1	thujeno 5,5
2	$\alpha$ -pineno 29,9
3	cariofileno 9,1
5	$\beta$ -pineno 2,6
7	sabineno 1,1
9	mirreno 3,2
11	limoneno 4,6
12	1,8-cineol 6,8
15	$\alpha$ -terpineno 3,5
16	p-cimeno 1,5
17	terpinoleno 0,9
18	$\alpha$ -terpineol 0,7
20	cãnfora 8,9
24	acetato bornila 5,2
25	$\beta$ -cariofileno 4,4
27	vebenol 0,3
28	verbenona 4,9
29	borneol 1,1



#### Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
 Coluna: DB-Wax 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C. Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FI D: 250°C. Volume de injeção: 1  $\mu$ l (conc 0,5% em hexano)

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 25/08/2008

*Vany Ferraz*

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br



## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

### ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO BOTÕES

Nome comercial: Cravo Botões GT Brasil.

Lote: cravbotext03

Nomenclatura botânica: *Syzygium aromaticum*.

Extração: Destilação por arraste a vapor.

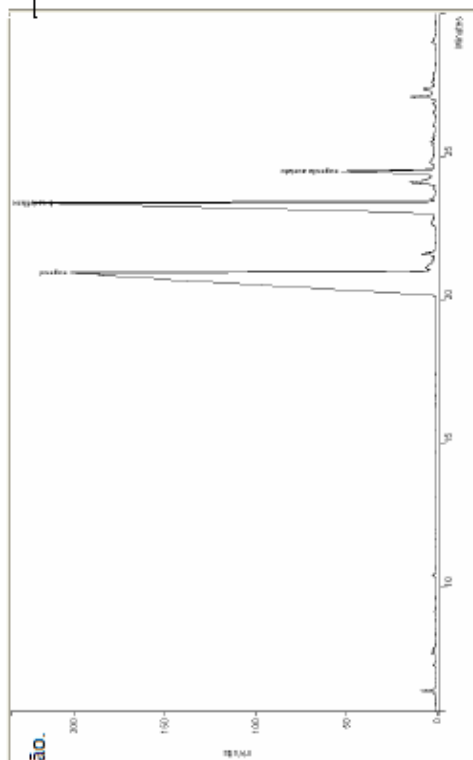
Método de cultivo: orgânico sem certificação.

Parte da planta: botões.

Origem: Brasil.

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
2	eugenol	61,2
6	$\beta$ -cariofileno	31,2
8	eugenila acetato	3,4



Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

#### Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.

Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FID: 250°C. V. volume de injeção: 1  $\mu$ l (conc 0,5% em hexano)

*Vany Ferraz*  
 Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 06/10/2008



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
Telefone : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

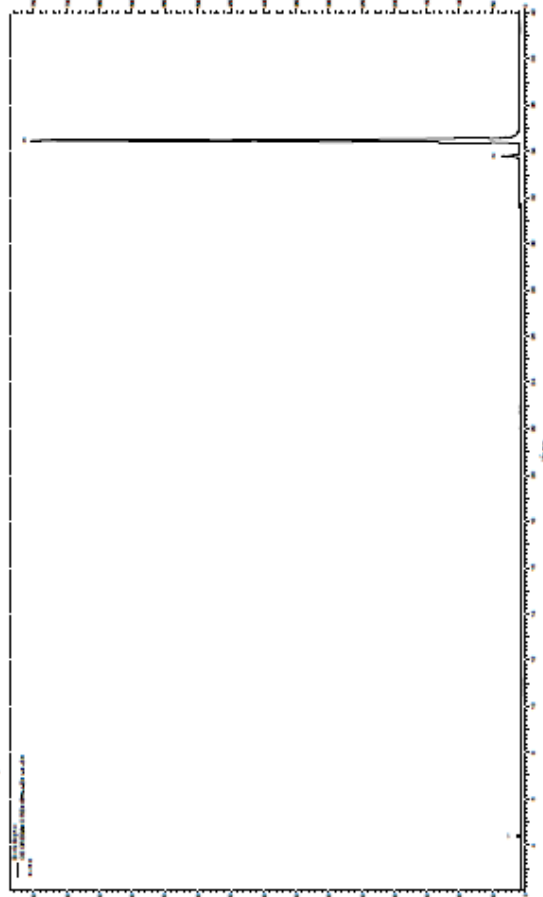
UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: **LASZLO AROMATERAPIA LTDA** CNPJ: 07.997.093/0001-10

### ÓLEO ESSENCIAL de ORÉGANO REDISTILLED - LN

Nome comercial: Óleo de Orégano redistilado  
Nomenclatura botânica: Origanum vulgare  
Extração: Destilação por arraste a vapor  
Parte da planta: Erva  
Origem: Hungria



Método de análise:  
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A. Coluna: Supelcowax-10  
15m x 0,2mm x 0,2 µm (Supelco). Temp.: Coluna: 50°C (2min), 3°C /min a 200°C. Injetor: 200°C Split: 1/30.  
Detector FID: 220°C. Vol. de injeção: 1 µl.

### Composição Química

Pico	IR calc*	Constituintes*	%
1	1256	p-cimeno	0.4
2	2160	timol	3.0
3	2180	carvacrol	96.4
		outros	0.3

Obs: OE analisado em coluna polar tipo  
Carbowax 20M. 1K\* coluna polar.

Dra. Vany Feirraz  
Laboratório de Cromatografia  
Departamento de Química – UFMG  
vanyfeirraz@ufmg.br  
Belo Horizonte, 10/11/2017



## ANEXO 5 - Cromatografia do óleo essencial de losna.



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefone : (31) 3409-5724 – e-mail: nucleo@qui.ufmg.br



## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

## Composição Química:

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

## ÓLEO ESSENCIAL DE ABSINTO GT FRANÇA

Nome comercial: Óleo de Absinto

Nomenclatura botânica: Artemisia absinthium

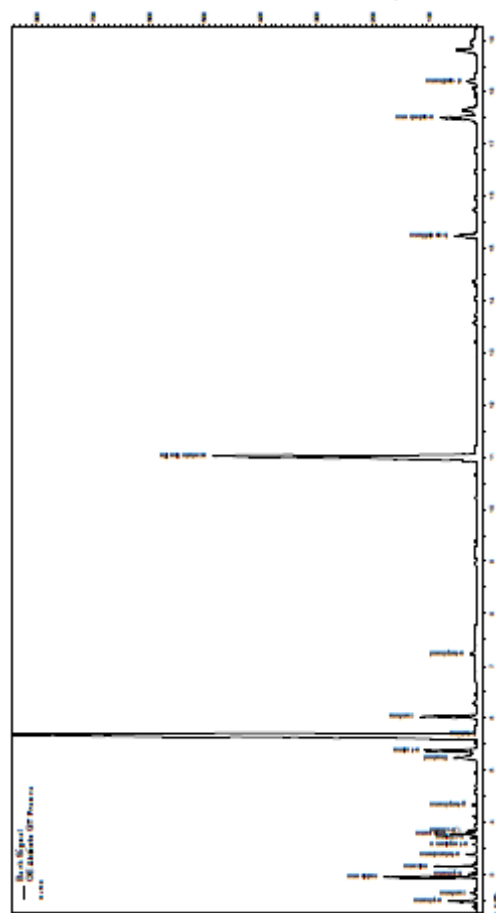
Extração: Destilação por arraste a vapor

Método de cultivo: Convencional

Parte da planta: Erva

Origem: França

Pico	Constituinte ID	%
1	α-pineno	0.7
2	canfeno	0.2
3	sabineno	2.5
4	β-pineno	0.3
5	miroeno	1.4
6	α-felandreno	0.4
7	α-terpineno	0.1
8	p-cimeno	0.2
9	limoneno	0.9
10	1,8-cineol	0.3
11	γ-terpineno	0.2
12	linalool	2.0
13	α-tuiona	2.5
14	β-tuiona	44.4
15	canfora	2.6
16	α-terpineol	0.3
17	acetato linalila	21.7
18	β-cariofileno	1.6
19	α-cubebano	2.8
20	δ-cadineno	0.7
21	espatulenol	1.4




Método de análise:  
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A.  
 Coluna: HP-5 30m x 0.32mm x 0.25 μm (AGILENT). Temp.: Coluna: 70°C (0min), 3°C/min a 250°C.  
 Injetor: 250°C Split: 1/50. Detector FID: 250°C. Vol. de injeção: 1 ul (conc 1.0 % em clorofórmio)

*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 16/09/2014


Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep:31.270-901

## ANEXO 6 - Cromatografia do óleo essencial de pitangueira.



**CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA**

---



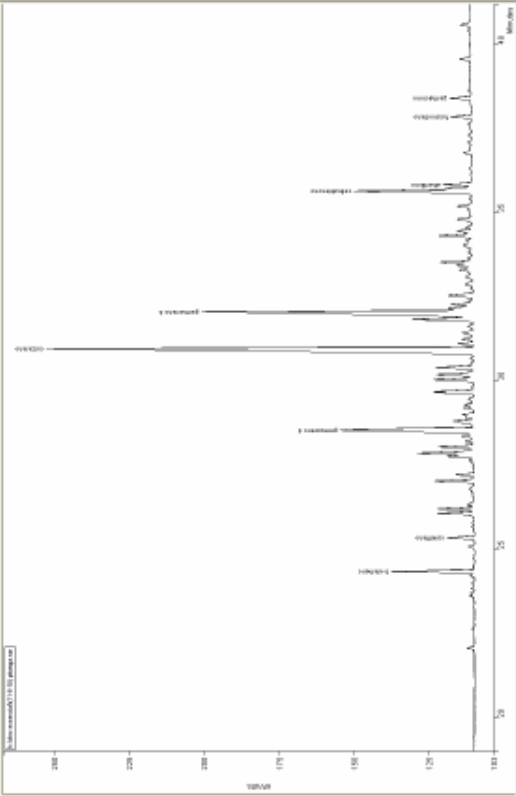
Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: nucleo@qui.ufmg.br

**ÓLEO ESSENCIAL DE PITANGA FOLHAS**

Nome comercial: pitanga folhas  
Nomenclatura botânica: eugenia uniflora  
Extração: destilação por arraste a vapor  
Método de cultivo: orgânico não certificado  
Parte da planta: folhas  
Origem: Brasil

---

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10



---

**Composição Química:**

Pico	Constituinte ID	%
1	β-elemeno	2,9
2	cariofileno	1,0
3	germacreno d	8,2
4	curzereno	25,2
5	germacreno b	16,4
6	selinatrieno	5,0
7	atractilono	1,1
8	furandieno	0,8
9	germacrono	0,7

**Método de análise:**  
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás Hp 5890.  
Coluna: BP1, 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 50°C (1min), 3°C /min, até 200°C. Injetor: 200°C  
Split: 1/50. Detector FID: 220°C. Volume de injeção : 1 ul (conc 1.0 % em clorofórmio)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

---

Dra. Vany Ferraz  
Laboratório de Cromatografia  
Departamento de Química – UFMG  
vanyferraz@ufmg.br  
Belo Horizonte, 09/11/2010

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG – Brasil - Cep: 31.270-901

ANEXO 7 - Análise molecular do fungo *Monilinia fructicola*.

  
 Laboratório de Diagnóstico  
 Fitossanitário e Consultoria  
 Revisão nº 07, em vigor desde 28/06/2019  
 Página 1 de 1

AGRONÔMICA – LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO  
 FITOSSANITÁRIO E CONSULTORIA  
 NIRE 43.205.056.551  
 CNPJ 05.554.224/0001-69  
 www.agronicabr.com.br

FORMULÁRIO – FOR0126 – Laudo de Sanidade Vegetal

Laudo de Sanidade Vegetal 0213/2021-AGR

Data Coleta: 10/12/2020

Recebimento: 23/12/2020

Resultado: 14/01/2021

INTERESSADO:

Ediane Roncaglio Baseggio, Rua João Laurindo Caldatto, Charrua, RS, Brasil, 99960-000, (54) 9996-72045

AMOSTRADO POR:

Ediane Roncaglio Baseggio, Charrua, RS, (54) 9996-72045, Identificação Fiscal -

NATUREZA DA ANÁLISE:

Planta: Pêssego/Pessegueiro (*Prunus persica*)

Variedade/Cultivar: NI

Lote: Placa Ediane - *Monilinia fructicola*

Parte Coletada: Placa

Medida: 1 Placa(s)

MATERIAL:

Lacre: SEM LACRE

Representatividade da amostra: NI

Classe/Marca/Safra: NI

Protocolo: 170675/2021-AGR

Número Amostra: 25841

Descrição: Termo: Termo de Coleta; Número Termo: NI;

ORIGEM:

-

DESTINO:

-

ANÁLISE:

Praga	Laboratório	Método	Procedimento
Fungo	Biologia Molecular	Molecular	POP0040
Fungo	Micologia	Biológica/Molecular	POP0021

Baseado nos resultados das análises o material descrito acima indicou a presença de:

RESULTADO:

Praga	Identificação	Incidência/Quantidade	Status
Fungo	<i>Monilinia fructicola</i>	-	-

DIAGNOSTICADO POR:

Eng. Agr. Dra. Camila Cristina Lage de Andrade e Biól. Juliane Fernandes