

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA

VICTOR THIAGO ESTEGUE GONÇALVES

Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

LARANJEIRAS DO SUL
2024

VICTOR THIAGO ESTEGUE GONÇALVES

Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado ao Curso de Agronomia da
Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus
Laranjeiras do Sul, como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva
Bonome

LARANJEIRAS DO SUL

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Gonçalves, Victor Thiago Estegue

Óleos essenciais no controle in vitro de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. / Victor Thiago Estegue Gonçalves.
-- 2024.

25 f.

Orientador: Doutor Lisandro Tomas da Silva Bonome

Co-orientador: Doutor Gilmar Franzener

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2024.

1. Controle alternativo com óleos essenciais. 2.
Fungos de armazenamento. I. Bonome, Lisandro Tomas da
Silva, orient. II. Franzener, Gilmar, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

VICTOR THIAGO ESTEGUE GONÇALVES

Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

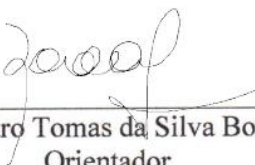
Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome.

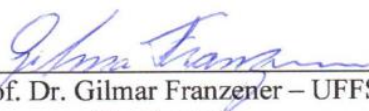
Coorientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 05/02/2024.

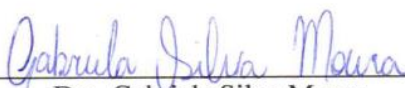
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Lisandro Tomas da Silva Bonome – UFFS
Orientador



Prof. Dr. Gilmar Franzener – UFFS
Coorientador



Dra. Gabriela Silva Moura
Avaliador

Dedico este trabalho aos meus pais, que não
pouparam esforços para que eu pudesse
concluir meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar meus passos e me fortalecer durante esse período que cursei Agronomia na Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Laranjeiras do Sul.

Aos meus pais, avós e irmão, que me incentivaram e me deram apoio para que fosse possível concluir a graduação da melhor forma. A minha mulher Bruna Vieira que desde o início esteve ao meu lado, me apoiando e contribuindo para a realização dos trabalhos, e, em especial a minha filha Luna, que grande parte desse esforço eu dedico a ela.

Aos meus amigos, que compartilhamos a sala de aula por esse período, alegrias e frustrações, foi uma honra conhece-los.

Aos meus orientadores e membros da banca examinadora, obrigado por aceitarem o convite e pelas contribuições para o presente trabalho. Ao professor Lisandro e Gilmar, agradeço pela paciência, companheirismo e aos conhecimentos transmitidos. E a todos os que não citei, mas rezaram e torceram por mim. Muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento micelial de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	14
Figura 2. Crescimento micelial cumulativo de <i>Penicillium</i> sp. (A) e <i>Aspergillus</i> sp. (B) em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> e ao fungicida MAXIM ADVANCED®.	15
Figura 3. Germinação de esporos em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	16
Figura 4. Tamanho de hifas de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	17
Figura 5. Crescimento micelial cumulativo de <i>Penicillium</i> sp. (A) e <i>Aspergillus</i> sp. (B) em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> e ao fungicida MAXIM ADVANCED®.	19
Figura 6. Germinação de esporos de <i>Penicillium</i> sp. e <i>Aspergillus</i> sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	20
Figura 7. Tamanho de hifas de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento micelial de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp. expostos ao óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	15
Tabela 2. Crescimento micelial de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	18

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
MATERIAIS E MÉTODOS	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	22

Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Resumo

Dentre os problemas que assolam a agricultura brasileira, destaca-se as perdas significativas ocasionadas por fungos de armazenamento de grãos e sementes. Esses fungos, em especial os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são responsáveis pela produção de toxinas que afetam diretamente a qualidade e a quantidade de sementes e grãos. O controle de fungos na maioria das vezes é feito através de tratamentos químicos, os quais se mostram mais eficazes. No entanto, os prejuízos que esse método tem causado a saúde humana e ao meio ambiente, tem despertado o interesse de pesquisadores por métodos alternativos de tratamento. Os óleos essenciais apresentam potencial antimicrobiano e possuem menor impacto a saúde humana e ao meio ambiente, se mostrando promissores para substituir os agroquímicos em tratamentos de sementes. Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar a eficácia dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon winterianus* no controle *in vitro* dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. As concentrações dos óleos essenciais utilizadas foram, 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%, e um tratamento com o fungicida MAXIM ADVANCED® (testemunha positiva). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (dois patógenos e cinco concentrações) para as variáveis, crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas, para a variável crescimento micelial cumulativo foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6 (dois patógenos, cinco concentrações + o tratamento fungicida). O óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi eficaz na redução do crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. *in vitro*, demonstrando potencial antifúngico. O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* foi eficaz na redução da germinação de esporos e tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. *in vitro*, apresentando resposta inconclusiva para a variável crescimento micelial.

Para ambos os óleos essenciais avaliados, a medida em que se elevou a concentração aumentou a toxicidade aos patógenos.

Palavras-chave: Tratamento alternativo, fungos de armazenamento, *Ocimum basilicum*, *Cymbopogon winterianus*.

Abstract

Among the problems that plague Brazilian agriculture, the significant losses caused by grain and seed storage fungi stand out. These fungi, especially the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, are responsible for producing toxins that directly affect the quality and quantity of seeds

and grains. Fungus control is most often done through chemical treatments, which are more effective. However, the damage that this method has caused to human health and the environment has aroused the interest of researchers in alternative treatment methods. Essential oils have antimicrobial potential and have less impact on human health and the environment, showing promise for replacing agrochemicals in seed treatments. Therefore, the present work sought to evaluate the effectiveness of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon winterianus* essential oils in the in vitro control of the fungi *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. The concentrations of essential oils used were 0; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.8%, and a treatment with the fungicide MAXIM ADVANCED® (positive control). A completely randomized design in a 2 x 5 factorial scheme (two pathogens and five concentrations) was used for the variables, mycelial growth, spore germination and hyphae size; for the variable cumulative mycelial growth, a completely randomized design in a 2 x factorial scheme was used. 6 (two pathogens, five concentrations + fungicide treatment). *Ocimum basilicum* essential oil was effective in reducing mycelial growth, spore germination and hyphae size of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in vitro, demonstrating antifungal potential. *Cymbopogon winterianus* essential oil was effective in reducing spore germination and hyphae size of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in vitro, showing an inconclusive response to the variable mycelial growth.

For both essential oils evaluated, as the concentration increased, toxicity to pathogens increased.

Keywords: Alternative treatment, storage fungi, *Ocimum basilicum*, *Cymbopogon winterianus*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor de grãos do mundo, contribuindo com 7,8% da produção mundial, sendo superado apenas pela China, Estados Unidos e Índia (FREIRE, 2023). Dentre os insumos utilizados nas lavouras de grão, a semente é de especial importância, pois é depositária tanto das melhorias das características agronômicas realizadas por pequenos agricultores familiares, por seleção massal de cultivares, quanto pelos avanços tecnológicos desenvolvidos pelos pesquisadores ao longo dos anos (FIRECK, 2023). As características agronômicas selecionadas e transferidas pelas sementes são diversas, contribuindo para a formação de cultivares ou variedades mais adaptadas a determinado tipo de solo, clima e região, com maior capacidade produtiva e de resistência a pragas e doenças (SILVA, 2013).

A contaminação dos grãos e sementes por fungos após a colheita pode ocasionar perdas de até 15 % durante o período de armazenamento, comprometendo a qualidade dos grãos e a germinação e o vigor das sementes (SILVA et al., 2013; SANTOS, 2008). Além dos danos direto aos grãos e sementes, os patógenos podem ser introduzidos em novas áreas e passar a constituir um problema aos cultivos agrícolas futuros (DALLA PRIA; SILVA, 2010; MENTEN, 1995).

Dentre os fungos de armazenamento de grãos e sementes, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* merecem destaque, por contaminar uma ampla gama de espécies vegetais, como: milho, trigo, sorgo, nozes, algodão, soja, feijão, entre outras.

Aspergillus sp. apresenta colônia filamentosa formada por hifas septadas. A estrutura de frutificação, típica do gênero, é caracterizada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula, onde se inserem as métulas em espécies bisseriadas, ou as fiálides em espécies unisseriadas, as quais dão origem aos conídios (esporos). Esses conídios apresentam coloração esverdeada-amarelada, os quais são considerados propágulos infecciosos que constituem o ponto de partida para o desenvolvimento do micélio do fungo (MINAMI, 2003; MURRAY et al., 2006).

Penicillium sp. caracteriza-se pela formação de uma estrutura ramificada de conídios que terminam em células conidióginas, chamadas fiálides, com ramificações monoverticilado, biverticilado e triverticilado. Os conídios são esféricos ou elipsoidais, unicelulares e geralmente hialino ou verde, azul-petróleo, verde oliva ou cinza (SAMSON et al., 2010). O aspecto macroscópico das colônias é circular, geralmente verdes, em algumas espécies a cor pode ser amarela, laranja, roxo ou marrom, e a superfície da colônia, também podem apresentar uma textura arenosa, aveludada ou mucilaginosa (PITT, 1985).

Ambos os gêneros, para a ocorrência e desenvolvimento necessitam de condições favoráveis de umidade e temperatura (PINTO, 1996). Quando presente nas sementes produzem uma série de micotoxinas que causam podridão impedindo sua germinação. Além disso, estas micotoxinas são tóxicas ao ser humano e têm sido associadas a efeitos adversos à saúde, incluindo carcinogenicidade hepática (SAMSON et al., 2010). A semente assume um papel central, destacando-se como o meio mais eficaz para a disseminação destes patógenos. Assim, o tratamento de sementes constitui um importante método para preservar suas características sanitárias e para a prevenção de contaminação de áreas livres de patógenos (VALENTINI et al., 2019).

O uso de fungicidas químicos de diferentes formulações e dosagens tem sido o mais difundido e eficaz no tratamento de sementes e doenças (VALZOLINI et al., 2000). Porém o uso desses produtos sintéticos tem sido muito discutido pelos danos que causa a saúde humana e ao meio ambiente (GHINI; KIMATI, 2000). Com isso, tem aumentado o interesse de pesquisadores

por métodos alternativos de tratamento de sementes com produtos naturais. Dentre eles, os óleos essenciais representam importante alternativa a ser explorada, pois além dos efeitos fungicidas (KRISCH et al., 2011; BONOME et al., 2020) são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade para humanos e animais (KRISCH et al., 2011, SIVAKUMAR e BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Entre as espécies vegetais com potencial para atuar como antimicrobiano encontram-se *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Cymbopogon winterianus* (citronela). *Ocimum basilicum* possui como constituinte majoritário do seu óleo essencial o linalol, composto com ação acaricida, bactericida e fungicida (BLANK et al., 2005; CHAGAS et al., 2021). Já *Cymbopogon winterianus* apresenta como constituintes majoritários os compostos citronelal, geraniol e β -citronelol, com propriedades antimicrobianas e repelente (SCHERER et al., 2009; CHAGAS et al., 2021).

Estudos sobre os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais *in vitro*, no crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas constituem o primeiro passo para avaliar o potencial fungicida destes compostos, pois possibilita o ajuste de dosagens mais apropriadas para a inibição das estruturas de crescimento e desenvolvimento dos patógenos.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon winterianus* na inibição do crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas dos fungos de armazenamento *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve seus experimentos conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Análise de Sementes da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Campus Laranjeiras do Sul – PR.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, sendo dois patógenos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e cinco concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon winterianus*, contendo quatro repetições cada concentração. Para crescimento micelial cumulativo foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x6, sendo dois patógenos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e cinco concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon winterianus*, e o fungicida comercial MAXIM ADVANCED®.

Obtenção dos óleos essenciais e fungos

A obtenção do óleo essencial de manjeriço foi realizada no laboratório de Fisiologia Vegetal por meio de um destilador do tipo Clevenger, com balão de vidro com capacidade de 2000 ml, tendo como matéria prima folhas in natura de manjeriço (*Ocimum basilicum*) colhidas entre

os meses de janeiro e fevereiro. Foram utilizados 300 gramas de folhas em aproximadamente 1500 ml de água destilada. A extração foi realizada por 20 horas e, o processo foi repetido por 3 vezes, tendo como rendimento total aproximadamente 4,5 ml. No final de cada processo realizou-se a separação hidrolato do óleo essencial.

O óleo essencial puro de citronela (*Cymbopogon winterianus*) foi adquirido da empresa Silicamp Ltda.

Para a obtenção dos fungos seguiu-se o protocolo do Manual de Análises Sanitárias de Sementes (2009). Para isso uma folha de papel germitest foi umedecida com 2,5 vezes o seu peso com água destilada e disposta em uma caixa do tipo gerbox. Após esse procedimento, foram semeadas 25 sementes de feijão em cada gerbox, os quais foram acondicionados em BOD a 25° C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Concluído este período foi avaliado a presença dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.. Constatada a presença dos fungos, estes foram isolados em placas de petri com o meio de cultura BDA.

Avaliações *in vitro* de crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas

Para o teste de crescimento micelial *in vitro*, primeiramente preparou-se o meio BDA na proporção de 42 g BDA/1000 mL de água destilada. O preparado foi autoclavado a 121° C por 20 minutos e, após o meio fundido chegar a aproximadamente 40° C, foi adicionado alíquotas de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon winterianus* ao meio de cultura e verteu-se em placas de petri previamente autoclavadas. O meio de cultivo para o tratamento testemunha foi preparado apenas com BDA diluído em água destilada e o meio de cultivo para o tratamento com o fungicida comercial MAXIM ADVANCED® (testemunha positiva) foi preparado com BDA + fungicida na proporção recomendada pelo fabricante de 100 kg de sementes para 125 mL do produto, mais adição de 500 mL de água para a calda.

Discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo micélios de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. foram depositadas na região central das placas de petri esterilizadas com seus respectivos tratamentos. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25°C ± 2°C na BOD.

Realizou-se medições perpendiculares dos diâmetros de cada colônia com uma régua três dias após a inoculação. Foram realizadas 8 medições em um período de 20 dias, sendo interrompida no momento em que a primeira colônia alcançasse a borda da placa de petri.

Para a contagem do número de esporos germinados, foi necessário determinar a concentração de esporos por mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico (Olympus – CX 21). A concentração inicial da suspensão de *Aspergillus* sp. foi de $4,4 \times 10^7$

esporos/ mL e de *Penicillium* sp., $4,0 \times 10^7$ esporos/ mL. Identificada a concentração inicial das suspensões de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. realizou-se uma diluição para $1,0 \times 10^6$ esporos/ mL.

Lâminas de microscopia foram colocadas em placas de petri forradas em sua base com papel filtro umedecido. Após foi adicionado as lâminas 1000 μ L do meio de cultura com as concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% dos óleos essenciais e, em seguida adicionada uma alíquota de 30 μ L da suspensão de esporos. As placas foram mantidas por 20 horas a 25° C no escuro e após esse período o desenvolvimento dos esporos foi interrompido por meio da adição de 10 μ L de azul de metileno a lâmina.

Para a contagem dos esporos germinados utilizou-se a objetiva de aumento de 40X de um microscópio óptico. Realizou-se a contagem de 100 esporos aleatoriamente de cada repetição, sendo no total de 4 por tratamento, e foi determinado através desse procedimento o número de esporos germinados (tubo germinativo emitido). Nesse mesmo teste foi realizada a medição do tamanho de hifas com o auxílio de uma régua milimetrada acoplada a ocular do microscópio. O comprimento de 5 hifas por repetição foi medido e posteriormente realizado a média aritmética. O valor obtido foi multiplicado por 4 para a obtenção dos dados na unidade de medida de μ m.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo aplicada análise de regressão ou comparação múltipla de médias pelo teste de tukey ($p < 0,05$) quando não foi possível ajustar uma curva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi verificado efeito significativo no crescimento micelial para os fatores concentração e patógeno isoladamente, Figura 1 e Tabela 1, respectivamente.

Ocorreu inibição linear no crescimento micelial dos patógenos com o aumento da concentração do óleo essencial, com redução de 37% na maior concentração do óleo essencial (0,8%) em relação a testemunha (Figura 1).

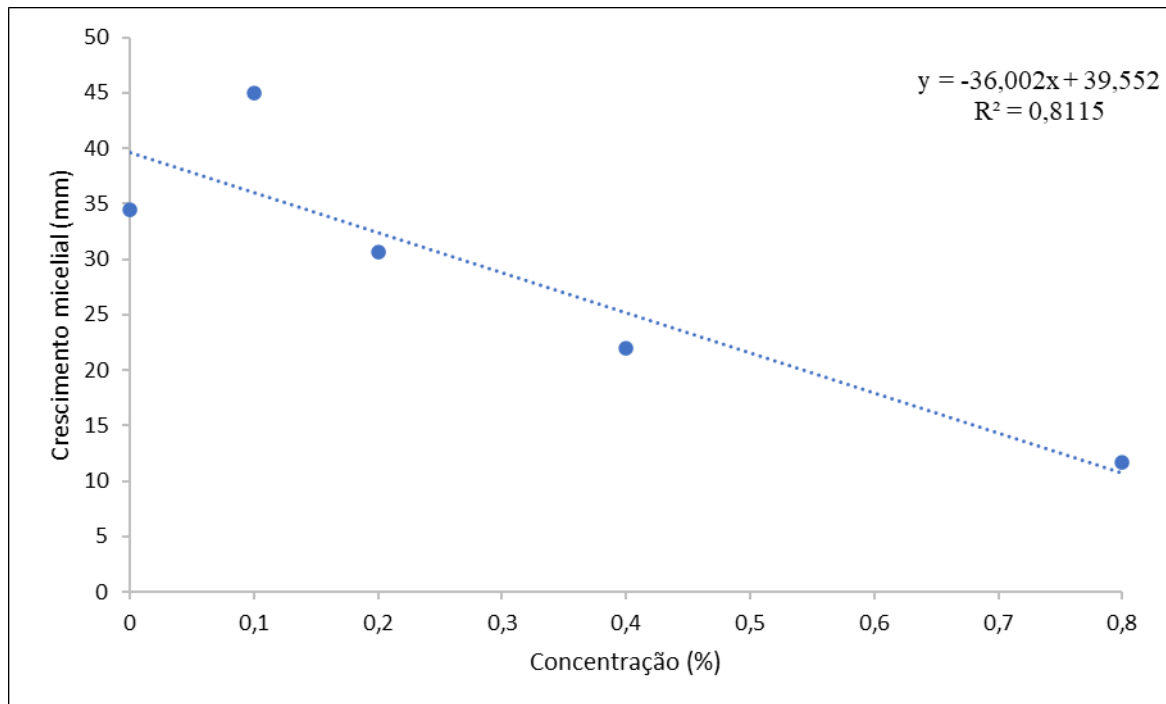


Figura 1. Crescimento micelial de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Quando se observa o crescimento micelial cumulativo (diferentes períodos de tempo) de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum basilicum* e fungicida (testemunha positiva), verifica-se que a concentração de 0,8% do óleo essencial foi tão eficaz quanto o fungicida na inibição do crescimento micelial de ambos os patógenos, exceção para os dois últimos dias de avaliação para o *Aspergillus* sp., em que a testemunha positiva foi mais eficaz do que o óleo essencial (Figura 2). Esse resultado demonstra o potencial fungicida do óleo essencial de *Ocimum basilicum* no controle de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. No geral, a redução do crescimento micelial de ambos os patógenos foi maior conforme o aumento da concentração do óleo essencial.

As plantas medicinais possuem a capacidade de sintetizar substâncias protetoras principalmente através do metabolismo secundário e, dentre estes compostos, os óleos essenciais podem ser usados como antifúngicos, inseticidas e antibactericidas (PORTELLA et al., 2021; PEREIRA et al., 2018). Estes compostos possuem a vantagem de serem biodegradáveis e geralmente menos prejudiciais do que os produtos químicos sintéticos, devido à sua origem natural, o que os torna mais seguro para o meio ambiente (MOURA; BONOME; FRANZENER; 2019).

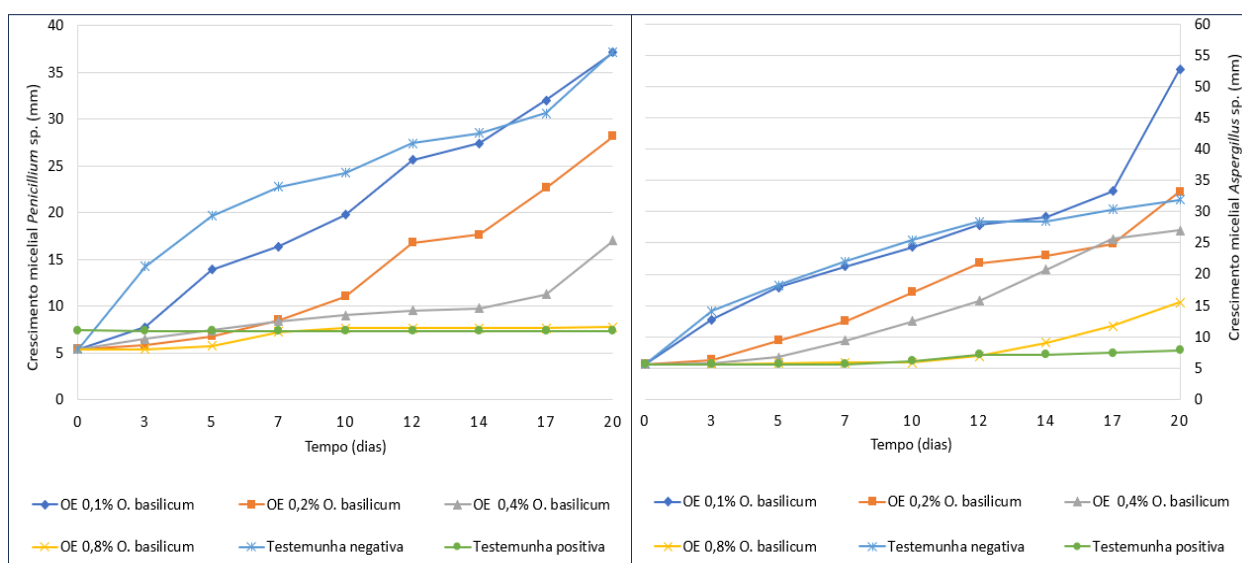


Figura 2. Crescimento micelial cumulativo de *Penicillium* sp. (A) e *Aspergillus* sp. (B) em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Ocimum basilicum* e ao fungicida MAXIM ADVANCED®.

Em relação aos patógenos, o óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi mais eficaz contra *Penicillium* sp., resultando em menor crescimento micelial quando comparado ao *Aspergillus* sp. (Tabela 1). Segundo Lima et al., (2006) os fungos podem apresentar sensibilidade diferenciada em relação a um determinado óleo essencial.

Tabela 1. Crescimento micelial de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. expostos ao óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Tratamento	Crescimento micelial (mm)
<i>Penicillium</i> sp.	25,43 B
<i>Aspergillus</i> sp.	32,07 A

Letras maiúsculas compara patógenos.

Para a germinação de esporos, verificou-se efeito significativo do óleo essencial de *Ocimum basilicum* apenas para o fator concentração (Figura 3).

A germinação de esporos apresentou um comportamento semelhante ao observado para crescimento micelial, em que a redução da germinação de esporos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial. Na concentração de 0,8% o óleo essencial de *Ocimum basilicum* promoveu uma redução de 85% na germinação de esporos quando comparado com a

testemunha. Este resultado tem grande relevância, pois a germinação de esporos representa o início do ciclo de vida de um fungo, o controle dessa variável pode interromper significativamente a propagação desses patógenos.

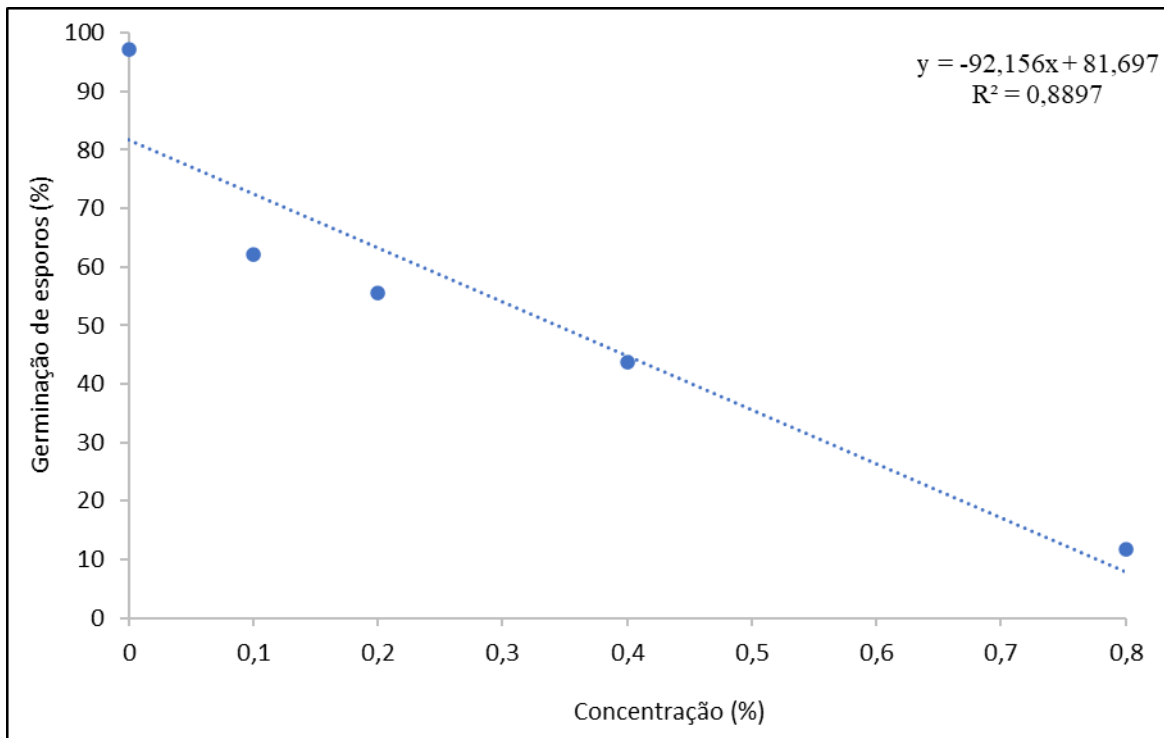


Figura 3. Germinação de esporos em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Para a variável tamanho de hifas foi verificado efeito significativo na interação concentração x patógeno (Figura 4).

O óleo essencial de *Ocimum basilicum*, teve um efeito positivo na redução do tamanho de hifas de ambos os fungos, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., sendo o menor crescimento observado nas maiores concentrações do óleo essencial (Figura 4.). Em todas as concentrações de óleo essencial o fungo *Aspergillus* sp. mais sensível do que *Penicillium* sp.. Segundo Zani et al., (1991), diversos óleos essenciais podem causar alterações mutagênicas nos fungos responsáveis pela redução do tamanho de hifas, interferindo diretamente na capacidade de proliferação dos patógenos.

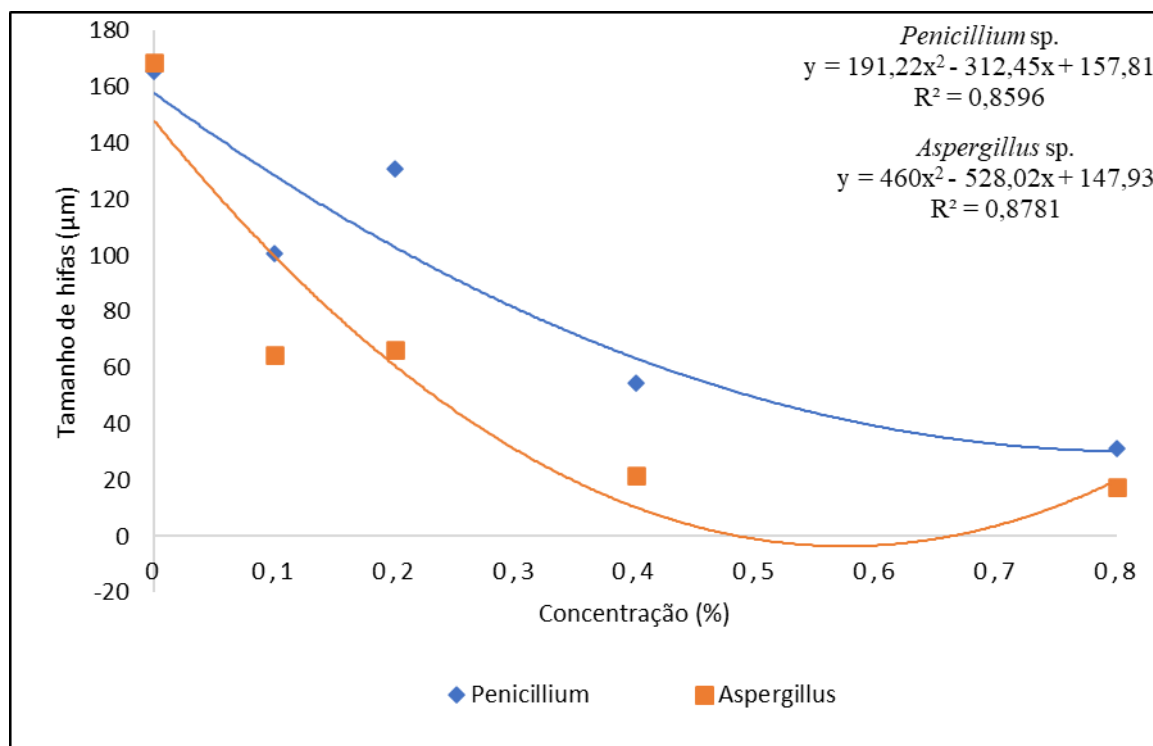


Figura 4. Tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Para o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* foram verificados efeitos significativos no crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas para a interação patógeno x concentração.

Para o crescimento micelial, não houve o ajuste de nenhuma curva para a análise dos dados, então estes foram analisados pelo teste de média de Tukey (Tabela 2).

Observa-se que para o crescimento micelial de *Penicillium* sp. o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* não apresentou um comportamento padrão, com oscilação no crescimento micelial entre as concentrações de óleo essencial testadas, o que dificultou a análise dos dados, tornando-as inconclusivas. Por outro lado, para o fungo *Aspergillus* sp. nota-se que o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* não foi eficaz para inibir o seu crescimento micelial, independentemente da concentração utilizada (Tabela 2). Esses resultados demonstram que o óleo essencial de *Ocimum basilicum* é mais eficiente do que o de *Cymbopogon winterianus* no controle de fungos de armazenamento. O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* tem uma melhor eficácia em tratamentos que visam a repelência de insetos, conforme estabelecido no trabalho de Fireck, (2023).

Tabela 2. Crescimento micelial de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*

CRESCIMENTO MICELIAL (mm)					
Tratamento	Concentração %				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<i>Penicillium</i> sp.	31,875 Ab	71,5 Aa	34 Ab	64 Aa	46,65 Ab
<i>Aspergillus</i> sp.	37,165 Aa	33,65 Ba	41,325 Aa	41 Ba	40,825 Aa

Letras maiúsculas compara patógenos.

Letras minúsculas compara concentrações.

Quando se observa o crescimento micelial cumulativo (diferentes períodos de tempo) de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* e ao fungicida (testemunha positiva), verifica-se para o *Penicillium* sp. que apenas as concentrações de 0,4% e 0,8% foram eficientes para reduzir o crescimento micelial do fungo em comparação com a testemunha negativa. Contudo, a concentração de 0,4% perdeu eficácia a partir do 8º dia e a de 0,8% a partir do 18º dia após a aplicação (Figura 5). Segundo Moraes (2009); Menezes, (2005), os óleos essenciais tem por característica uma rápida degradação pela luz solar, umidade, chuva e enzimas desintoxicantes, ou seja, uma baixa persistência. Devendo ser aplicado em menores intervalos de tempo.

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* na concentração de 0,8% foi tão eficaz quanto ao fungicida (testemunha positiva) na inibição do crescimento micelial de *Penicillium* sp. nos primeiros 10 dias de avaliação, demonstrando o seu potencial antimicrobiano.

Embora o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, nas maiores concentrações, tenha sido eficaz no controle do crescimento micelial de *Penicillium* sp., este foi pouco eficiente para o controle de *Aspergillus* sp., demonstrando uma menor sensibilidade deste último patógeno ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

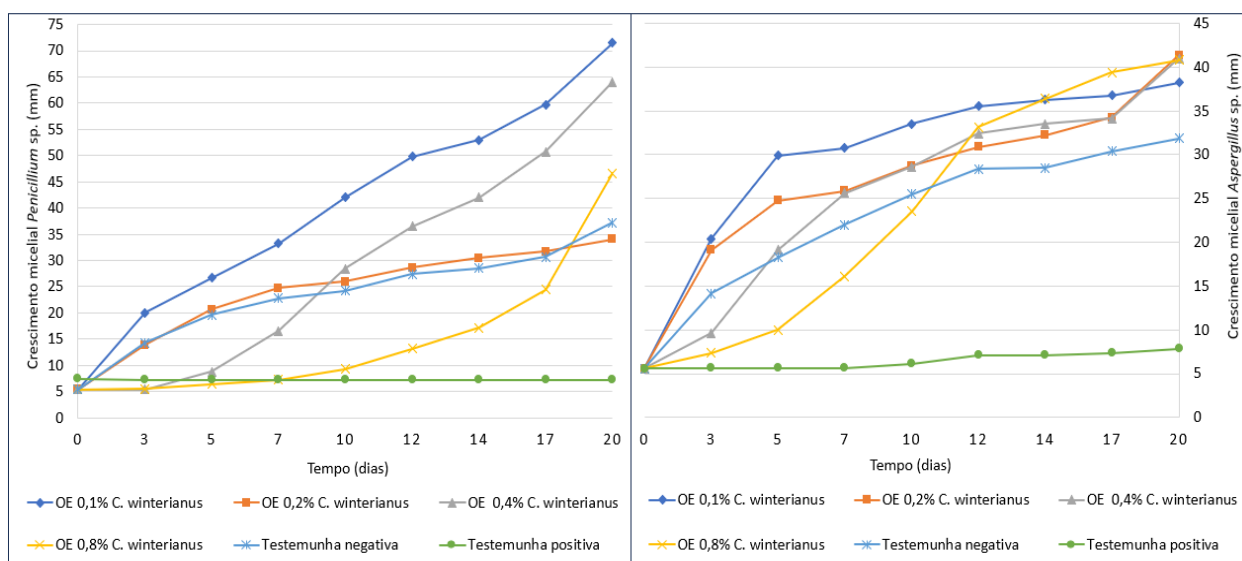


Figura 5. Crescimento micelial cumulativo de *Penicillium* sp. (A) e *Aspergillus* sp. (B) em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Ocimum basilicum* e ao fungicida MAXIM ADVANCED®.

A porcentagem de germinação de esporos e o tamanho de hifas de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. foram reduzidos conforme ocorreu o aumento da concentração do óleo de *Cymbopogon winterianus* (Figuras 6 e 7, respectivamente).

A inibição da germinação de esporos foi de 75% e 47,5% para *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente, em comparação a testemunha. Estes resultados demonstram que o gênero *Penicillium* é mais sensível ao óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* do que o gênero *Aspergillus* para a germinação de esporos (Figura 6). Por outro lado, para o tamanho de hifas o gênero *Aspergillus* se mostrou mais sensível do que o *Penicillium* (Figura 7).

A eficácia dos compostos presentes nos óleos sobre os fungos pode ser atribuída à sua natureza lipofílica. A hidrofobicidade do óleo essencial facilita sua ligação com as lipoproteínas na membrana citoplasmática das hifas, perturbando sua permeabilidade e provocando mudanças na estrutura do fungo (COSTA et al., 2011; BAKKALI et al., 2008). Essas mudanças podem levar ao extravasamento do citoplasma, à desidratação e a redução das hifas, impactando negativamente em seu desenvolvimento e, consequentemente, em sua capacidade de causar infecções (SANTOS et al., 2013).

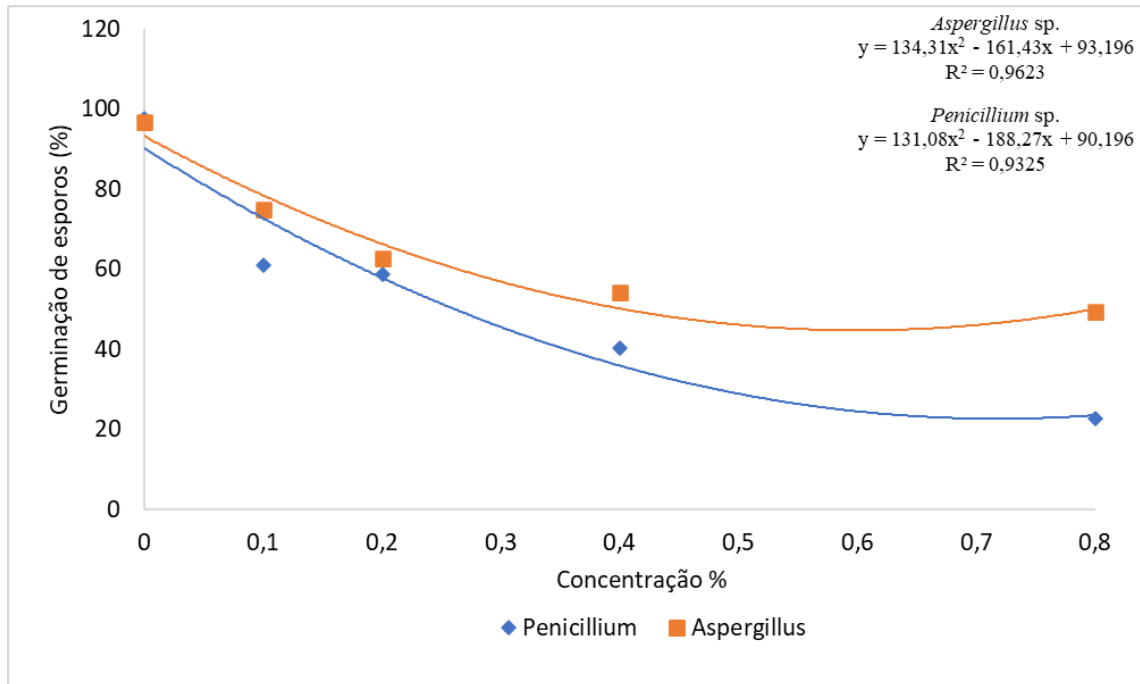


Figura 6. Germinação de esporos de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

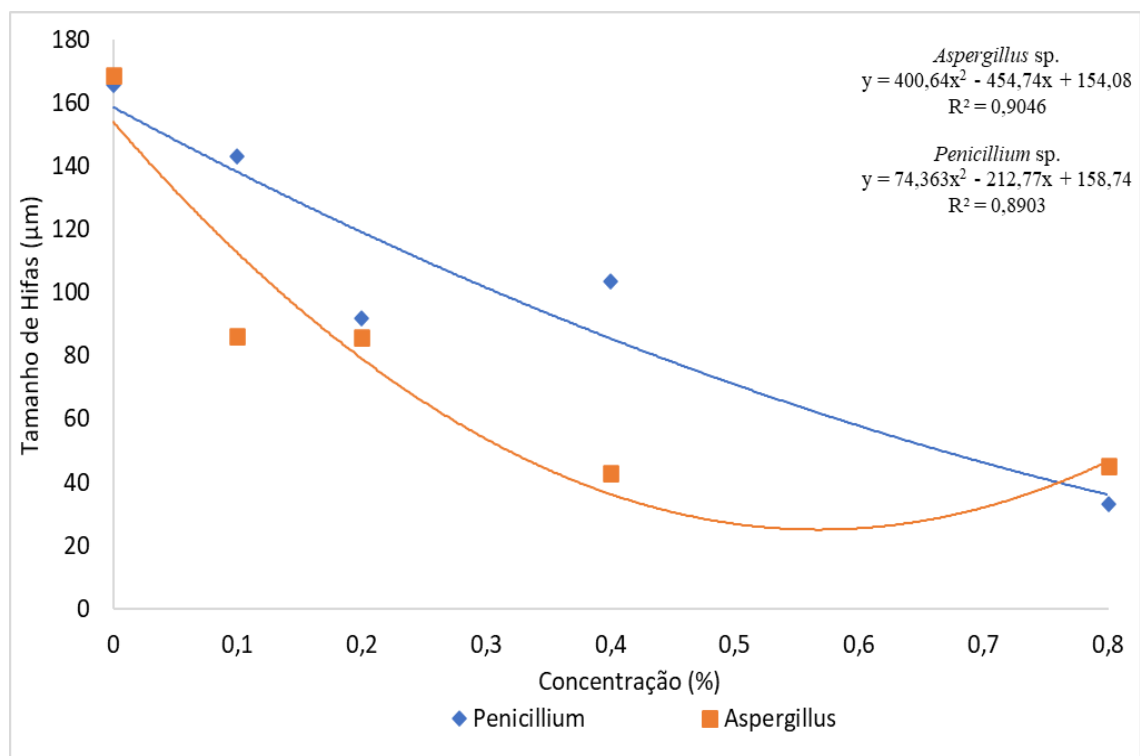


Figura 7. Tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*.

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi eficaz na redução do crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. *in vitro*, demonstrando potencial antifúngico.

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* foi eficaz na redução da germinação de esporos e tamanho de hifas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. *in vitro*, apresentando resposta inconclusiva para a variável crescimento micelial.

Para ambos os óleos essenciais avaliados, a medida em que se elevou a concentração aumentou a toxicidade aos patógenos.

REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008 Feb;46(2):446-75. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106. Epub 2007 Sep 29. PMID: 17996351.
- BLANK, A.F., SILVA, P.A., ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; BARRETO, M.C.V. Influence of the organic and mineral fertilization on cultivation of sweet basil cv. Genovese. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.2, p.175-180, 2005.
- BONOME, L.T.S., BITTENCOURT, H.V.H., MOURA, G.S., FRANZENER, G., DE CARVALHO, J.H. (2020) Natural Products for Alternative Seed Treatment. In: TIWARI A.K. (eds) **Advances in Seed Production and Management**. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4198-8_18
- CHAGAS, L.F.B., CASTRO, H.G., CHAGAS, JÚNIOR A.F., OLIVEIRA, H.K.M. Efeito do óleo essencial do manjerição e capim citronela na inibição de fungos fitopatogênicos da cultura do tomate. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n.12, p. 120758-120771, 2021.
- COSTA, A.R.T., AMARAL, M.F.Z.J., MARTINS, P.M., PAULA, J.A.M., FIUZA, T.S., RESVENZOL, 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 Medicinais*. v.13, n.2, p. 240-245, 2011.
- DALLA PRIA, M., SILVA, O.C. *Anthracnose*. In: **DALLA PRIA, M., SILVA, O.C. Bean culture: diseases and control**. 2. ed. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. p.49-56.
- FIRECK, F. Fumigação de óleo essencial de *Citrus latifolia* e *Cymbopogon winterianus* no controle e repelência de *Sitophilus zeamais*. p. 1- 19, 2023
- FREIRE, J. Conheça os três maiores produtores de grão do mundo. Compre rural: portal de conteúdo rural. 2023. Disponível em: <https://www.comprerural.com/conheca-os-tres-maiores-produtores-de-graos-do-mundo/>
- GHINI, R., KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas.1. ed. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000. 78p.

KRISCH, J., TSERENNADMID, R., VAGVÖLGYI, C. Essential oils against yeasts and moulds spoilage. In: Mendez-Vilas, A. (ed.), Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Formatex Research Center. 2, 1135–1142, 2011.

LIMA, I. O., OLIVEIRA, R. A. G., LIMA, E. O., FARIAS, N. M. P., SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognósia**. v. 16, n. 2, 2006.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: Seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa agrobiologia, 2005. 58p.

MENTEN, J.O.M. Loss caused by pathogens associated with seeds. In: MENTEN, J.O.M. Seed pathogens: detection, damage and chemical control. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1995. p.115-136.

MINAMI, P. S. (2003). Micologia: Métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses, Copyright, **Editora Manole Brasil**, pp. 47-50.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.

MURRAY, P. R., ROSSENTHAL, K. S. E PFALLER, M. A. (2006). Microbiologia: Médica, 5ª edição, **Elsevier Editora Ltda**, pp. 770-773.

MOURA, G. S., BONOME, L. T. S., FRANZENER, G. Bioatividade de óleos essenciais de espécies de hortelãs na sanidade e fisiologia de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 14, n. 3, p. 366-373, 2019.

PEREIRA, M. N., CONCEIÇÃO, R. B., CRUZ, J. C. S., ANDRADE, M. C. N. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. **Ambiência**. v. 14, n. 3, p.513-521, 2018.

PINTO, N. F. J. A. Controle de patógenos em grãos de milho armazenados. **Summa Phytopathologica**, v.22, n. 1. p.77-78, 1996

PITT, J.I. (1985). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Common wealth scientific and industrial research organization division of food research. Australia. 6pp.

PORTELLA, J., ORLANDI, R. C., ALMEIDA, J., KOEFENDER, J., SCHOFFEL, A., CAMERA, J. N. Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Thema**, v. 19, n. 3, p. 615-622, 2021.

SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J. C., & ANDERSEN, B. *Food and Indoor Fungi*. Utrecht, 2010. NL: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

SANTOS, G. R. D., BRUM, R. B. C. S., CASTRO, H. G. D., GONÇALVES, C. G., FIDELIS, R. R. Effect of essential oils of medicinal plants on leaf blotch in Tanzania grass. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 587–593, set. 2013.

SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Ed.). A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 257-302.

SCHERER, R., WAGNER, R., DUARTE, M.C.T., GODOY, H.T. Composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILVA, A. F. C. P. Pirataria de sementes e mudas. Anuário 2013 da Associação Brasileira de Sementes e Mudas. 120p. 2013.

SILVA, J.F., MELO, B.A., PESSOA, E.B., FIGUEIREDO NETO, A., LEITE, D.T. Plant extracts for the control the bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boheman 1833) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.8, n.3, p.01-05, 2013.

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*, 64, 27–37, 2014.

VALENTINI, R.P., BONOME, L.T.S., MOURA, G.S., SIQUEIRA, D.J., TOMAZI, Y., FRANZENER, G., BITTENCOURT, H.V.H. Essential oils of *Tahiti lemon* and *Cinnamon bark* in control of storage fungi and physiological and sanitary quality of beans. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. 1-9, e0172019, 2019.

VANZOLINI, S., TORRES, R.M., PANIZZI, R.C. **Efeitos do tamanho, densidade e tratamento fungicida na qualidade de sementes de amendoim**. *Revista Ceres*, v.47, n.274, p.603-612, 2000.

ZANI, F., MASSIMO, G., BENVENUTI, S., BIANCHI, A., ALBASINI, A., MELEGARI, M., VAMPA, G., BELLOTTI, A. & MASSA, P. 1991. Studies on the genotoxic properties of essential

oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Sulmonella microsome* reversion assay. *Planta Med.* 57:237-41.