



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS

**EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CULTURA DO MILHO (*Zea  
mays*) CONTRA A HELMINTOSPORIOSE (*Bipolaris maydis*)**

PATRÍCIA TÂMARA RODRIGUES SANTANA

FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS

**EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CULTURA DO MILHO (*Zea  
mays*) CONTRA A HELMINTOSPORIOSE (*Bipolaris maydis*)**

Mestranda: Patrícia Tâmara Rodrigues  
Santana

Orientador: Prof. Robson Marcelo Di Piero

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.

FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA

2022

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

Santana, Patrícia  
EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CULTURA DO MILHO (Zea  
mays) CONTRA A HELMINTOSPORIOSE (Bipolaris maydis) /  
Patrícia Santana ; orientador, Robson Marcelo Di Piero,  
2022.  
55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fitopatógeno. 3.  
Controle alternativo. 4. Doença foliar. 5. Óleos essenciais.  
I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

Patrícia Tâmara Rodrigues Santana

**EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CULTURA DO MILHO (*Zea mays*)  
CONTRA A HELMINTOSPORIOSE (*Bipolaris maydis*)**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de agosto de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.Dr. José Renato Stangarlin

Instituição Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.(a) Dr.(a) Danila Souza Oliveira Coqueiro

Instituição Universidade Federal da Bahia

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis, 2022.

Ao meu Deus, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer Àquele que é a razão da minha vida, Autor da minha história, que está comigo em todo tempo, que me inspirou o desejo de iniciar essa jornada e me deu todas as ferramentas necessárias para conseguir concluir mais essa etapa importante na minha vida. Ao meu Deus seja toda a glória.

Ao meu esposo amado, parceiro, companheiro e melhor amigo que, com seu amor, paciência e generosidade desde o início me incentivou e esteve ao meu lado, nos melhores e nos momentos mais desafiadores. Essa vitória também é dele. Gratidão ao meu filho que veio ressignificando toda a minha trajetória, meu trabalho acadêmico ganhou um novo sentido após seu nascimento e, concluir essa etapa com meu filho em meus braços torna esse momento uma conquista muito maior do que um dia sonhei.

Aos meus familiares e sogros, que se fizeram presente de alguma forma, me dando suporte e incentivo para prosseguir, especialmente minha mãe e minha sogra que foram verdadeiras aliadas, minha rede de apoio que fez toda a diferença, me dando suporte necessário para concluir.

A todos os meus colegas da UFSC e aqueles que se tornaram bons amigos, gratidão por toda troca de conhecimentos, pela parceria em tantos momentos, pelos momentos de descontração e por terem me surpreendido quando mais precisei, durante e após minha gestação.

Ao professor Robson Marcelo Di Piero, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos e conselhos, por ter me concedido todo o suporte desde o início para que eu chegasse até aqui.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências por toda assistência concedida com tanto respeito e dedicação.

Por fim, agradeço à UFSC pelo ensino de qualidade, por ter me proporcionado um ambiente favorável ao desenvolvimento das minhas pesquisas e por todos os professores, os quais tive o privilégio de conhecer e adquirir deles conhecimento, enriquecendo ainda mais minha bagagem técnica e científica.

## RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays*) tem ocupado lugar de destaque no cenário global, tendo em vista ser o cereal de maior volume de produção no mundo, além do seu grande valor econômico e relevância social. Entre as problemáticas envolvidas na produção de milho, podemos destacar as manchas foliares como a helmintosporiose, sendo recorrente em escala mundial e tendo como um dos agentes causais o fungo *Bipolaris maydis*, que infecta, inicialmente, as folhas inferiores, principalmente antes do estágio de floração e pode gerar perdas nas lavouras que compreendem 50% da produção. No que tange às formas de controle da doença, podemos listar a resistência genética, a rotação de culturas, diversificação de cultivares, uso de sementes de boa qualidade, além do uso de fungicidas. Na busca por medidas alternativas de controle que sejam de baixo impacto em relação ao meio ambiente, o presente trabalho teve como objetivo estudar o uso de emulsões por meio da utilização de óleos essenciais avaliando seu potencial no controle da helmintosporiose no milho. Para isso foram realizados testes *in vitro*, com doze óleos essenciais, dos quais os óleos de canela, cravo, tea tree e tomilho obtiveram destaque, inibindo o crescimento micelial de *B. maydis* em 92%, 93%, 94% e 90%, respectivamente. Desta feita, foram preparadas emulsões de tais óleos na concentração de 0,01% e então pulverizadas em plantas de milho no estágio V4, nas cultivares FORTUNA e P1630H sendo a testemunha tratada somente com água destilada. Após 3 dias, as plantas foram inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL), e mantidas em câmara úmida por 48 horas. A avaliação da doença foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI), utilizando uma escala diagramática adaptada, sendo a redução de severidade de *B. maydis* mais expressiva em plantas de milho da cultivar FORTUNA, submetidas ao tratamento de óleo de canela (60%) e cravo (58%). Também foi realizado ensaio de germinação de conídios, com auxílio de microscópio óptico, analisando discos foliares de milho da cultivar FORTUNA coletados de plantas tratadas com emulsões de cravo ou canela, na concentração de 0,01%, e inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL). Neste ensaio, foi possível observar efeito estimulante dos óleos de cravo e canela na germinação de conídios. Nos ensaios conduzidos para a determinação da atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (FAL) na cultivar FORTUNA, não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas tratadas com óleos e a testemunha. Dessa forma, foi possível concluir que as emulsões de óleos essenciais de cravo e canela apresentam potencial antifúngico direto no confronto com *B. maydis* em plantas de milho, havendo necessidade de novos estudos para se desvendar outros modos de ação desses óleos.

**Palavras-chave:** Fitopatógeno. Controle alternativo. Doença foliar.

## ABSTRACT

The corn crop (*Zea mays*) has occupied a prominent place in the global scenario, in view of being the cereal with the highest volume of production in the world, in addition to its great economic value and social relevance. Among the problems involved in corn production, we can highlight leaf spots such as helminthosporiosis, which is recurrent worldwide and has the fungus *Bipolaris maydis* as its causal agent, which initially infects the lower leaves, mainly before the flowering stage and can generate losses in crops that comprise 50% of production. Regarding the ways of controlling the disease, we can list genetic resistance, crop rotation, diversification of cultivars, use of good quality seeds, in addition to the continuous use of fungicides. In the search for alternative control measures that are of low impact in relation to the environment, the present work aimed to study the use of emulsions through the use of essential oils, evaluating their potential in the control of helminthosporiosis in corn. For this, *in vitro* tests were carried out with twelve essential oils, of which cinnamon, clove, tea tree and thyme oils stood out, inhibiting mycelial growth by 92%, 93%, 94% and 90%, respectively. This time, emulsions of such oils were prepared at a concentration of 0.01% and then sprayed on maize plants at the V4 stage, on the FORTUNA and P1630H cultivars, the control being treated only with distilled water. After 3 days, the plants were inoculated with *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conidia/mL), and kept in a humid chamber for 48 hours. Disease assessment was performed at 5 and 10 days after inoculation (DAI), using an adapted diagrammatic scale, the severity reduction of *B. maydis* being more expressive in corn plants of the cultivar FORTUNA, submitted to the treatment of cinnamon oil (60%) and clove (58%). Conidia germination assay was also carried out, with the aid of an optical microscope, analyzing leaf discs of corn cultivar FORTUNA collected from plants treated with clove or cinnamon emulsions, at a concentration of 0.01%, and inoculated with *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conidia/mL). In this assay, it was possible to observe the stimulating effect of clove and cinnamon oils on conidia germination. In assays carried out to determine the activity of the enzyme phenylalanine-ammonia-lyase (FAL) in the cultivar FORTUNA, no significant differences were found between the plants treated with oils and the control. Thus, it was possible to conclude that clove and cinnamon essential oil emulsions have direct antifungal potential against *B. maydis* in corn plants, requiring further studies to discover other modes of action of these oils.

**Keywords:** Phytopathogen. Alternative control. Leaf disease.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Escala diagramática para determinação da severidade da helmintosporiose (*B. maydis*) em milho.....40
- Figura 2. Efeito de inibição do crescimento micelial de *B. maydis* frente aos óleos essenciais de canela (CA), gengibre (GE), palmarosa (PA), tea tree (TE), tomilho (TO), eucalipto (E), alecrim (ALE), citronella (CIT), cravo (CRA), laranja (LAR), lemongrass (LEM) e hortelã pimento (HOR), a 0,2% por volatilização, em diferentes tempos de avaliação. Médias seguidas por letras distintas, em um mesmo tempo de avaliação, diferem significativamente entre si (Teste de Tukey.  $P < 0,05$ )..... 43
- Figura 3. Severidade de *B. maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água, óleos essenciais de cravo, tomilho, canela e tea tree a 0,01%, 3 dias antes da inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios /mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).....44
- Figura 4. Severidade de *B. maydis* em plantas de milho da cultivar FORTUNA pulverizadas com água ou óleos essenciais de cravo, tomilho, canela e tea tree a 0,01%, 3 dias antes da inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios / mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). Médias seguidas por letras distintas, em um mesmo tempo de avaliação, diferem significativamente entre si (Teste de Tukey.  $P < 0,05$ ).....45
- Figura 5. Porcentagem (%) dos conídios de *Bipolaris maydis* que germinaram em relação ao total (barra azul), % de formação de apressórios em relação aos conídios germinados (barra laranja) e % de formação de apressórios em relação ao total de conídios contados sobre folhas de milho. Análises realizadas 96 horas após a inoculação. durante o teste. Não houve diferença estatística entre os tratamentos.....46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade de Fenilalanina ammonia-liases em folhas de milho tratadas com óleos essenciais e inoculadas com <i>B. maydis</i> ( $1 \times 10^4$ conídios/mL). Não houve diferença estatística entre os tratamentos. ....	47
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BDA – Batata dextrose ágar

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

DAI – Dias após a inoculação

DAR – Dias após a repicagem

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAL – Fenilalanina amônia-liase

HCl – Ácido clorídrico

MANE – Micoteca Anne Lore Schroeder

OE – Óleo essencial

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA .....	15
4.1.1 A Cultura do milho.....	16
4.1.2 Fungo <i>Bipolaris maydis</i> e a Helmintosporiose no milho .....	17
4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	18
4.2.1 Óleos essenciais .....	18
4.2.2 Utilização de óleos essenciais no controle de fitopatógenos.....	20
4.2.3 Microemulsões .....	22
4.2.4 Indução de resistência e mecanismos de defesa .....	24
REFERÊNCIAS.....	27
<b>5. CAPÍTULO 1 – EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA HELMINTOSPORIOSE NO MILHO.....</b>	<b>35</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	35
5.2 METODOLOGIA .....	37
5.2.1 Condições de cultivo .....	37
5.2.2 Isolamento, identificação e produção de inóculo .....	38
5.2.3 Óleos e emulsões .....	38
5.2.4 Screening de óleos essenciais.....	39
5.2.4.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	39
5.2.5 Proteção de planta utilizando emulsões de OE.....	39
5.2.6 Análises microscópicas.....	40
5.2.6.1 Avaliação da germinação de conídios.....	40
5.2.7 Análises bioquímicas.....	41
5.2.7.1 Determinação da atividade de fenilalanina-amônia-liases.....	41
5.2.7.2 Determinação de proteína total .....	42
5.2.8 Análises estatísticas .....	42

5.3. RESULTADOS .....	42
5.3.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais pelo método de volatilização <i>in vitro</i> com discos de papel filtro .....	42
5.3.2 Proteção da planta utilizando emulsões de OE.....	43
5.3.3 Teste de germinação de conídios.....	45
5.3.4 Atividade enzimática.....	46
5.4 DISCUSSÃO .....	47
6. CONCLUSÃO .....	53
REFERÊNCIAS.....	54

## 1. APRESENTAÇÃO

O milho é o cereal de maior volume de produção no mundo. Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os maiores produtores, representando 70% da produção mundial. Devido ao grande valor econômico e importância social que ela possui, a cultura do milho tem ocupado lugar de destaque no cenário global (BORIN, 2017).

A cultura do milho (*Zea mays*) tem grande importância econômica e social. Econômica, pelo valor nutricional de seus grãos e por seu uso intenso, nas alimentações humana e animal e como matéria-prima para a indústria. Social, por ser um alimento de baixo custo, pela viabilidade de cultivo tanto em grande quanto em pequena escala e por ser a base de várias cadeias agroindustriais, como a da carne.

Entre os principais problemas para a produção de milho, podemos destacar as manchas foliares como a helmintosporiose, uma doença recorrente em escala mundial. Um dos agentes causais, *Bipolaris maydis*, infecta inicialmente, as folhas inferiores, principalmente antes do estágio de floração e pode gerar perdas nas lavouras que compreendem 50% da produção. Dentre as formas de controle da doença, podemos listar a resistência genética, como componente de um conjunto de medidas que compõem o sistema de manejo integrado de doenças, que inclui, entre outras, as seguintes alternativas: a rotação de culturas, diversificação de cultivares, uso de sementes de boa qualidade, o uso de cultivar ou cultivares que além de resistentes a doenças sejam também as mais indicadas para a região, o plantio na época adequada, o uso de população de plantas e adubação adequadas. Além disso, vale ressaltar o uso de fungicidas aplicados no manejo de doenças foliares do milho, contra, por exemplo, *Exserohilum turcicum*, outro agente causal da helmintosporiose. A utilização de produtos comerciais tais como os pertencentes ao grupo químico dos triazóis e das estrobilurinas, além de resultar na seleção de isolados resistentes, podem gerar consequências ainda mais graves em diversos setores (DA COSTA et al, 2011).

Em meio à expansão da economia agroexportadora nacional, os agrotóxicos têm trazido, desde a década de 1950, muitas repercussões ambientais e à saúde. Isso é devido à sua principal característica: a toxicidade. Efeito este que não se restringe ao alvo a ser exterminado. Na verdade, sua nocividade atinge a todo o meio ambiente, causando contaminação do solo, da água, do ar, dos seres vivos e, além das próprias culturas pulverizadas. Aos seres humanos, acarreta inúmeros danos, como alteração dos genes, do embrião/feto em formação, dos sistemas: endócrino, reprodutivo, neurológico, imunológico, entre outros. No último posicionamento do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes

da Silva (INCA, 2015) comentou-se que as intoxicações agudas por agrotóxicos são as mais comuns e ocorrem principalmente no ambiente laboral, afetando os trabalhadores rurais. Já o último Relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) concluiu que os agroquímicos respondem por duzentas mil mortes anuais por intoxicação aguda e que, aproximadamente 90% das mortes ocorreram em nações em desenvolvimento (ONU BRASIL, 2017), constituindo-se um grave problema de saúde pública nacional e mundial (DUTRA E SOUZA, 2017).

Assim, devido à ausência de registros de fungicidas visando o controle de *B. maydis*, além da problemática que estes podem causar ao meio ambiente quando utilizados para o manejo de outras doenças, a aplicação de emulsificações por meio da utilização de bioativos naturais, como por exemplo, os óleos essenciais pode ser promissora para a agricultura. Os óleos essenciais são metabólitos secundários obtidos de diversas partes da planta, eles contêm compostos voláteis que podem estar associados aos efeitos biológicos (VIUDA-MARTOS et al., 2007).

Diversas são as atividades biológicas dos óleos essenciais (OEs) envolvidos no presente estudo, dentre as quais se destacam o efeito fungitóxico, antioxidante e antimicrobiano dos OEs de canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Syzigium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon nardus Rendle*), gengibre (*Zingiber officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), lemongrass ou capim limão (*Cymbopogon schoenanthus*), tea tree, laranja (*Citrus sinensis*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (VIUDA-MARTOS et al., 2007). Além de tais atividades, foram observadas a ação antitumoral e antiviral dos óleos de gengibre e laranja; ação antibacteriana e anti-inflamatória dos óleos de alecrim e tea tree (*Melaleuca alternifolia*); repelente em palmarosa (*Cymbopogon martini*) e expectorante no tomilho (*Thymus vulgaris*) (HOYOS et al., 2012). Por fim, vale ressaltar a ação indutora de resistência, atuando no combate a microrganismos fitopatogênicos observada no óleo de tea tree (MENDONÇA et al., 2005).

Apesar de ser potencial controlador de doenças vegetais, a utilização de óleos essenciais apresenta limitação no que tange à solubilidade em água. E, para que a atividade biológica dos óleos essenciais seja mantida e, dessa forma, suas moléculas possam chegar ao destino final sem perder sua integridade, surge neste cenário, a microemulsificação de óleos essenciais. Essa técnica representa uma alternativa viável à utilização dos óleos, uma vez que, viabiliza o preparo de determinadas soluções e suspensões, por meio da formação de sistemas transparentes ou translúcidos formados por gotículas de até 500 nm. O desenvolvimento de microemulsões tem por vantagem a redução da degradação do ingrediente ativo, o

impedimento da floculação dos mesmos, a manutenção do sistema disperso sem separação. Além da formação da grande área superficial e a deposição uniforme da microemulsão sobre superfícies, permitindo uma penetração rápida dos ativos presentes (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Trata-se de compostos que têm atraído grande interesse nos últimos anos por diversos fatores, dentre eles, o baixo custo relativo, baixa toxicidade ambiental e ao ser humano, possibilitando a utilização em diversos sistemas. E neste sentido, são considerados como potenciais elicitores, induzindo respostas de defesa em vegetais contra fitopatógenos até mesmo em baixas concentrações (PINHO et al., 2014).

Dessa forma, por meio deste estudo, objetiva-se avaliar o efeito das microemulsões de óleos essenciais para o controle da mancha foliar no milho causada por *Bipolaris maydis*.

## **2. HIPÓTESE**

As emulsões de óleo essencial são capazes de controlar a helmintosporiose no milho.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o efeito das emulsões de óleo essencial para o controle da helmintosporiose no milho.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar o efeito dos óleos essenciais sobre o fitopatógeno *Bipolaris maydis* por meio de screening *in vitro*;
- Selecionar os óleos essenciais que apresentarem maior atividade antifúngica frente ao *B. maydis*;
- Desenvolver emulsões de óleos essenciais selecionados;
- Analisar a atividade de enzimas envolvidas na defesa vegetal em plantas tratadas com as emulsões e inoculadas com *B. maydis*.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA**



#### 4.1.1 A Cultura do milho

O milho é o cereal de maior volume de produção no mundo. Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os maiores produtores, representando 70% da produção mundial. Devido ao grande valor econômico e importância social que ela possui, a cultura do milho tem ocupado lugar de destaque no cenário global (BORIN, 2017).

Diversos são os fatores que influenciam a produtividade do milho, dentre eles estão elencados: manejo da lavoura, potencial genético do material escolhido, condições ambientais e outros. A cultura do milho é uma das mais cultivadas no mundo, sendo o Brasil ocupante do 3º lugar no ranking de produção, atrás apenas da China e Estados Unidos, exercendo influência positiva em diversos setores da economia nacional, uma vez que se trata de uma cultura de alta rentabilidade para o país, impactando positivamente também a economia informal, como é o caso do milho pipoca (FREITAS JÚNIOR et al., 2009).

Além disso, o milho tem sido o principal ingrediente em quantidade na composição de rações para suínos e aves, sendo 70 a 80% da produção nacional voltada para esta destinação (DUARTE et al., 2015). Ademais, seu uso se estende à matéria-prima para indústrias de papéis químicas, farmacêuticas, têxteis, entre outras (DUARTE et al., 2010).

Em base seca, o grão de milho é composto por 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de óleo, sendo portanto, uma composição predominante de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo), o milho é considerado um alimento energético para as dietas humana, especialmente às populações de baixa renda. (PAES, 2006). A espiga de milho mais antiga, a propósito, foi encontrada há 7000 anos, na região onde se localiza o México e, inclusive, os possíveis locais de origem do milho se encontram próximo às regiões do México e Guatemala (LERAYER, 2006).

Na safra 2021/2022, a colheita total do cereal está estimada em 115,6 milhões de toneladas, o que corresponde a um volume 32,8% superior ao ciclo passado. Apenas na 2ª safra da cultura o aumento chega a 45,6% da produção, chegando próximo a 88,4 milhões de toneladas. Caso seja confirmado este resultado, será a a maior produção de milho 2ª safra registrada em toda a série histórica. No entanto, é preciso ressaltar que, mesmo com estágio avançado da cultura, cerca de 19% das lavouras de 2ª safra de milho ainda se encontram sob influência do clima. A respeito das estimativas para o milho, com exceção do estoque final, os ajustes foram para cima, apresentando uma redução de 1,19% em relação ao levantamento anterior. No que tange à comparação com a safra 2020/2021, destaca-se o menor volume de

importação total, tal queda justifica-se pela maior disponibilidade do cereal no ciclo atual, o que, conseqüentemente, reduzirá de forma substancial as importações no segundo semestre em relação ao mesmo período de 2021 (CONAB, 2022).

Em relação à produtividade do milho no Brasil, na última safra, conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022), variou de 581 a 8,218 kg.ha<sup>-1</sup> a depender da região de produção, sendo a média no país de 5.391 Kg.ha<sup>-1</sup>. Sendo uma cultura cujo cultivo se dá em diferentes locais e épocas no Brasil, o milho apresenta alta suscetibilidade a diversos patógenos e, entre os problemas fitossanitários do milho, se destacam as doenças foliares (DUDIENAS et al., 2013, BRITO et al., 2007).

Sabe-se que há grande preocupação no que tange à ocorrência de doenças nas principais regiões produtoras do país, tendo em vista o alto percentual de perdas ao longo dos anos. A expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, ausência da rotação de culturas, utilização de genótipos suscetíveis, entre outros fatores que favorecem modificações importantes na dinâmica populacional de patógenos, resultam no aparecimento de novos problemas fitossanitários (EMBRAPA, 2009).

#### **4.1.2 Fungo *Bipolaris maydis* e a Helmintosporiose no milho**

Tendo em vista o alto potencial produtivo do milho, o seu rendimento no Brasil ainda é muito baixo (UEBEL, 2015). Dentre as possíveis causas desse baixo rendimento estão as doenças, que em condições favoráveis podem comprometer seriamente a produção de grãos. Assim, as principais doenças na cultura do milho são: as ferrugens (*Puccinia sorghi* e *P. polysora*), a cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*), a mancha-branca (*Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis*), a podridão-de-diplodia (*Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*), a antracnose (*Colletotrichum graminiicola*), a podridão de fusarium (*Fusarium verticillioides*), a giberela (*Gibberella zea*) e as helmintosporioses (*Exserohilum turcicum*) e (*Bipolaris maydis*) (EMBRAPA, 2013).

A helmintosporiose do milho pode ser, causada pelo fungo *Bipolaris maydis*, a qual ocorre principalmente na região Sul e Centro-Oeste, onde epidemias aparecem com mais frequência. O pico da doença ocorre nos meses de outubro a dezembro, ocasionando grandes prejuízos quando a planta é infectada, na época da floração. O fungo é capaz de infectar uma gama de hospedeiros dentre os quais estão o milho (*Zea mays*), o sorgo (*Sorghum bicolor*), *Brachiaria foliosa*, *Cymbopogon martini*, entre outras espécies já relatadas (MANAMGODA et al., 2014).

A colonização da planta pelo patógeno ocorre quando da penetração da hifa germinativa, e esse fenômeno se dá por meio de aberturas naturais ou lesões. Assim, de maneira intercelular, o fungo cresce, as hifas, por sua vez, se ramificam no mesófilo da planta viva, causando em aproximadamente 2 a 3 dias a morte celular vegetal (SARTORI et. al,2017).

Sabe-se que os conídios são disseminados a partir das próprias lesões, por meio do vento ou chuvas, sendo a sobrevivência do fungo possível sobre restos culturais. Além disso, a ocorrência da doença é policíclica, portanto, é possível a ocorrência de mais de um ciclo do fungo ao longo do ciclo de vida do hospedeiro (COTA et al., 2013).

Dessa forma, torna-se primordial a tomada de decisão para o controle de doenças na lavoura, que podem comprometer até 100% da sua produtividade. Medidas preventivas devem ser tomadas para evitar o desenvolvimento da helmintosporiose na cultura, como por exemplo, o uso de variedades resistentes ao ataque desses organismos, a rotação de cultura, adubação equilibrada, e o uso de agrotóxicos (FIGUEIREDO et al., 2010).

Todavia, tendo em vista os efeitos maléficos do uso de substâncias químicas na lavoura, como ferramenta alternativa, eficaz e economicamente viável à substituição dos agrotóxicos, tem-se o uso de cultivares resistentes. No entanto, existem outros meios de controle alternativo, dentre eles, estão o controle biológico e a indução de resistência (FERNANDES E OLIVEIRA, 2000; GUIOMAR, 2011).

## 4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

### 4.2.1 Óleos essenciais

O óleo essencial é definido pela Organização Internacional de Normatização (International Organization for Standardization – ISO) como sendo um produto que, a partir da material-prima vegetal é obtido por meio do processo de destilação com água ou à vapor, ou mesmo do epicarpo de frutas cítricas, sendo por meio de processo de destilação a seco ou mecânico.

A composição dos óleos essenciais engloba uma diversidade de compostos, dentre os quais se encontram os terpênicos (sesquiterpenos e monoterpenos) ou fenilpropanoides. Os ditos compostos terpênicos, que também são chamados de isoprenoides, têm sua classificação em hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, fenóis, ésteres, cetonas, óxidos, entre outros. Entre os derivados terpênicos se encontram o mentol, citronelol, eugenol e aldeído

cinâmico. Em relação aos fenilpropanóides, conhecidos também como ácidos cinâmicos, estes têm sua síntese a partir de plantas, derivados do ácido chiquímico, a partir dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, podendo conter mais de sessenta componentes químicos diferentes – em alta concentração ou apenas alguns traços (BAKKALI et al., 2008; KALEMBA; SYNOWIEC, 2019).

No geral, os óleos essenciais caracterizam-se por sua limpidez, com elevada lipofilicidade e volatilidade, especialmente à temperatura ambiente, são substâncias líquidas oleosas que se dissolvem bem em etanol, solventes orgânicos não polares e lipídios além de serem insolúveis na água. Com fragrância marcante, também são caracterizados por serem antimicrobianos e antioxidantes, com metabólitos secundários tendo sua origem das vias de fosfato de metileritritol e fenilalanina (MEIRELES, 2009; REHMAN et al., 2016).

A investigação a respeito do papel biológico dos óleos essenciais tem sido intensa nos últimos anos, revelando fatos expressivos a respeito das interações existentes. Dentre as mais conhecidas estão a planta-planta (agentes alelopáticos, inibidores de germinação) e planta-animal, visando a proteção como mecanismo de defesa, frequentemente repelente, tóxico e atrativo para polinizadores (insetos, herbívoros). Além disso, existem algumas teorias no que tange às possibilidades como antioxidantes conforme doam hidrogênio em reações oxidativas, principalmente na presença de luz. Sabe-se que os óleos são considerados produtos que carregam substâncias com propriedades bioativas, capazes de proteger plantas contra possíveis ataques patogênicos (EVANS, 2009).

Os compostos voláteis presentes nos óleos essenciais podem atuar de forma sinérgica ou antagônica, a depender das propriedades inerentes de cada composto quando em contato com seres humanos, animais ou mesmo em outras plantas. Por isso, a fim de compreender melhor a respeito das propriedades biológicas, o conhecimento da caracterização química do óleo essencial é de suma importância (CASTRO et al., 2017).

Os estudos científicos na área são completamente justificáveis e de extrema importância. A contribuição para o desenvolvimento de novos produtos naturais com propriedades medicinais, em substituição ao agrotóxicos – agressivos ao homem e ao ambiente – se faz possível devido à descoberta de propriedades presentes em espécies vegetais, como o alto potencial fungicida, fungistático, bactericida ou bacteriostático em suas moléculas, como os óleos essenciais (DE ARAÚJO et al., 2011).

Os óleos essenciais se destacam pelo seu considerável potencial antimicrobiano, por apresentarem substâncias bioativas em seus constituintes (FILIPPIS, 2001). Pesquisadores argumentam a respeito de substâncias como fenóis (1,8-cineol (eucaliptol), carvacrol,

octanol), álcoois ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), aldeídos, cetonas (cânfora),  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ pineno, p-cimeno como sendo compostos químicos com amplo espectro de efeitos biológicos (HERMAN et al., 2016; SHARMA et al., 2017).

Herman et al (2016) citaram a respeito do efeito antifúngico dos óleos essenciais como sendo variável e intimamente associado à atividade dos principais componentes, que por sua vez são causados pelas diferentes interações entre os compostos químicos constituintes. Em geral, no que diz respeito às atividades biológicas dos óleos essenciais, essas tem sido bem documentadas, especialmente aquelas relacionadas às atividades microbiológicas. Diversas pesquisas têm sido realizadas avaliando suas atividades frente a diversos tipos de microrganismos, como deterioradores de alimentos, patógenos e fitopatógenos, revelando o alto potencial de determinados óleos essenciais no controle de tais microrganismos (BAKKALI et al., 2008).

#### **4.2.2 Utilização de óleos essenciais no controle de fitopatógenos**

Os óleos essenciais (OEs) são compostos oleosos, de caráter lipofílico e altamente voláteis, produzidos pelo metabolismo secundário de plantas, com massa molar menor que 300 g/mol, o que possibilita sua separação de outros compostos ou tecidos por meio de processos com vapor, hidro destilação, prensagem a frio ou mesmo extração supercrítica, sendo classificados como GRAS (designação de que um produto químico ou substância adicionada ao alimento é considerado seguro por especialistas) pelo FDA (Food and Drug Administration) (BAKKALI et al., 2008). Quando utilizados por volatilização, apresentam maior efetividade de modo que se necessita de menos óleo do que quando utilizados por contato (SCHERER, 2009).

Apesar de diversos temperos provenientes de plantas terem sido utilizados desde a antiguidade devido às suas propriedades aromáticas, saborizantes e preservativas, somente no século XIII os OEs extraídos por meio da destilação foram utilizados de modo farmacológico, sendo espalhados pelo continente europeu apenas no século XVI, com o primeiro experimento exploratório do seu potencial bactericida (por meio do vapor) ocorrendo no século XVIII (TUREK & STINTZING, 2013).

Atualmente, cerca de três mil OEs são conhecidos, embora apenas cerca de 10% sejam comercializados, principalmente destinados à gastronomia, devido aos seus sabores, ou à indústria farmacêutica/cosmética, devido ao seu aroma (BURT, 2004). Os OEs possuem atividade antimicrobiana inerente, sendo comumente relacionada à estrutura química dos seus

componentes, suas interações e à concentração em que estão presentes. Por serem constituídos por uma série de compostos, como terpenos, terpenóides e compostos aromáticos, os OEs apresentam a vantagem de atuarem de diferentes formas, de modo a possibilitar o controle de fungos de diversos gêneros e diminuindo a probabilidade de seleção de isolados patogênicos resistentes (CABRAL et al, 2013).

Inúmeros estudos demonstraram o potencial antimicrobiano dos OEs contra uma vasta gama de fitopatógenos em pós-colheita, como, por exemplo, a utilização de *Calamintha officinalis*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*, *Origanum compactum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia aegyptiaca* e *Thymus glandulosus* contra *Botrytis cinerea* (BOUCHRA et al., 2003).

Em relação ao gênero *Penicillium*, usando o óleo essencial de anis estrelado e seu extrato acetônico, foi observada uma inibição do crescimento micelial in vitro de *P. citrinum* e *P. viridicatum* próximo a 40%, utilizando 6 µL do óleo essencial de anis estrelado, e em até 75% quando utilizado o extrato acetônico (SINGH et al.,2006). Além disso, esses autores observaram a completa inibição do crescimento in vitro de *P.ochrochloron* e de *P. funiculosum* utilizando o óleo essencial extraído de frutos verdes, maduros e de folhas de *V. agnus-castus* à concentração de 130, 219 e 178 ppm, respectivamente, para *P. ochrochloron* e de 178 ppm para *P. funiculosum* (STOJKOVIĆ et al.,2011). Ainda, tendo em vista uma característica fundamental inerente aos OEs, sua natureza hidrofóbica, é possível que haja a interação das camadas lipídicas da membrana plasmática dos fungos de diferentes formas. Desse modo, ainda sobre a atuação frente ao gênero *Penicillium*, foi evidenciado que os OEs de melaleuca, palmarosa e anis estrelado são capazes de interagir com as camadas lipídicas celulares dos conídios de *P. expansum*, causando severos danos a estas. Estes danos podem ser atribuídos ao potencial antioxidante dos OEs de melaleuca, anis estrelado e palmarosa, que apresentaram uma alta capacidade de sequestrar os radicais livres em um ensaio realizado com DPPH, inibindo o consumo de DPPH em 29, 69 e 83%, respectivamente (ROCHA NETO et al., 2018).

Por outro lado, ao utilizar o óleo de Tamarix in vitro nas concentrações de 80, 200 e 500 µL por disco de papel filtro não foi encontrada atividade antifúngica contra o fungo *Penicillium sp.* (SAIDANA et al, 2008). Em um estudo utilizando os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Thymus vulgaris*, e também suas diferentes frações, foram demonstrados diferentes níveis de atividade antimicrobiana in vitro contra o fitopatógeno, utilizando uma concentração de 1000 ppm (NGUEFACK et al., 2012).

De modo semelhante, na utilização dos óleos essenciais de *Caryophyllus aromaticus*,

*Cinnamomum zeylanicum*, *C. citratus* e *Origanum vulgare* a partir do método de volatilização em disco, foi observada a completa inibição in vitro de *P. expansum* utilizando as doses de 256 ppm, 32 ppm, 512 ppm e 64 ppm, respectivamente. (FRANKOVA et al., 2016). No entanto, quando utilizados para o controle do bolor azul em frutos de maçã, uma alta incidência da doença foi observada, independente do óleo essencial utilizado, da dose ou mesmo do intervalo de armazenamento (SINGH et al., 2006).

Sobre o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, foi comprovada a ação antifúngica do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) frente aos fungos fitopatogênicos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*. Nesse caso, foi observado que, para concentrações a partir de 500 ppm do óleo essencial em questão, todos os fungos fitopatogênicos testados tiveram inibição completa do crescimento micelial e da germinação de esporos. Outro trabalho que buscou analisar o efeito in vitro de óleos essenciais e hidrolatos de alecrim de vargem (Família Lamiaceae), alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.), lippia (*Lippia citriodora* Kunth.), goiaba branca e goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.), capim santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.) e alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) testando apenas seu óleo essencial sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. Nesse trabalho foi comprovada a inibição em 100% de germinação do fungo. Também foi inibido completamente o crescimento micelial do *Colletotrichum gloeosporioides*, comprovando assim que a utilização de óleos essenciais pode ser uma alternativa eficiente e ecologicamente viável, apresentando um grande potencial de utilização em um programa de manejo integrado no controle da antracnose do maracujazeiro (JUNIOR, 2009).

#### 4.2.3 Microemulsões

O uso de óleos essenciais (OEs) tem demonstrado atividade no controle in vitro de fitopatógenos. Todavia, sua utilização em condições de campo é dificultada pela volatilidade e baixa solubilidade em água dos OEs. Uma alternativa é o desenvolvimento de microemulsões que apresentem baixa viscosidade, contribuam para reduzir a volatilidade dos OEs, bem como aumentar a sua solubilidade em água. Desta forma, as microemulsificações surgem como potencial ferramenta a fim de melhorar a atividade biológica dos OEs, possibilitando a utilização destes produtos em condições de campo (FENG et al., 2016, 2018; MCCLEMENTS et al., 2011).

As microemulsões consistem em dispersões coloidais, termodinamicamente

instáveis, que apresentam gotículas esféricas com diâmetro variando entre 1 e 300 nm (ANTON; VANDAMME, 2011; LEONG et al., 2009; MCCLEMENTS, 2012). O pequeno tamanho destas gotículas pode reduzir a degradação química do ingrediente ativo, impedir a floculação dos mesmos e manter o sistema disperso, sem separação (MCCLEMENTS; DECKER, 2000). Além disso, a grande área superficial e a deposição uniforme da (micro) nanoemulsão sobre superfícies permitem uma penetração rápida dos agentes ativos presentes (TADROS et al., 2004).

É possível se estabelecer nitidamente diferenças entre microemulsões e emulsões. A tensão interfacial de uma microemulsão é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão. Isso pode levar à formação espontânea das microemulsões e, conseqüentemente, a um pequeno tamanho das gotículas. Enquanto isso, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (BAGWE et al., 2001; TENJARLA, 1999).

De modo geral, as emulsões são feitas em geradores de ultrassom ou homogeneizadores de alta pressão. O uso do ultrassom para a preparação de soluções ou suspensões consiste em conduzir o fluido através de um orifício de diâmetro reduzido, com pressão moderada, e orientado em direção a uma lâmina vibratória. Quando o sistema atinge uma fase estacionária, entra em cavitação, próximo à extremidade da lâmina. A conseqüente vibração desta lâmina, por sua vez, produz ondas ultrassônicas que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de tamanho reduzido (TRADOS et al., 2004). Os homogeneizadores de alta pressão são equipamentos utilizados na produção de nanoemulsões (TRADOS et al., 2004). Para a formação das soluções ou suspensões nanoemulsificadas, o fluido entra na sede da válvula, que é fechada por um êmbolo e por um pistão hidráulico. A pressão exercida pelo fluido gera um recuo milimétrico entre a válvula e o êmbolo. Através da folga formada, o fluido sai a uma velocidade elevada, colidindo com um amortecedor de impacto, que fica em volta da válvula. Por meio da queda brusca de pressão e do impacto gerado, as partículas sólidas suspensas, como os polissacarídeos ou os líquidos, como os óleos essenciais, se fracionam em partículas extremamente pequenas. No caso dos óleos essenciais, equipamentos como o ultrassom e homogeneizadores geram uma perturbação e transformam as fases oleosa e aquosa em pequenas gotículas de óleo dispersas em água (DATE et al., 2010; TADROS et al., 2004). Esta formação, por sua vez, pode facilitar a aplicação de óleos sobre superfícies e, além disso, pode favorecer o potencial antibacteriano, antifúngico e inseticida das emulsões (SUGUMAR et al., 2014).



Apesar de existirem muitos estudos a respeito do efeito da fina dispersão de óleos essenciais contra agentes patogênicos humanos, pouco se sabe sobre a ação das emulsões contra doenças de plantas. Dentre os estudos desenvolvidos, pode-se destacar aquele envolvendo microemulsões de quitosana, com gotículas de 200 nm e 600 nm, as quais protegeram frutas de banananeira, mamoeiro e fruta-dragão contra antracnose (*Colletotrichum spp.*) sob armazenamento refrigerado (ZAHID et al., 2012)

Além disso, utilizando-se suspensão polissacarídica de babosa frente à doença causada por *Xanthomonas frangariae* em plantas das cultivares Albion e San Andreas, foi possível observar o controle significativo da doença. Todavia, a adição de óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) ou palmarosa (*Cymbopogon martinii*) ao preparado de polissacarídeo potencializou a capacidade da suspensão polissacarídica de reduzir a severidade da mancha angular na cultivar Albion (LUIZ et al., 2017). Outro estudo revelou a ação antifúngica da emulsão de óleo essencial de cravo frente ao fungo *Glomerella cingulata*, onde foi comprovado que a emulsão contendo o ativo potencializou a ação deste contra *G. cingulata*, fungo causador da podridão da uva madura (OLIVEIRA, 2017).

#### **4.2.4 Indução de resistência e mecanismos de defesa**

A capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada ou provável atividade de um patógeno em seus tecidos é o que define sua resistência. Entre os mecanismos utilizados nessa resistência estão os pré-formados – passíveis ou constitutivos – e pós-formados – ativos e/ou induzíveis (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A respeito dos pré-formados, eles já se encontram presente nas plantas antes mesmo do contato com o patógeno. No caso dos pós-formados, os mecanismos podem se mostrar presentes em níveis mais baixos ou ausentes antes da infecção, se mostrando em produção ou ativados em resposta à presença do patógeno. Como barreiras físicas, os fatores estruturais atuam no impedimento da entrada do patógeno e sua colonização nos tecidos, enquanto que as reações químicas ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno, criando condições desfavoráveis ao crescimento patogênico no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

De acordo com Pascholati & Leite (1995), cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores, são alguns dos mecanismos pré -formados, do grupo dos estruturais. Em relação aos bioquímicos, também pré-formados estão os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos.

Os mecanismos de defesa estruturais pós-formados envolvem mudanças morfológicas na parede celular vegetal. De modo a responder à tentativa de penetração do patógeno, especialmente em gramíneas, pode ocorrer a deposição de material heterogêneo entre a membrana plasmática e a parede celular no sítio de infecção, com a formação de papila. Em relação aos mecanismos de resistência bioquímicos pós-formados, as fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixa massa molecular sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana (AGRIOS, 2005).

Entre as enzimas de interesse envolvidas nos mecanismos de defesa pós-formados está a fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima que catalisa a primeira etapa de formação dos fenilpropanóides, a desaminação da fenilalanina origina o ácido cinâmico. Esse processo de desaminação dá início à biossíntese de flavonóides e lignina e, ao indicar um possível aumento na biossíntese de lignina, tal atividade cria uma possível barreira contra a infecção microbiana (MARRIOTT, BEEN & PERKINS, 1978).

Ainda, a respeito da FAL, Stangarlin et al. (2011) enfatizam, além da importância desta enzima, citam a respeito da peroxidase, a qual está presente no tecido das plantas e é conhecida por participar de diversos processos fisiológicos de grande relevância, tais como na biossíntese do hormônio vegetal etileno, da oxidação de compostos fenólicos, e também na biossíntese de lignina (GARCIA; CARRIL, 2009).

Conforme a revisão de Vinod e Sabah (2018) a defesa das plantas envolve um número de compostos que regulam a produção de defesa química. Estão intimamente conectados com o ácido salicílico, etileno, ácido jasmônico e ácido abscísico. O ácido salicílico como agente indutor de resistência em *Arabidopsis* contra *Peronospora parasitica* é um exemplo. Do mesmo modo, o Bion (Acibenzolar-S-methyl) é um ativador químico da resistência de plantas em pepino, que produz resistência induzida contra *Colletotrichum sp.* Outro exemplo é a proteção de plantas de sorgo em condições de campo contra *Exserohilum turcicum* por *Saccharomyces cerevisiae*. Melo et al. (2017) comprovaram que produtos naturais disponíveis de forma comercial induzem o acúmulo de fitoalexinas, como o extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*. O aumento progressivo das doses da alga resultou em aumentos também progressivos de fitoalexinas em soja e em sorgo, desse modo demonstraram alta correlação do fator dose com a quantidade de fitoalexina reduzida.

Os métodos alternativos surgem como uma maneira capaz de reduzir os riscos inerentes à dependência do uso dos agrotóxicos, seja em relação ao ambiente como ao consumo de alimentos. Trata-se de insumos menos agressivos que possibilitam o desenvolvimento de uma agricultura mais sadia, por serem obtidos de recursos renováveis e

facilmente degradados no ambiente, além de possuir baixa ou moderada toxicidade ao homem, pouca fitotoxicidade e custo reduzido. Além disso, a ferramenta objetiva aumentar a capacidade de produção das culturas tratadas, aliada à geração mínima de impacto sobre as organizações sociais e culturais, além dos ecossistemas (PAULA JUNIOR et al, 2016).

Como um método alternativo aos fungicidas, surge a indução de resistência, uma vez que pode ser utilizada no controle de doenças de plantas por ser efetiva contra um amplo espectro de patógenos . A resistência induzida consiste no aumento da resistência por meio do uso de agentes abióticos ou bióticos, que ao entrar em contato com a planta, tem seus elicitores (moléculas de natureza variável como carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídios) reconhecidos por receptores na membrana do vegetal (SHETTY et al., 2008).

A indução de resistência do vegetal consiste no processo de ativação de mecanismos de defesa, que resulta dos estímulos provocados pelas moléculas elicitoras, esse processo pode ocorrer tanto no sítio de contato do indutor com a planta, como em locais distantes do mesmo, em outras palavras, esse processo pode se dar de forma local ou sistêmica.

Dessa forma ocorre o aumento do nível de resistência, conseqüente da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, utilizando-se de agentes externos (STADNIK; MARASCHIN, 2004). A comunidade acadêmica nesse sentido tem voltado suas atenções para as alterações no que tange a resistência vegetal a agentes fitopatogênicos, de modo a investigar potenciais indutores de resistência, como é o caso específico dos óleos essenciais, extratos de plantas para fins medicinais, entre outros.

Embora elicitor seja o termo designado a moléculas que induzem a síntese e acúmulo de compostos antimicrobianos no interior das células vegetais, atualmente tal termo é empregado para designar moléculas que são de origem biótica ou abiótica, exógeno ou endógena, capazes de estimular qualquer mecanismo de defesa vegetal. A síntese de compostos fenólicos, a síntese de proteínas que inibem a ação de enzimas produzidas por patógenos, a formação de estruturas de defesa histológica, a produção de novas classes de proteínas relacionadas à patogênese e uma resposta de hipersensibilidade, entre outros, são alguns dos exemplos de mecanismos induzidos por elicitores (DIXON, 1986; HAHN, 1996; KEEN, 1975; STICHER; MAUCH MANI; METRAUX, 1997).

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- BAKKALI, F., AVDERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.
- BORIN, R. C. *Fungicidas associados a forfitos e complexos nutricionais interferem na qualidade de sementes de milho*. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Visinhos, PR.
- BORSATO, L. C. *Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por *Uromyces appendiculatus**. 2009. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- BOUCHRA, C., ACHOURI, M., IDRISSE Hassani, L.M., HMAMOUCHE, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatea against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. J. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 89, p. 165-169, 2003.
- BRITO, A. H., VON PINHO, R. G., POZZA, E. A., PEREIRA, J. L., & FARIA FILHO, E. M. Efeito da cercosporiose no rendimento de híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 472-479, 2007.
- BURT, S. Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e possíveis aplicações em alimentos - uma revisão. **Revista internacional de microbiologia alimentar**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CABRAL, L.C., PINTO, V.F., PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 166, p. 1-14, 2013
- CASTRO, J.C.; ENDO, E.H.; SOUZA, M.R.; ZANQUETA, E.B.; POLONIO, J.C.; PAMPHILE, J.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FILHO, B.A.A. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101- 109, 2017.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento; Acompanhamento da safra brasileira de grãos, 10º Levantamento julho, 2022.
- COTA, L. V., DA COSTA, R. V., SILVA, D. D., CASELA, C. R., & PARREIRA, D. F. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. **Journal of Phytopathology**. v. 160, n. 11, p.680-684, 2012.

COTA, L.V.; DA SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; Helminthosporiose causada por *Exserohilum turcicum* na Cultura do Milho, Circular Técnica 195, Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**. 2013.

DA COSTA, R. V.; COTA, L. V.; CASELA, C. R. **Manejo de doenças**. 2011.

DATE, A. A., DESAI, N., DIXIT, R., & NAGARSENKER, M. Selfnanoemulsifying drug delivery systems: Formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1595–1616, 2010.

DE ARAÚJO, D.A.M.; FREITAS, C.; CRUZ, J.S. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v. 89, n. 15, p.540-544, 2011.

DIXON, R. A. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. **Biological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 239-291, 1986.

DUARTE, M.M., ÁVILA, C.J., SANTOS, V. Danos e nível de dano econômico do percevejo barriga-verde na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 291-299, 2015.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; FREITAS, P.T. Eficácia de diferentes fungicidas na cultura do milho. *Bioscience Journal*. Uberlândia, v. 25, n. 4, p.101-111, 2009.

DUDIENAS, C., FANTIN, G. M., DUARTE, A. P., TICELLI, M., BÁRBARO, I. M., FREITAS, R. S., PÂNTANO, A. P. . Severidade de ferrugem polissora em cultivares de milho e seu efeito na produtividade. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 16-23, 2013.

DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia** e, v. 13, n. 24, p. 127, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2ª ed. rev., ampl. Brasília, *Embrapa Informação Tecnológica*. 627p, 2009.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Reunião Técnica Anual de Milho LVIII Reunião Técnica Anual de Milho e XLI Reunião Técnica Anual de Sorgo: indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul safras 2013/2014 e 2014/2015. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

EVANS, W.C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 16. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier Ltd., 2009.

FALCÓN, A. B.; CABRERA, J. C.; COSTALES, D.; RAMIREZ, M. A.; CABRERA, V. T.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A. The effect of size and acetylation degree of

chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.24, p.103 – 112, 2008.

FENG, J. et al. Effect of emulsifying process on stability of pesticide nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 497, p. 286–292, 2016.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA de E. **Principais doenças na cultura do milho**. Embrapa, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar. v. 4.3. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2003.

FIGUEIREDO, M. et al. Atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Goiânia: ABMS, 2010.

FILIPPIS, F.M. *Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Honsho e Hoshu – experimentos e modelagem*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FRANKOVA, A., SMID, J., BERNARDOS, A., FINKOUSOVA, A., MARSIK, P., NOTOVITNY, D., ... & KLOUCEK, P. The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Food Control**, n.68, p.62-68, 2016.

FREITAS JÚNIOR, S. P., Do Amaral Júnior, AT, Rangel, RM, & Viana, AP. Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 09, n. 01-07, 2009.

GARCIA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia)**, v. 2, n. 3, p.119-145, 2009.

HAHN, Michael G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73 – 82, 1982.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 165-172, 2016.

HOYOS, J. M. Á., ALVES, E., ROZWALKA, L. C., SOUZA, E. A. D., & ZEVIANI, W. M. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270–284, 2012.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos Agrotóxicos. Rio de Janeiro, 2015.

JAISSWAL, M; DUDHE, R; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

JÚNIOR, Ismail Teodoro Souza; SALES, Nilza Lima Pereira; MARTINS, Ernane Ronie. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

KALEMBA, D.; SYNOWIEC, A. Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*. **Molecules**, v. 25, n. 59, p. 1-33, 2019.

KEEN, N. T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens. **Science**, v. 187, n. 4171, p. 74-75, 1975.

LERAYER, R. A., PATERNIANI, E., SILVEIRA, J. M., MENOSSI, M., ODA, L., & DI CIERO, L. Guia do milho – tecnologia do campo a mesa. **Conselho de Informações sobre Biotecnologia**, v. 17, p. 16, 2006.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, n.44, p.300-306, 2007.

LUIZ, C. *Nanoemulsões de aloe vera e óleos essenciais de melaleuca alternifolia e cymbopogon martinii como indutores de resistência contra a mancha angular do morangueiro (xanthomonas fragariae)*. 2017. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

MARRIOTT, J.; BEEN, B.O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Plant Physiology**, v.44, p.38-42, 1978.

MEIRELES, M.A.A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. 1. ed. Boca Ranton: CRC, 2009.

MELO, T. A. D., ARAÚJO, M. U. P., SERRA, I. M. R. D. S., & PASCHOLATI, S. F. Produtos naturais disponíveis comercialmente induzem o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 205- 211, 2017.

MENDONÇA, F., DA SILVA, K.F.S., DOS SANTOS, K.K., RIBEIRO JÚNIOR, K.A.L., SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629-636, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal Food Science**. v. 65, p. 1270–1282, 2000.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.

MUR, L. A., KENTON, P., LLOYD, A. J., OUGHAM, H., & PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know. **Journal of experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 501-520, 2008.

NETO, R. Aplicação de óleos essenciais em embalagens bioativas para o controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã. 2018.

NGUEFACK, J., TAMGUE, O., LEKANGNE DONGMO, J.B., DAKOLE, C.D., LETH, V., VISMER, H.F., AMVAM ZOLLO, P.H., NKENGFACK, A.E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, p. 377-383, 2012.

OLIVEIRA, D. A. D. *Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica frente à glomerella cingulata de nanoemulsões contendo mancozebe e eugenol*. 2017. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria - RS.

ONU BRASIL. Organização das Nações Unidas no Brasil. ONU no Brasil, 2017.

PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. 2006.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, p.193-217, 1995.

PAULA JUNIOR, T.J.; MORANDI, A.B.; VEZON, M. Manejo Integrado de Doenças e Pagras utilizando o controle biológico. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. *Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

PINHO, E., GROOTVELD, M., SOARES, G., HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

REHMAN, R.; HANIF, M. A.; MUSHTAQ, Z.; AL-SADI, A. M. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, p. 117- 160, 2016.

SAIDANA, D., MAHJOUB, M.A., BOUSSADA, O., CHRILAA, J., CHERAIF, I., DAAMI, M., MIGHRI, Z., HELAL, A.N. Chemical composition and antimicrobial activity



of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). *Microbiological Research*, v. 163, p. 445-455, 2008.

SARTORI, M., NESCI, A., GARCÍA, J., PASSONE, MA, MONTEMARANI, A., & ETCHEVERRY, M. Eficácia de bactérias epífitas na prevenção do mal-das-folhas causado por *Exserohilum turcicum* em milho. *Revista argentina de microbiologia*, v. 49, n. 1, pág. 75-82, 2017.

SCHERER, R., WAGNER, R., DUARTE, M. C. T., & GODOY, H. T. Composição e atividades 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.

SCHIEDECK, G. Aproveitamento da biodiversidade regional de plantas bioativas para a sustentabilidade dos agricultores de base ecológica na região sul do RS. Projeto de Pesquisa do Macroprograma 6 - Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura Familiar e à Sustentabilidade do Meio Rural. Pelotas: EMBRAPA clima Temperado, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2, p.4038-4045, 2009.

SILVA, E.O.; ALVES, E.; FERREIRA, T.C.; ALBUQUERQUE, C.A.C. Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana e na ativação de respostas bioquímicas em tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 43, n. 3, 2017.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M.H.; LEE, Y.R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition*, v. 34, p. 29-46, 2017.

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G. C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M., IRITI, M. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SHEN, H.; KEEN, N. T. Characterization of the promoter of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of bacteriology*, v. 175, n. 18, p. 5916-5924, 1993.

SHETTY, N. P., JØRGENSEN, H. J. L., JENSEN, J. D., COLLINGE, D. B., SHETTY, H. S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, v. 121, p. 267-280, 2008.

SINGH, G., MAURYA, S., DELAMPASONA, M.P., CATALAN, C. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 111–121, 2006.

STADNIK, M. J & BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase

suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25 – 34, 2000.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. **Stadnik MJ, Talamini V. Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis (Brazil): CCA/UFSC**, p. 221-244, 2004.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p.18-46, 2011.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, and JP. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

STOJKOVIĆ, D., SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., DŽAMIĆ, A., ĆIRIĆ, A., RISTIĆ, M., & GRUBIŠIĆ, D. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de frutos e folhas de *Vitex agnus-castus* L.. **Food Chemistry** , v. 128, n. 4, pág. 1017-1022, 2011.

SUGUMAR, S., CLARKE, S. K., NIRMALA, M. J., TYAGI, B. K., MUKHERJEE, A., & CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, n. 3, p. 393–402, 2014.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., & SOLANS, C. . Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 303- 318, 2004.

TUREK, C., STINTZING, F.C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40-53, 2013.

UEBEL, J. D. Avaliação de fungicidas no controle de doenças foliares, grãos ardidos e efeito no NDVI (Índice de Vegetação por Diferença Normalizada) em híbridos de milho. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

VINOD, K., SABAH, A. Plant defense against pathogens: the role of salicylic acid. **Research Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 97-103, 2018.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **Journal of Food Safety**. v.27, n.1, p.91-101, 2007.

WERRIE, P. Y., BURGEON, C., LE GOFF, G. J., HANCE, T., & FAUCONNIER, M. L. Biopesticide trunk injection into apple trees: A proof of concept for the systemic movement of mint and cinnamon essential oils. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 650132, 2021.

ZAHID, N., ALI, A., MANICKAM, S., SIDDIQUI, Y., & MAQBOOL, M.. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, n. 4, p. 925–939, 2012.

## 5. CAPÍTULO 1 – EMULSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA HELMINTOSPORIOSE NO MILHO

### 5.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) destaca-se como matéria prima de rações e combustíveis, além de farinhas, óleos, silagem, e alimentação humana. Considerada uma commodity, além de fonte de amido, trata-se de uma cultura essencial para o mercado nacional (PAVÃO & FILHO, 2011). O Brasil, 3º maior produtor mundial de milho, com a produção de 112,34 milhões de toneladas (CONAB, 2022), tem como seu maior produtor o estado de Mato Grosso, produzindo 40,4 milhões de toneladas na safra 2020/21 e o cultivo deve atingir 5,84 milhões de hectares (IMEA, 2022).

No contexto fitossanitário, o milho é suscetível a várias doenças, muitas das quais podem ser limitantes à sua produção, destacando-se as doenças fúngicas. As principais doenças são a Cercosporiose, Mancha Branca, Ferrugem Polísora (*Puccinia polysora*), Ferrugem Tropical ou Ferrugem Branca (*Physopella zae*), míldio (*Peronosclerospora sorghi*); Carvão comum (*Ustilago maydis*), Mancha marrom (*Physoderma maydis*); Helmintosporiose (*Bipolaris maydis*) (PEREIRA, 2006).

A helmintosporiose ou também denominada mancha foliar de *Bipolaris* apresenta-se como uma doença de grande importância, trata-se de uma doença comum em todos os continentes (GULTYAEVA et al., 2018; GUPTA et al., 2018a; GUPTA et al., 2018b), acarretando perdas de produtividade, que resultam em grandes impactos econômicos nas regiões produtoras (SULTANA et al., 2018). As perdas devido à helmintosporiose são altas, especialmente nas áreas mais quentes do mundo, chegando a atingirem 16%- 43% (AYANA et al., 2018; DEVI et al., 2018).

Segundo Pereira (2006), na cultura do milho, *Bipolaris maydis* pode ocasionar dois tipos de lesões. As lesões causadas pela raça O do patógeno são alongadas, medindo 0,2-0,6 cm de largura por 0,5-2,0 cm de comprimento, de coloração marrom-claro a marrom-castanho com bordos paralelos, podendo apresentar uma coloração mais escura ao centro. As lesões causadas pela raça T medem 0,6-1,2 cm de largura por 0,6-2,7 cm de comprimento, de forma elíptica ou fusiforme, com coloração castanha, podendo ocorrer as formas de halos cloróticos.

Por meio do uso intensivo de defensivos agrícolas graves desequilíbrios ambientais podem ser gerados, o que resulta em contaminação do solo, alimentos, além de recursos hídricos (FONSECA et al. 2015). Vale ressaltar a seleção de populações resistentes aos

ingredientes ativos, quando se recorre à utilização de fungicidas sintéticos, agravando ainda mais os problemas ambientais causados por esses compostos (FRAGOSO et al. 2002). Devido a esse motivo, faz-se necessário o manejo sustentável e ecologicamente viável de fitopatógenos, a fim de reduzir o uso de defensivos químicos (TALAMINI et al. 2004). Entre as viabilidades na utilização dos produtos naturais estão o menor potencial de contaminação ambiental, além de oferecerem menor risco à saúde dos animais e humanos (SILVA, 2018).

O controle de fitopatógenos via plantas medicinais e aromáticas faz-se possível de maneira alternativa, por ter como vantagem, além do baixo custo de aplicação e diminuição do impacto ambiental, a presença de compostos naturais com ação bactericida (VIGOSCHULTZ, 2006), fungitóxica (OLIVEIRA et al. 2010) ou mesmo pela capacidade de induzir respostas de defesa da planta, através da produção de fitoalexinas, aumento da atividade das proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) e da síntese de outros compostos bioquímicos e estruturais de defesa da planta (PEREIRA, 2008).

Nesse contexto, o emprego dos óleos essenciais como controle alternativo tem se expandido de maneira relevante nos últimos anos e seu potencial tem se revelado no que diz respeito ao controle de fitopatógenos (CUNHA, 2015; OOTANI et al., 2013; SILVA, 2014).

Os óleos essenciais são compostos naturais produzidos por plantas aromáticas, trata-se de metabólitos secundários com alto potencial antioxidante (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013), e antimicrobiano (PRASHAR et al., 2003). Devido às suas propriedades medicinais, muitos destes compostos aromáticos têm sido amplamente utilizados como ingredientes funcionais em alimentos, cosméticos e medicações (BURT, 2004).

Algumas plantas apresentam diversas substâncias em sua composição química, muitas delas com potencial fungicida ou fungistático, as quais devem ser estudadas para utilização direta do produtor rural, bem como para servir de matéria prima para formulação de novos produtos (GARCIA et al, 2012).

Dentre os óleos essenciais podem-se destacar os óleos de cravo e canela. Os estudos fitoquímicos do cravo revelam a presença de até 90% de óleo essencial, no qual o eugenol é o componente majoritário, acompanhado por trans-cariofileno, acetato de eugenila e a-humuleno (PAOLI et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). Conforme Amaral & Bara (2005), Park et al. (2007) e Nzeako & Lawati (2008), o eugenol pode contribuir com atividade antifúngica e antibacteriana (LORENZI & MATOS, 2002; PAHLOW, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008). Estudos referentes ao potencial anticarcinogênico ou quimiopreventivo, antioxidante, antiagregante plaquetário e antitrombótico do cravo têm sido descritos nas literaturas especializadas (LORENZI & MATOS, 2002; BANERJEE & DAS,

2005; BANERJEE et al., 2006; PAOLI et al., 2007).

Na canela, a constituição química varia significativamente em relação às distintas partes da planta, a casca é rica em aldeído cinâmico e a folha é fonte de eugenol (KOKETSU et al. 1997). O eugenol foi citado em diversos trabalhos como inibidor do crescimento microbiano (FARIA et al. 2006; LEMOS et al. 2005; PEREIRA et al., 2004), apresentando interesse como matéria-prima em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e produtos farmacêuticos. De acordo com Santurio e colaboradores (2007), o óleo essencial extraído da canela apresenta um potencial antimicrobiano significativo frente a bactérias e fungos.

Goñi et al. (2009), estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do cravo (*E. caryophyllata*) e canela (*C. zeylanicum*) sobre diversos microorganismos contaminantes de alimentos e observaram que ambos os óleos apresentaram uma excelente ação antibacteriana e antifúngica. Esses autores também observaram que os óleos tiveram uma potência maior para os fungos, seguido das bactérias Gram positivas, sendo *P. aeruginosa* a bactéria que apresentou maior resistência ao óleo essencial.

Com tudo isso, tendo em vista o potencial antimicrobiano e indutor de resistência de moléculas provenientes de plantas, o presente trabalho buscou avaliar o efeito de óleos essenciais sobre o fitopatógeno *B. maydis* e na proteção de plantas de milho contra a helmintosporiose.

## 5.2 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e as análises processadas no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 5.2.1 Condições de Cultivo

O cultivo das plantas ocorreu em condições de casa de vegetação, onde as temperaturas variaram de 6° a 39° durante a realização dos experimentos, com médias de 22,5°.

Foram utilizados dois genótipos de milho, ambos do grupo híbrido, tipo de grão semi-duro, originários da empresa Du Pont Pioneer®. Um deles é P1630H, que apresenta suscetibilidade ao fungo *Bipolaris maydis* e Fortuna, menos suscetível. As sementes foram armazenadas a 4°C. Foram semeadas cinco sementes por vaso plástico (2L), contendo mistura

de solo fértil com substrato para mudas (9:1). Em torno de 15 dias após esse período, o desbaste foi realizado. Um vaso com duas plantas foi considerado a unidade experimental.

### 5.2.2 Isolamento, identificação e produção de inóculo

Foi utilizado o isolado de *B. maydis*, cujo código de acesso é MANE 188 localizado na micoteca Anne Lore Schroeder, disposto em Castellani. A micoteca se encontra no Laboratório de Fitopatologia da UFSC. O isolado utilizado no presente estudo foi isolado a partir de amostras foliares sintomáticas provenientes da Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC, além de ter sido caracterizado de forma molecular pela empresa Helixxa Serviços Genômicos® (SCHAUFFLER, 2019).

Na fase de obtenção de inóculo, o fungo *B. maydis* foi repicado para placas de Petri com BDA mantidas em sala de crescimento por aproximadamente 15 dias (25°C – 12h de fotoperíodo). Após esse período, foram utilizados como substrato, grãos de sorgo em frascos Erlenmeyer de 125 ml. Cada frasco recebeu 50 gramas de grãos e 50 ml de água destilada. Este conteúdo foi autoclavado uma vez durante 30 minutos (Oglari, 1999). Após a autoclavagem, foram adicionados aos frascos fragmentos de meio de cultura BDA contendo estruturas provenientes do cultivo de *B. maydis*. Após esse momento, os frascos foram acondicionados em BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por aproximadamente 10 dias, até a completa colonização dos grãos de sorgo. Diariamente cada frasco foi agitado para facilitar a colonização de todos os grãos (Sasse, 2008). Desta feita, os grãos de sorgo colonizados foram espalhados em uma bandeja plástica fechada contendo algodão umedecido com água destilada e permanecendo incubados em sala de crescimento a 25°C e 12 horas de fotoperíodo por cerca de 96 horas. Anteriormente ao momento de inoculação, os grãos de sorgo colonizados foram retirados da bandeja, colocados em Becker contendo 1 litro de água destilada estéril e misturados com auxílio de um bastão de vidro. Após a suspensão dos conídios na água, a concentração total foi ajustada para  $1 \times 10^4$  conídios/ml, com auxílio de câmara de Neubauer.

### 5.2.3 Óleos e emulsões

Os bioensaios foram realizados com óleos essenciais (OEs): óleo essencial de Cravo (*Syzigium aromaticum*), Gengibre (*Zingiber officinalis*), Hortelã pimenta (*Mentha piperita*), Tomilho (*Thymus vulgaris*), Lemongrass (*Cymbopogon schoenanthus*), Canela (*Cinnamomum cassia*), Laranja (*Citrus sinensis*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus*

*officinalis*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), citronela (*Cymbopogon nardus Rendle*) e palmarosa (*Cymbopogon martini*), todos provenientes da empresa By Samia®, especializada em aromaterapia, localizada em Predizes/SP.

Para o preparo das emulsões, o óleo essencial foi adicionado a uma solução contendo Tween 80 a 0,001% em água destilada. As emulsões foram feitas com 0,01% de OE, sendo a mistura submetida às ondas ultrassônicas por 5 min, utilizando aparelho Ultraturrax (LUIZ et al., 2017).

## 5.2.4 Screening de óleos essenciais

### 5.2.4.1 Ensaio in vitro

Para a realização da seleção dos óleos foi realizado inicialmente experimento in vitro por volatilização, que consistiu na adição de 10 mL de meio BDA em placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura, foi inserido um disco de micélio do fitopatógeno (0,5 cm de diâmetro) no centro da placa. Em seguida foi pipetado um óleo essencial a 0,2% (v/v), água destilada (controle), em um disco de papel filtro (0,5 cm de diâmetro), o qual foi depositado na parte interna da placa de Petri. Foram avaliados todos os óleos descritos no item 5.3. Posteriormente, as placas foram vedadas com papel filme e armazenadas em caixas de plástico em BOD a 25° por 7 dias. Foi avaliado o diâmetro do crescimento micelial do fitopatógeno no interior das placas de Petri, no período que compreendeu 2, 4 e 6 dias após a data da repicagem.

## 5.2.5 Proteção de planta utilizando emulsões de OE

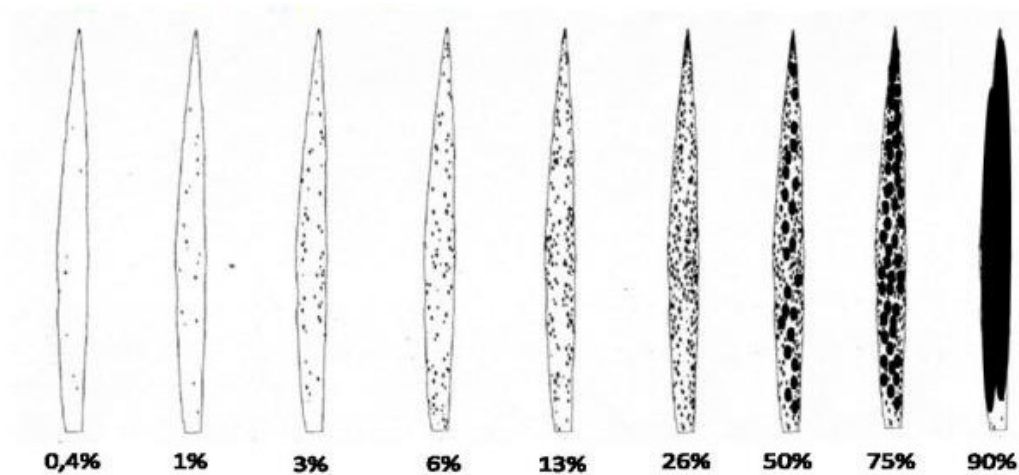
Plantas de milho no estágio V4, das cultivares P1630H e FORTUNA, foram pulverizadas com as emulsões de cravo, canela, tomilho e tea tree. Inicialmente as emulsões foram utilizadas a 0,5% e 1,0%; posteriormente a 0,01% de óleo essencial (v/v). No controle, as plantas foram pulverizadas com água destilada.

Após 3 dias, as plantas foram inoculadas artificialmente com suspensões contendo  $1 \times 10^4$  conídios/ml de *B. maydis*, utilizando-se aproximadamente 5 ml de suspensão por planta, e acondicionadas em câmara úmida escura por 24h. Em seguida, as plantas foram novamente acomodadas nas bancadas em casa de vegetação.

Aos 5 e 10 dias após a inoculação, foi avaliada a severidade do ataque de *B. maydis*, por meio da porcentagem da área foliar lesionada. Para tanto foi utilizada escala diagramática



adaptada de Martinez- Franzener (2006), analisando a terceira e quarta folhas de cada planta, no total de quatro folhas avaliadas por vaso, com seis repetições por tratamento.



Fonte: Adaptada de MARTINEZ-FRANZENER (2006).

Figura 1. Escala diagramática para determinação da severidade da helmintosporiose (*B. maydis*) em milho.

## 5.2.6 Análises microscópicas

As plantas de milho, na fase V4, foram tratadas em vaso com as emulsões dos óleos que se mostraram mais eficientes na etapa anterior (emulsão dos óleos de cravo e canela, a 0,01%). Na testemunha, as plantas foram pulverizadas com água destilada. As folhas intermediárias foram cortadas, depositadas em caixas gerbox, e inoculadas com 10 gotas de 10  $\mu$ L de suspensão de conídios ( $1 \times 10^4$  conídios/ml), 3 dias após a pulverização das emulsões.

### 5.2.6.1 Avaliação da germinação de conídios

A germinação de conídios de *B. maydis* foi avaliada em microscópio óptico. Com auxílio de um furador, foram retirados 5 discos foliares de 1 cm de diâmetro da porção média da segunda e terceira folhas de 5 plantas de milho por tratamento, 12 horas após a inoculação. Após a coleta, os discos foram dispostos em placas de Petri de 5 cm de diâmetro forradas com papel filtro umedecido com solução de etanol e ácido acético, concentração de 3:1 (v/v), com a superfície abaxial voltada para cima. Tal solução foi trocada diariamente e no terceiro dia, os discos foliares foram lavados com água destilada estéril. Após esse procedimento, os

discos foram fixados com solução de lactoglicerol, ácido láctico e água destilada, concentração de 1:1:1 (v/v/v) e colocados sobre lâminas de vidro com glicerina.

As estruturas fúngicas foram coradas com solução azul de anilina (0,1 mg/ml) no momento da contagem. A porcentagem de germinação e formação de apressório foi determinada em 50 conídios por repetição (STADNIK & BUCHENAUER, 2000; BORSATO, 2009).

### **5.2.7 Análises bioquímicas**

Plantas de milho no estágio V4 foram tratadas com água destilada (controle) ou com as emulsões de óleos essenciais de cravo e canela a 0,01% (v/v) e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias depois.

A amostra utilizada foi de aproximadamente 200 mg de tecido vegetal proveniente das folhas 2 e 3 das plantas de milho. As amostras foram coletadas a cada 36 h a partir da inoculação das plantas por um período de 108 h.

Para proceder com as análises bioquímicas foi necessário preparar um extrato proteico. Para tanto, aproximadamente 200 mg por amostra de tecido foliar foi macerado com auxílio de cadinho, pistilo e nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó. Em seguida, foi adicionado 1,5 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona 1% e fluoreto de fenilmetanosulfonil 1 mM. A suspensão foi transferida para microtubos de 2 ml, e centrifugada a 20.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) foi recolhido.

#### *5.2.7.1 Determinação da atividade de fenilalanina-amônia-liases*

Para a determinação da atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8) como substrato. Foram adicionados 50 µL do extrato proteico a 450 µL do substrato e esta mistura foi incubada a 40°C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de água destilada e a absorbância da solução final foi mensurada a 290 nm. Os resultados foram expressos como nmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (Falcón et al., 2008).

### 5.2.7.2 Determinação de proteína total

Para poder quantificar a atividade enzimática da fenilalanina-amônia-liase foi determinada a concentração de proteínas totais de cada amostra pelo método de Bradford (1976), com a utilização do reagente –coomassie brilliant blue. As leituras de absorvância das soluções foram realizadas através de espectrofotometria (595 nm). Posteriormente, foi realizada a conversão dos valores de absorvância em concentração de proteína solúvel. Essa conversão foi feita pela comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino.

### 5.2.8 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Para os testes com plantas, após a verificação da homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância (F-teste,  $P < 0,05$ ). Quando significativo, seguiu-se com teste de separação de médias (Tukey,  $P < 0,05$ ). Para análises estatísticas, foi utilizado Sisvar 7.0 (FERREIRA, 2003).

## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais pelo método de volatilização *in vitro* com discos de papel filtro

Inicialmente foi realizado ensaio laboratorial *in vitro* dos OEs de cravo (*Syzygium aromaticum*), gengibre (*Zingiber officinalis*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), tomilho (*Thymus vulgaris*), lemongrass (*Cymbopogon schoenanthus*), canela (*Cinnamomum cassia*), laranja (*Citrus sinensis*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), citronela (*Cymbopogon nardus Rendle*) e palmarosa (*Cymbopogon martini*) verificando seu efeito antifúngico frente à taxa de crescimento micelial do fungo *B. maydis*.

Em todos os tempos avaliados foi possível observar que os óleos essenciais de canela, cravo, tea tree e tomilho reduziram significativa e estatisticamente o crescimento micelial do fungo, apresentando percentual de inibição de 92%, 93%, 94% e 90%, em relação à testemunha, respectivamente, em todos os tempos de avaliação. Além desses óleos, o óleo

de palmarosa apresentou um dos maiores níveis de inibição de crescimento do fitopatógeno *in vitro* (94,46%), observada no primeiro tempo de medição do diâmetro de crescimento micelial.

Do mesmo modo, os óleos de citronela e lemongrass inibiram significativamente o crescimento micelial do fitopatógeno em 87,89% e 93,06%, respectivamente, percentual aproximado observado em todos os tempos de avaliação. No mesmo experimento, os óleos de gengibre e eucalipto, apresentaram menor percentual de inibição, 59% e 25% respectivamente, comparado à testemunha. Em contrapartida ao contexto de inibição de crescimento micelial, os óleos de eucalipto e laranja por sua vez, apresentaram possível efeito estimulante, uma vez que o diâmetro do crescimento micelial observado nestes foi de 4,73% e 23,35% a mais do que o observado na testemunha (Figura 2).

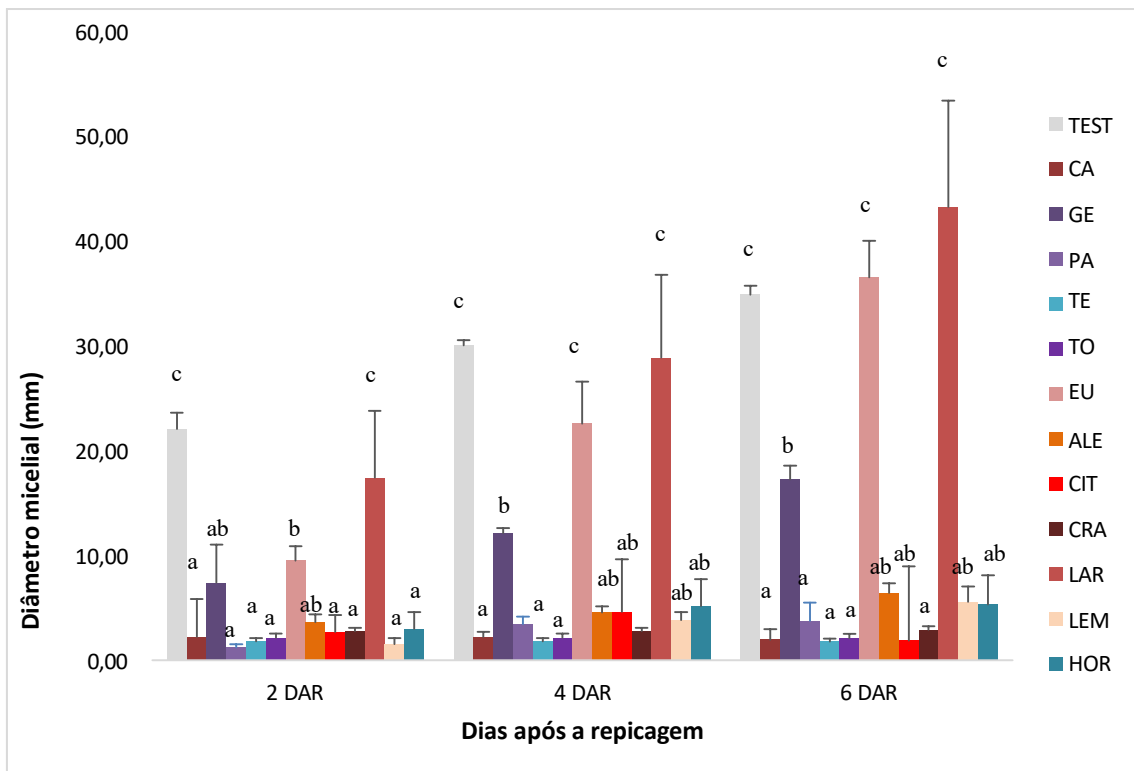


Figura 2. Efeito de inibição do crescimento micelial de *B. maydis* frente aos óleos essenciais de canela (CA), gengibre (GE), palmarosa (PA), tea tree (TE), tomilho (TO), eucalipto (E), alecrim (ALE), citronella (CIT), cravo (CRA), laranja (LAR), lemongrass (LEM) e hortelã pimento (HOR), a 0,2% por volatilização, em diferentes tempos de avaliação. Médias seguidas por letras distintas, em um mesmo tempo de avaliação, diferem significativamente entre si (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### 5.3.2 Proteção da planta utilizando emulsões de OE

Os óleos de cravo e canela, aplicados 3 dias antes da inoculação das plantas, reduziram significativamente a severidade de *B. maydis* em milho em ambas as cultivares testadas, todavia, em diferentes proporções. Em relação à testemunha, o óleo de cravo promoveu redução de 44% na severidade da doença, enquanto os demais óleos (canela, tea tree e tomilho) não diferiram da testemunha (Figura 3). Já na cultivar Fortuna, os óleos promoveram maior controle quando comparado à P1630H, com reduções da severidade em torno de 60, 58 e 23%, respectivamente, para os óleos de canela, cravo e tomilho (este último sem diferir da testemunha). Na cultivar Fortuna por outro lado, o óleo de tea tree apresentou um resultado controverso quando comparado ao apresentado na cultivar P1630H, 21% a mais de sintomas em relação à testemunha (Figura 4).

Vale ressaltar a respeito do comportamento das cultivares em relação aos tratamentos, em que, tendo sido dissemelhantes, na cultivar FORTUNA, por exemplo, foi perceptível uma expressão maior da atividade fungitóxica das emulsões, principalmente dos óleos de tomilho e canela, quando comparada à cultivar P1630H, que se mostrou mais suscetível à ação do fitopatógeno, em cujos tratamentos com as emulsões se mostraram ineficazes na redução da severidade de *B. maydis*.

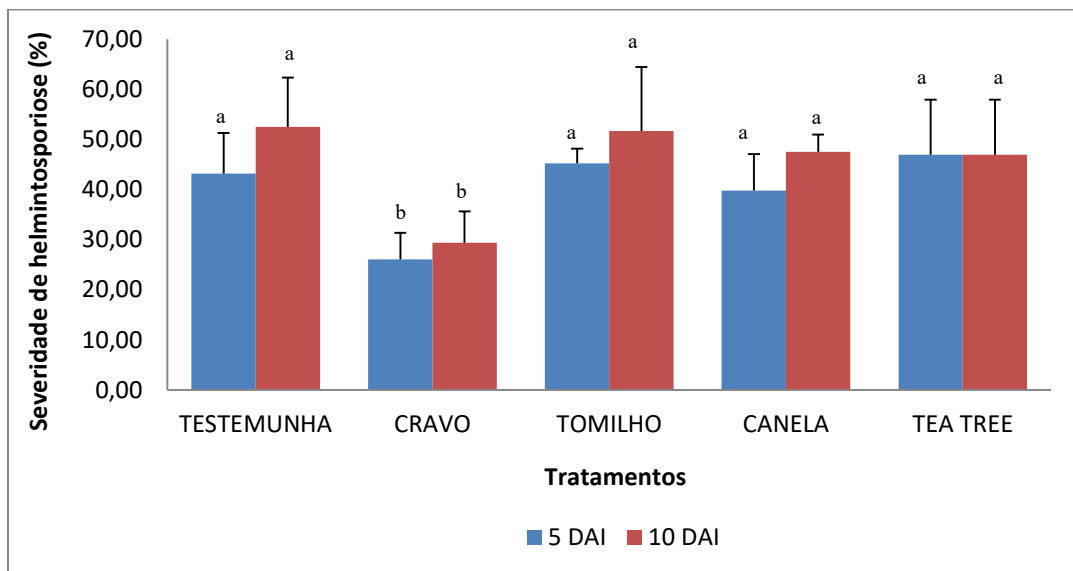


Figura 3. Severidade de *B. maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água, óleos essenciais de cravo, tomilho, canela e tea tree a 0,01%, 3 dias antes da inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). Médias seguidas por letras distintas, em um mesmo tempo de avaliação, diferem significativamente entre si (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

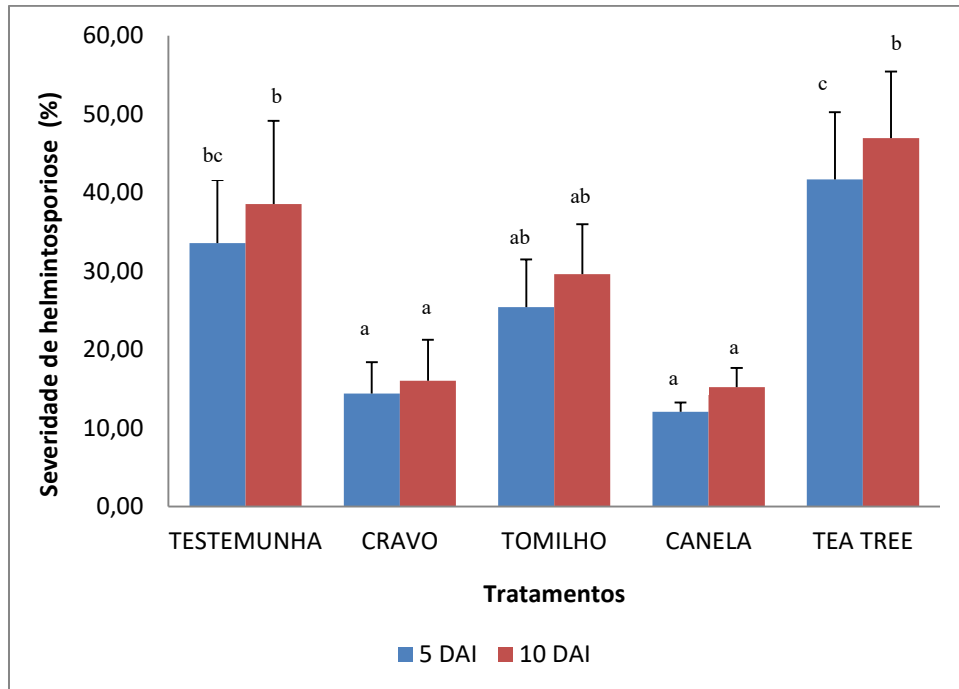


Figura 4. Severidade de *B. maydis* em plantas de milho da cultivar FORTUNA pulverizadas com água ou óleos essenciais de cravo, tomilho, canela e tea tree a 0,01%, 3 dias antes da inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios / mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). Médias seguidas por letras distintas, em um mesmo tempo de avaliação, diferem significativamente entre si (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### 5.3.3 Teste de germinação de conídios

Nesse experimento objetivou-se avaliar a interferência dos óleos essenciais de cravo e canela na germinação de conídios de *B. maydis*. Observaram-se as maiores médias de germinação de conídios nas folhas tratadas com OE. Além disso, traçando um paralelo entre o desempenho dos dois óleos, embora ambos tenham apresentado valores superiores aos observados na testemunha, o óleo de cravo apresentou médias de germinação de conídios e formação de apressórios de 6% e 10% inferiores, respectivamente, às observadas nas folhas em que foram aplicadas o óleo essencial de canela. Todavia, nesse experimento, foi perceptível que os óleos de cravo e canela não promoveram redução na germinação de conídios e nem impediram a formação de apressórios do fungo (Figura 5).

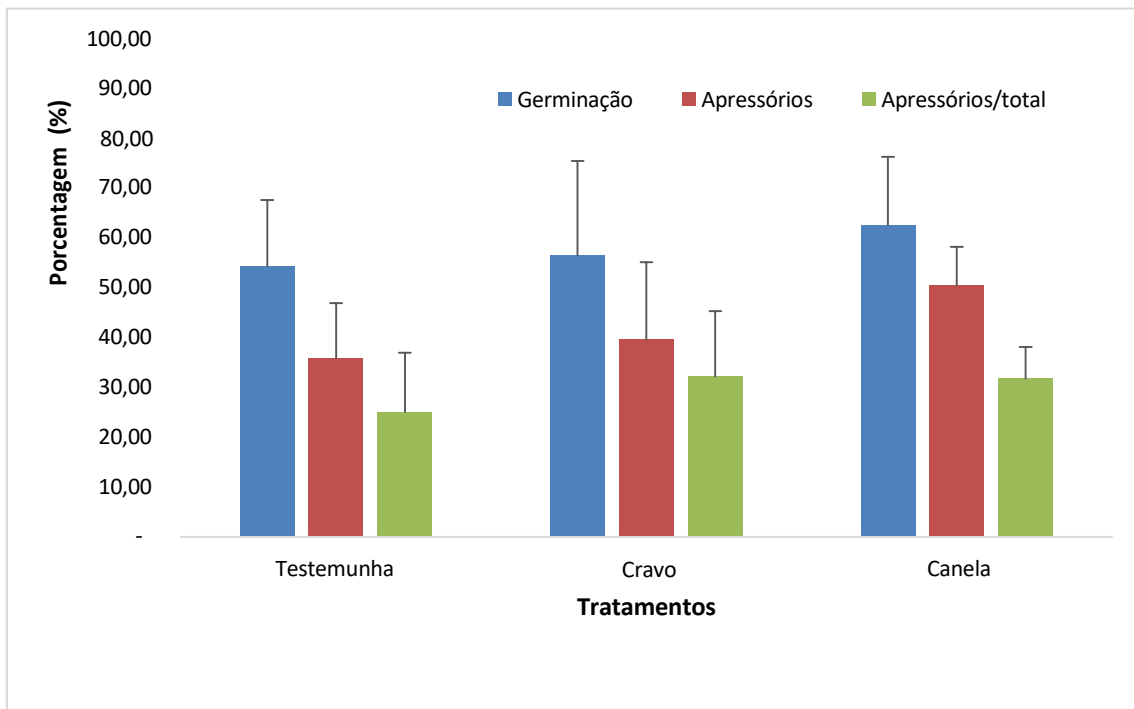


Figura 5. Porcentagem (%) dos conídios de *Bipolaris maydis* que germinaram em relação ao total (barra azul), % de formação de apressórios em relação aos conídios germinados (barra laranja) e % de formação de apressórios em relação ao total de conídios contados sobre folhas de milho. Análises realizadas 96 horas após a inoculação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

### 5.3.4 Atividade enzimática

Na ausência de inóculo, os óleos de cravo e canela não promoveram alteração na atividade enzimática de FAL, sendo tais níveis mantidos relativamente estáveis. Por outro lado, quando submetidas ao tratamento com óleo de cravo, as plantas de milho apresentaram aumento na atividade de FAL de 11%, apenas a partir do 6º dia após a inoculação (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade de Fenilalanina ammonia-liases em folhas de milho tratadas com óleos essenciais e inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL).

VALORES MÉDIOS DA FAL								
TRATAMENTOS	HORAS APÓS OS TRATAMENTOS				HORAS APÓS A INOCULAÇÃO			
	0	72	108	144	0	36	72	108
ÁGUA	1,70 ± 0,28a	1,61 ± 0,59a	1,10 ± 0,51a	0,53 ± 0,12a	1,70 ± 0,28a	1,70 ± 0,28a	1,80 ± 0,57a	1,63 ± 1,17a
CANELA	1,70 ± 0,28a	1,63 ± 1,17a	1,63 ± 0,81a	1,64 ± 1,13a	1,70 ± 0,28a	1,70 ± 0,28a	1,81 ± 1,31a	1,80 ± 0,57a
CRAVO	1,70 ± 0,28a	1,63 ± 1,17a	1,70 ± 0,28a	1,63 ± 0,81a	1,70 ± 0,28a	1,70 ± 0,28a	1,61 ± 0,59a	1,81 ± 1,31a

Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

#### 5.4 DISCUSSÃO

A doença provocada pelo fungo *B. maydis* em milho, devido ao seu alto potencial de danos, é considerada uma das doenças mais importantes dessa cultura (REIS et al., 2008). E, no enalço de encontrar medidas alternativas biologicamente viáveis, o presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito das emulsões de óleos essenciais de cravo e canela, por meio da possível ação dos seus compostos voláteis como potenciais antifúngicos e/ou atuantes como elicitores, estimulando a resposta de defesa das plantas de milho.

Os resultados encontrados nesse trabalho são confirmados com outros estudos nos quais os óleos essenciais têm sido aplicados com sucesso objetivando seu uso na agricultura como potenciais químicos naturais em substituição aos convencionais. Equitativamente, pesquisadores têm relatado o potencial desses óleos essenciais como fungicidas ou inibidores de diferentes microrganismos (FIGUEIREDO et al., 2021).

Nesse estudo, conforme foi realizado o experimento *in vitro*, utilizando a técnica por volatilização, foi possível observar, além de pequeno, um lento crescimento micelial de *B. maydis* nas placas em que estavam presentes os óleos essenciais de canela, tea tree, tomilho e



cravo a 0,2%. Tal resultado alcançado pode estar relacionado ao potencial antifúngico inerente a esses tratamentos no que tange à possibilidade desses óleos estarem atuando na quebra da parede celular ou membrana de determinados patógenos, demonstrando seu potencial antimicrobiano.

Além disso, nos experimentos *in vivo*, a concentração de óleos essenciais presentes nas emulsões foi inferior àquela utilizada *in vitro* devido ao resultado revelado em testes anteriores do presente estudo, em que foram utilizadas concentrações maiores (0,5% e 1%), as quais causaram fitotoxicidade nas plantas de milho. Dessa forma, com embasamento na literatura, a concentração padrão utilizada para os ensaios *in vivo* foi de 0,01%.

O óleo essencial de tomilho, por apresentar baixa toxicidade ao homem e ao ambiente e devido ao seu potencial antifúngico, pode ser utilizado no manejo de doenças de origem fúngica que incidem sobre plantas (SOKOVIĆ et al., 2009). Palfi et al. (2019) testaram diferentes óleos essenciais contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, e obtiveram efeito antifúngico mais eficaz com o óleo essencial de tomilho, o qual inibiu completamente os fungos nas concentrações de 7 e 15  $\mu\text{L} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$  de BDA, respectivamente. Além disso, óleo essencial de tomilho, na dosagem de 15  $\mu\text{l}$  em papel filtro autoclavado fixado na tampa superior da placa de Petri, inibiu a germinação micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA, com o percentual de escleródios que emitiram estipe em 11.67% e sendo nenhum apotécio emitido (SIEGA et al., 2020).

Em outro trabalho, o óleo essencial de tomilho foi testado sobre *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de cebola, em que o óleo essencial inibiu completamente o crescimento micelial do fungo e a germinação de esporos na concentração de 2.000 ppm (LOZADA, 2019). De modo similar, o óleo essencial de tea tree apresentou sua atividade fungicida *in vitro* sobre *C. gloeosporioides* (RAMOS et al., 2016).

Outrossim, Sousa et al. (2015) avaliaram *in vivo* o óleo essencial de tea tree no controle da cercosporiose (*Cercospora beticola*) em beterraba, no qual a eficácia foi obtida utilizando concentração de 1% do óleo essencial. Outro estudo que comprova a ação antifúngica do óleo essencial foi realizado por Martins et al. (2010), no qual os autores avaliaram o efeito do óleo essencial de tea tree sobre fungos fitopatogênicos e verificaram que o óleo essencial de tea tree *in vitro* causou redução do crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*.

No presente estudo, o óleo essencial de cravo e canela apresentaram considerável potencial de controle *in vitro* (90% e 92%, respectivamente), por outro lado esse potencial foi reduzido em 35% e 34% nos ensaios *in vivo*. Essa redução possivelmente pode estar atrelada

ao comportamento dos compostos voláteis presentes nesses óleos, tais como o eugenol e cinamaldeído que, numa escala macro, sob condições de temperatura, exposição ambiental, dentre outras condições normais de ausência de controle em casa de vegetação, podem ter se perdido ou deteriorado durante a pulverização desses tratamentos nas plantas.

Castro et al. (2017) realizaram um ensaio *in vivo* em que avaliou-se a ação direta do óleo essencial de cravo, bem como do eugenol e também da associação entre estes contra o fungo *Alternaria alternata* em frutos de pitáia (*Hylocereus undatus* Haw.). Tais ensaios indicaram que o óleo essencial integral e o eugenol promoveram redução significativa do crescimento fúngico, além de demonstrar uma interação sinérgica do cravo combinado ao eugenol, com destaque para o este último, em que houve um efetivo controle da doença. Além disso, Kalupahana et al. (2020) observaram controle eficaz para antracnose, com a inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum siamense* em 100% com o óleo essencial de cravo de 1 a 5 µL por placa de Petri. Utilizando a mesma técnica de avaliação do crescimento micelial *in vitro*, o óleo essencial de cravo teve efeito antifúngico contra *Cladosporium herbarum*, com inibição do crescimento micelial e taxa de crescimento micelial (TxCM) calculadas com inibição completa do fungo a partir da dose 12,8 µL (FIGUEIREDO et al., 2021).

Xin et al. (2012) investigaram a ação do óleo essencial de canela contra patógenos de pós-colheita, tais como *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium expansum* e avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, os autores afirmaram que o óleo essencial de canela tem bom potencial para ser utilizado como antifúngico natural para aplicações em frutas. No estudo, a inibição do crescimento micelial ficou em 0,64, 0,16 e 0,16%, respectivamente. O óleo essencial com concentrações de 2,0 e 3,0 % apresentou controle completo sobre o crescimento de fungos em frutas de laranja inoculadas. Do mesmo modo, nos experimentos realizados por Kulkarni et al. (2021), o óleo essencial de canela a 6 µL por placa, reduziu o crescimento micelial em 100% dos fungos *Colletotrichum musae* e *Lasiodiplodia theobromae*, agentes incitantes de doenças pós-colheita como a antracnose e a podridão da coroa em bananeiras. Na presente dissertação, o OE de canela também obteve ótimos resultados nos testes *in vitro* para o controle de *B. maydis* (90%), todavia, nos testes *in vivo*, tal resultado não apresentou resultados satisfatórios no controle do fitopatógeno comparado ao controle observado nos testes laboratoriais.

Nos estudos de Clerck et al. (2020), os pesquisadores enfatizaram que alguns óleos essenciais são mais específicos e ativos para um grupo de patógenos, enquanto outros, se comportam como generalistas e atuam sobre vários patógenos. Em seus experimentos, dentre

vários óleos essenciais testados, os autores citaram o óleo essencial de canela como generalista e rico em fenóis, fenilpropanoides, compostos organossulfurados e/ ou aldeídos.

Ja no trabalho de Hoyos et al. (2012) foi demonstrado que o potencial fungitóxico está relacionado à composição química do óleo essencial, bem como à sensibilidade do patógeno a um ou mais constituintes em diferentes quantidades. A sua atividade antifúngica foi analisada sobre microrganismos causadores de doenças em diferentes culturas de importância econômica: *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* e *Colletotrichum musae*.

A atividade biológica verificada nos óleos essenciais contra microrganismos, possivelmente é devido à presença de componentes químicos com atividades antimicrobianas. O eugenol presente no óleo essencial de cravo e associado a este, foram citados como antifúngicos eficazes para o controle de *Cladosporium spp.* e *A. alternata* (CASTRO et al., 2017).

Os compostos eugenol e timol, de forma similar, também se destacaram no controle da mancha foliar em maçã causada por *Colletotrichum fructicola* (SCHORR, 2018). O efeito fungicida dos componentes químicos – timol e carvacrol – também foi demonstrado no trabalho de Rahmouni et al. (2019) em que os componentes apresentaram ação fungicida eficaz contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* com CFM muito baixa a 0,94 e 2,08 mL.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, seguidos pelos compostos a-terpineol, linalol e borneol com CIM de 10, 13 e 26,67 mL.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já os compostos  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e acetato de mirtenila também mostraram propriedades fungicidas aos mesmos microrganismos testados, mas em altas concentrações variando de 20 a 80 mL.mL<sup>-1</sup>.

Pesquisadores (SACCHETTI et al., 2005; AIT-OUAZZOU et al., 2011) relataram que óleos essenciais contendo fenóis ou aldeídos, incluindo timol, eugenol, carvacrol e cinamaldeído como principais componentes exibem atividades antimicrobianas mais altas comparados aos óleos essenciais contendo terpenos ou álcoois. No presente estudo, não houve apontamento de efeito antifúngico isolado de componente químico presente nos óleos essenciais utilizados nos experimentos, todavia, o efeito inibitório de crescimento micelial e a redução de severidade de helmintosporiose (*B. maydis*) foram confirmadas.

Nos estudos de Thabet e Khalifa (2018), o óleo essencial de cravo *in vitro* exibiu efeito inibitório contra o crescimento micelial dos patógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium semitectum* e *Rhizoctonia solani*. O óleo essencial aplicado na concentração 4% apresentou ICM de 100% para *F. oxysporum* e *R. solani*. Nos ensaios *in vivo*, o óleo essencial proporcionou redução de incidência e severidade de podridão e murcha da raiz.

Além da interrupção do crescimento de fungos, os autores citam ainda, alterações nas características morfológicas, como má formação de conídios. No caso de *F. oxysporum*, o fungo teve o número de conídios reduzido, aumentando, porém, a produção de clamidósporos.

Considera-se que os óleos essenciais exerçam atividade antimicrobiana contra diversos alvos celulares de fitopatógenos (WU et al., 2019). Foram observadas, via microscopia eletrônica de varredura, alterações morfológicas em células do patógeno quando em contato com os OEs, superfícies irregulares, deterioração da morfologia da membrana celular, além da disfunção das mitocôndrias e síntese de proteínas, o que resultou em múltiplas fendas, culminando em ruptura e lise de uma célula (SAHU et al., 2018).

Traçando um comparativo entre os óleos de cravo e canela, enquanto o óleo de cravo tem como principal constituinte o eugenol em sua composição, possuindo ação antioxidante e antimicrobiana; o óleo essencial de canela contém linalol e cinamaldeído, compostos também conhecidos por sua ação antioxidante e antimicrobiana. Portanto, propriedades em comum em ambos os óleos que apresentaram desempenho favorável no controle contra *B. maydis*.

Na agricultura, os óleos essenciais foram testados com sucesso como técnica natural de controle de doenças para gerenciar o crescimento de fitopatógenos nocivos, sendo a área mais especial e importante para a aplicação dos óleos essenciais e seus constituintes a inibição do crescimento e redução de fitopatógenos (LÓPEZ et al., 2015). De forma semelhante, o trabalho de Agarwal et al (2001) demonstraram um forte controle do crescimento de insetos e grande atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, sem comprometer a qualidade do meio ambiente.

Acredita-se que a característica mais importante nos óleos essenciais seja a hidrofobicidade, uma vez que os OEs podem particionar a camada lipídica das membranas celulares como compostos hidrofóbicos. Tal ação perturba a membrana celular, tornando mais permeável, permitindo vazamento de íons e metabólitos, resultando em perda de viabilidade celular, podendo ser letal (por exemplo, membrana de células bacterianas) (SIVROPOULOU et al., 1996).

Sendo as microemulsões, um sistema de entrega de OEs, agindo como invólucro de tais compostos bioativos naturais a fim de aumentar a atividade, experimentos in vivo demonstraram a capacidade de várias espécies de óleos de oregano e tomilho para retardar e inibir o crescimento de bactérias patogênicas de várias plantas como a *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Axonopodis picovoltio*, *Xanthomonas vesicatoria* (VOKOU et al., 1993; SMITH et al., 1997; YLDIZ et al., 2001; SOYLU et al., 2003). Da mesma forma, resultados semelhantes foram

obtidos em outro estudo, onde foi possível observar um atraso do aparecimento de sintomas de cancro bacteriano no tomateiro (*Clavibacter michiganensis*) detectado em plantas tratadas com óleos de oregano e tomilho (DUETZ et al., 2003).

Foi possível pontuar no presente estudo a possível capacidade antioxidante dos óleos de cravo e canela, neutralizando a ação do fitopatógeno via possível interação com as camadas lipídicas celulares dos conídios de *B. maydis*, além de possivelmente afetar a integridade das células da membrana, causando o extravasamento do conteúdo, neutralizando dessa forma, a ação de *B. maydis* durante a infecção e colonização. Esse fato também foi observado por Medice et al. (2007), em soja pulverizada com óleo essencial de tomilho e inoculada com *Phakospora pachyrhizi*, e por Pereira et al. (2008), utilizando o mesmo óleo em plantas de café e inoculadas com *Cercospora coffeicola*.

E, apesar do efeito antifúngico dos óleos essenciais observados no presente estudo, nos testes *in vitro* e na redução da helmintosporiose nas plantas tratadas com os óleos de cravo e canela, foi possível perceber resultados conflitantes quando observou-se o possível efeito estimulante dos óleos na germinação de conídios de *B. maydis*, quando nas observações por microscopia. Nos relatos de French et al (1978) e Eckert e Ratnayake (1994), foi sugerido que diferentes misturas de compostos voláteis foram responsáveis pelo estímulo na germinação de esporos. De igual modo, Kavanagh e Wood (1971) descobriram que os conídios de *Penicillium digitatum* quando em contato com casca de laranja ferida, a germinação sobre a casca foi maior que 80%. Pesquisas revelaram que óleos de casca de várias espécies de citros e voláteis emitidos por laranjas danificadas foram relatados como responsáveis por estimular a germinação de *P. digitatum* (FRENCH et al., 1998; ECKERT et al., 1984).

A respeito do efeito dos compostos voláteis no estímulo da germinação de conídios, conforme o trabalho de Eckert e Ratnayake (1984), tais compostos podem apresentar tal efeito de forma coletiva e sinérgica, por outro lado, individualmente se tornam inativos. Como exemplo, as combinações de limoneno, acetaldeído, etanol e dióxido de carbono estimularam a germinação de esporos de *P. digitatum*, embora tais componentes individualmente não tenham apresentado efeito algum neste sentido.

Além do fator sinérgico, a concentração utilizada também é um possível parâmetro delimitador, o qual pode fazer do óleo essencial um agente inibidor ou estimulante na germinação de conídios. Neste sentido, Flores et al (2018) revelaram em seus resultados que a estimulação da germinação de esporos e crescimento de *P. italicum* pelos principais componentes voláteis foi dependente da concentração utilizada. Os compostos se mostraram

estimuladores em concentrações mais baixas, mas fortemente inibitórias em concentrações mais altas.

Outro fato a ser pontuado é a respeito do ambiente em que ocorre o confronto patógeno/óleo: os voláteis presentes nos óleos de cravo e canela reduziram a severidade da helmintosporiose em casa de vegetação, mas em laboratório, estimularam a germinação de conídios. Em um experimento em que conídios de *P. digitatum* foram colocados em meio agar-água na superfície de laranjas intactas, estes não germinaram, mas quando em contato com cascas de laranjas feridas, tal fator ativou germinação (KAVANAGH e WOOD., 1971).

Tendo em vista o que foi observado nos experimentos realizados no presente estudo, podemos analisar e comparar o efeito inibitório dos óleos de cravo e canela, *in vitro* e *in vivo*, em que seus voláteis, quando sujeitos a uma escala macro, no confronto com *B. maydis* apresentaram redução da severidade, todavia em índices menores quando comparado com os resultados *in vitro*. Tal resultado pode estar relacionado à característica inerente aos óleos, devido à sua volatilidade, podendo ter se perdido durante a pulverização nas plantas de milho ou mesmo se deteriorado sob condições de temperatura e exposição ao ambiente, raios UV, isto é, ausência de controle, fato comumente relacionado aos experimentos *in vivo*.

Considerando os resultados relacionados à atividade de FAL, não houve aumento na atividade da enzima em plantas pulverizadas com óleos essenciais. Esse resultado nos revela que os óleos que reduziram a severidade da doença, cravo e canela, controlaram o fungo de forma direta.

## 6. CONCLUSÃO

As emulsões de óleos essenciais de cravo e canela apresentaram potencial antifúngico direto no confronto com *B. maydis* em plantas de milho, tornando-se uma alternativa biologicamente viável no controle do fitopatógeno.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., SAHI, C., GALLIE, D. R., & GROVER, A. *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. **Cell stress & chaperones**, v. 6, n. 3, p. 219, 2001.
- AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORÁN, S.; ROTA, C.; PAGÁN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 320-329, 2011.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.
- AMORATI, R., FOTI, M. C., VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.
- AYANA, G. T., ALI, S., SIDHU, J. S., GONZALEZ HERNANDEZ, J. L., TURNIPSEED, B., & SEHGAL, S. K. Genome-wide association study for spot blotch resistance in hard winter wheat. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 926, 2018.
- BANERJEE, S., PANDA, C. K., & DAS, S. Clove (*Syzygium aromaticum*), a potential chemopreventive agent for lung cancer. **Carcinogenesis**, v.77, n.8, p.1645-54, 2006.
- BANERJEE, S.; DAS, S. Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.6, p.304- 8, 2005.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CASTRO, J.C.; ENDO, E.H.; SOUZA, M.R.; ZANQUETA, E.B.; POLONIO, J.C.; PAMPHILE, J.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FILHO, B.A.A. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101-109, 2017.
- CUNHA, R.C., ESPÍNDOLA, C.J. A dinâmica geoeconômica recente da cadeia produtiva da soja no Brasil e no mundo. **GeoTextos**, 2015.
- DE CLERCK, C.; MASO, S.D.; PARISI, O.; DRESEN, F.; ZHIRI, A.; JIJAKLI, M.H. Screening of antifungal and antibacterial activity of commercial essential oils against pathogens of agronomical importance. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2020.
- DEVI, H. M.; MAHAPATRA, S.; DAS, S. Assessment of yield loss of wheat caused by spot blotch using regression model. **Indian Phytopathology**, v. 71, n.1, p. 291–

294, 2018.

DUETZ, W.A., BOUWMEESTER, H., VAN BEILEN, J.B., WITHOLT, B..  
Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Microbiol Biotechnol**, v.61, p. 269-277, 2003.

ECKERT, J.W.; RATNAYAKE, M. Role of volate compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. **Phytopathology**, Lancaster, v.87, n.7, p. 746-750, 1994.

FARIA, T.J.; FERREIRA, R.S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.P.; ISHIKAWA, N.K.; BARBOSA, A.M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Braz. arch. biol. technol**, v. 49, n.6,p. 867-871, 2006.

FIGUEIREDO, A.R.; SILVA, L.R.; MORAIS, L.A.S. Sensibilidade do *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro a óleos essenciais. **Revista Desafios**, v. 08, n. 2, p. 19-30, 2021.

FLORES, J. B., GARCÍA, J. O., BECHELENI, F. R. C., ESPINOZA, A. V., WONG-CORRAL, F. J., & RUEDA-PUENTE, E. O. Effect of essential oils in the control of the *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants. **Biotecnia**, v. 20, n. 3, p. 96-101, 2018.

FRENCH, R.C.; GALE, A.W.; GRAHAM, C.L.; SCHMITT, C.G.; MARCHETTI, M.A.; RINES, H.W.; Factores affecting chemical stimulation of uredinospore germination in pustules of crown rust of oats, common corn rust, stem rust of wheat and leaf ruat of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, p 4-8, 1975.

FONSECA, M.C.M., LEHNER, M.S., GONÇALVES, M.G., PAULA JÚNIOR, T.J., 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**, n.1, v. 17, p. 45-50, 2015.

FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N.C., LADEIRA, J. A. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (GuérinMèneville)(Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 329-334, 2002.

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

GOÑI, P., LÓPEZ, P., SÁNCHEZ, C., GÓMEZ-LUS, R., BECERRIL, R., & NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

GULTYAEVA, E. I., KOVALENKO, N. M.; SHAMANIN, V. P.; TYUNIN, V. A.; SHREYDER, E. R.; SHAYDAYUK, E. L.; et al. Population structure of leaf



pathogens of common spring wheat in the West Asian regions of Russia and North Kazakhstan in 2017. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*, v. 22, n. 3, p. 363–369, 2018.

GUPTA, P. K.; CHAND, R.; VASISTHA, N. K.; PANDEY, S. P.; KUMAR, U.; MISHRA, V. K.; JOSHI, A. K. Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. *Plant Pathology*, v. 67, n. 3, p. 508–531, 2018a.

GUPTA, P. K.; VASISTHA, N. K.; AGGARWAL, R.; JOSHI, A. K. Biology of *B. sorokiniana* (syn. *Cochliobolus sativus*) in genomics era. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 123–138, 2018b.

HOYOS, J.M.Á.; ALVES, E.; ROZWALKA, L.C.; SOUZA, E.A.; ZEVIANI, W.M. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 36, p. 270-284, 2012.

IMEA – Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária; Acompanhamento da safra mato-grossense de milho, Levantamento de produtividade, 2022.

KALUPAHANA, K.I.M.; KURUPPU, M.; DISSANAYAKE, P.K. Effect of essential oils and GRAS compounds on postharvest disease control in mango (*Mangifera indica* L. cv Tom EJC). *The Journal of Agricultural Sciences*, v. 15, p. 207-221, 2020.

KAVANAGH, J. A.; WOOD, R. K. S. Green mould of oranges caused by *Penicillium digitatum* Sacc.; effect of additives on spore germination and infection. *Annals of Applied Biology*, v. 67, n. 1, p. 35-44, 1971.

KOKETSU, M., GONÇALVES, S. L., GODOY, R. L. D. O., LOPES, D., & MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. *Food Science and Technology*, v. 17, p. 281-285, 1997.

KULKARNI, S.A.; SELLAMUTHU, P.S.; ANITHA, D.P.M.; MADHAVAN, T. In vitro and in silico evaluation of antifungal activity of cassia (*Cinnamomum cassia*) and holy basil (*Ocimum tenuiflorum*) essential oils for the control of anthracnose and crown- rot postharvest diseases of banana fruits. *Chemical Papers*, v. 75, n. 5, p. 2043-2057, 2021.

LEMOES, J.A.; PASSOS, X.S.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, J.R., FERRI, P.H.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, A.A.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 55-58, 2005.

LÓPEZ-MENESES, A.K.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; LIZARDI-MENDOZA, J.; ROSAS-BURGOS, E.C.; LUQUE-ALCARAZ, A.G.; CORTEZ-ROCHA, M.O. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. *Food Science and Technology*, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.**

Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOZADA, M.I.O.; SILVA, P.P.; PEREIRA, R.B.; NASCIMENTO, W.M. Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. cepae in onion seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, n. 3, 2019.

MARTINS, J.A.S.; SAGATA, E.; SANTOS, V.A.; JULIATTI, F.C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 49-51, jan./feb. 2010.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO JÚNIOR, R.G.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v.31, n.1, p. 83-90, 2007.

NZEAKO, B.C.; LAWATI, B.A. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.11, p.1612-19, 2008.

OLIVEIRA, F. P. D., LIMA, E. D. O., SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. D., SOUZA, E. L. D., SANTOS, B. H. C., & BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical materials. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.510-6, 2006.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the nonpathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.2, p.195-197, 2010.

OOTANI, M. A., AGUIAR, R. W., RAMOS, A. C. C., BRITO, D. R., SILVA, J. B. D., & CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PAHLOW, M. Das grosse buch der heilpflanzen: gesund durch die heilkräfte der natur. Slovka: Weltbild Verlag, 2004. 526p.

PALFI, M.; Konjevoda, P.; Vrandečić, K.; Čosić, J. Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Bortyitis cinerea*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 31, n. 7, p. 544-554, 2019.

PAOLI, S. D., GIANI, T. S., PRESTA, G. A., PEREIRA, M. O., FONSECA, A. D. S. D., BRANDÃO-NETO, J., ... & 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.175-82, 2007.

PARK, M. J., GWAK, K. S., YANG, I., CHOI, W. S., JO, H. J., CHANG, J. W., ... & CHOI, I. G. Antifungal activities of the essential oil in *Syzygium aromaticum* and *Leptosmum petersonii* bailey and their constituents against various dermatophytes. **The Journal of Microbiology**, v.45, n.5, p.460-5, 2007.

PEREIRA, A. C. R. L., OLIVEIRA, J. V. D., GONDIM JUNIOR, M. G. C., & CÂMARA, C. A. G. D. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775)(Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 717-724, 2008.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotecnológica**, p. 731-733, 2006.

PEREIRA, R.B. *Óleos essenciais no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro*. 2008. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PEREIRA, R.S., SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev. Saúde Pública**, v.2, n. 38, p.326-328, 2004.

PEREIRA, A. C. R. L., OLIVEIRA, J. V. D., GONDIM JUNIOR, M. G. C., & CÂMARA, C. A. G. D. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775)(Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 717-724, 2008.

RAHMOUNI, A.; SAIDI, R. KHADDOR, M.; PINTO, E.; SILVA, J.C.G.E.E.; MAOUNI, A. Chemical composition and antifungal activity of five essential oils and their major components against *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis of Moroccan palm tree. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, v. 4, n. 27, p. 1-9, 2019.

RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 2, p. 605-612, 2016.

REIS JUNIOR, F. B. D., MACHADO, C. T. D. T., MACHADO, A. T., & SODEK, L. . Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SAHU, P. K., RAMISETTI, N. R., CECCHI, T., SWAIN, S., PATRO, C. S., & PANDA, J.. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 590-611, 2018.

SANTURIO, J. M., SANTURIO, D. F., POZZATTI, P., MORAES, C., FRANCHIN, P. R., & ALVES, S. H.. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SASSE, S. *Caracterização de variedades locais de milho provenientes de Anchieta-SC quanto à resistência a *Exserohilum turcicum**. 2008. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

SCHAUFFLER, G. P., DOS ANJOS VERZUTTI FONSECA, J., & DI PIERO, R. M. Defense mechanisms involved in the resistance of maize cultivars to *Bipolaris maydis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 2, p. 269-277, 2022.

SIEGA, T.C.; BERNARDI, C.; REY, M.S.; JUNIOR, A.W.; PIETROBOM, J.H.; MAZARO, S.M. Controle da germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary com óleos essenciais provenientes de espécies vegetais. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, 2020.

SILVA, E. O. *Termoterapia e óleos essenciais no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* em sementes de tomate*. 2018. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp, Botucatu, São Paulo.

SILVA, J. A., OLIVEIRA, F. F., GUEDES, E. S., BITTENCOURT, M. A. L., & OLIVEIRA, R. A. Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 700-706, 2014.

SIVROPOULOU, A., PAPANIKOLAOU, E., NIKOLAOU, C., KOKKINI, S., LANARAS, T., & ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

SMITH, M. D., NAVILLIAT, P. L. A new protocol for antimicrobial testing of oils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 28, n. 1, p. 21-24, 1997.

SOKOVIĆ, M.D.; GLAMOČLIJA, J.M.; ĆIRIĆ, A.D. Natural products from plants and fungi as fungicides. In: Nita, M. Fungicides - showcases of integrated plant disease management from around the world. ed. United Kingdom (UK): InTechOpen Limited, 2013.

SOUSA, J.P.; OLIVEIRA, K.Á.R.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SOUZA, E.L. Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity, and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 2, p. 424-429, 2015.

SOYLU, S., BAYSAL, Ö., & SOYLU, E. M. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola, the causal agent of halo blight of bean. **Ovidius Univ. Ann. Med. Sci. Pharm**, v. 1, p. 40-44, 2003.

STADNIK, M. J. ; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2000.

SULTANA, S., SATYANARAYANA, A. N. V. Assessment of urbanisation and urban heat island intensities using landsat imageries during over a sub-tropical Indian City. **Sustainable Cities and Society**, v. 52, p. 101-846, 2018.

TALAMINI, V., STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V.(Eds). Manejo ecologico de doenças de plantas. Editora UFSC, 2004.

THABET, M.; KHALIFA, W. Antifungal activities of clove oil against root rot and wilt pathogens of tomato plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 18, n. 3, p. 105-114, 2018.

VIGO-SCHULTZ, S. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n 4, p. 515-524, 2006.

VOKOU, D.; VARELTZIDOU, S.; KATINAKIS, P. Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 47, n. 3, p. 223-235, 1993.

WU, K., SU, D., LIU, J., SAHA, R., & WANG, J. P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. **Nanotechnology**, v. 30, n. 50, p. 502003, 2019.

XIN, Z.; YU, Z.; ERB, M.; TURLINGS, T.C.; WANG, B.; QI, J.; LIU, S.; LOU, Y. The broadleaf herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. **The New Phytologist**, v. 194, n. 2, p. 498-510, 2012.

YILDIZ, N.; AYSAN, Y.; ÇINAR, Ö. Domates gövde nekrozu etmenleri. **Pseudomonas viridiflava, Erwinia chrysanthemi**, p. 63-72, 2001.