

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM BENTO GONÇALVES
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

DOUGLAS SOLIGO FRACASSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE
*Ceratocystis fimbriata***

BENTO GONÇALVES

2019

DOUGLAS SOLIGO FRACASSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE
*Ceratocystis fimbriata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Tramontina

BENTO GONÇALVES

2019

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

F797a Fracasso, Douglas Soligo

Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no controle de *Ceratocystis fimbriata*/ Douglas Soligo Fracasso – Bento Gonçalves, 2019.

44 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2019.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Francine Fioravanso Tramontina

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Tramontina

1. Extratos Vegetais. 2. Fitopatógenos. 3. Quivizeiro. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) I. Tramontina, Francine Fioravanso. II. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2019. III. Título.

DOUGLAS SOLIGO FRACASSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE
*Ceratocystis fimbriata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Tramontina

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Christa Korzenowski
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Profa. Ma. Daiana Maffessoni
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Profa. Ma. Marlene Guevara dos Santos
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

AGRADECIMENTOS

A Deus por Tudo.

A Jesus Cristo por mostrar o Caminho.

Ao meu pai Ademar, minha mãe Eleovania e minha irmã Débora, pelo apoio em todos os momentos. Sem vocês não teria conseguido.

À professora Dra. Francine Fioravanso Tramontina pela orientação.

À professora Dra. Ana Carolina Tramontina pela coorientação.

Aos pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA – Uva e Vinho, Me. Andre Carlos Cau dos Santos e Dr. Lucas da Ressurreição Garrido pelo auxílio no processo de doação de cepas fúngicas para a realização deste trabalho.

À Banca Avaliadora.

Aos colegas Larissa, Mateus e Airton, por todos esses anos de companheirismo.

Aos professores, funcionários e colegas da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – Unidade em Bento Gonçalves.

Aos amigos e familiares.

“Pois, que adianta ao homem ganhar o mundo inteiro e perder a sua alma?”

(Marcos 8:36)

RESUMO

O quivezeiro é originário da China, mas foi na Nova Zelândia que no século XIX sofreu seleções e melhoramentos para dar origem às diversas variedades cultivadas atualmente. As primeiras sementes chegaram ao Brasil em 1971 e o cultivo no Rio Grande do Sul iniciou-se no começo da década de 1980. O surgimento de quivezeiros infectados pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* vem causando consideráveis perdas na produção do quivi. O fitopatógeno causa a doença conhecida como Murcha do quivezeiro, cujos sintomas incluem murcha da copa, escurecimento do lenho devido ao apodrecimento, frutos menores e presença de estrias amarronzadas em ramos, troncos e raízes. Não há produtos que comprovadamente eliminem o fungo do quivezeiro. Extratos vegetais vêm sendo estudados quanto ao seu potencial em inibir o desenvolvimento de doenças e pragas, surgindo como alternativa no controle de fitopatologias. Devido à importância do quivezeiro para a economia e diversificação agrícola, este estudo tem como objetivo geral avaliar, *in vitro*, o potencial fungitóxico de diferentes extratos vegetais sobre o fungo *Ceratocystis fimbriata*. Extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), arruda (*Ruta graveolens*), canela-da-China (*Cinnamomum aromaticum*), campim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) e cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) foram utilizados em diferentes concentrações para avaliar seu potencial fungitóxico sobre *Ceratocystis fimbriata*. Também foram testadas diferentes concentrações de etanol, iguais às presentes nos extratos vegetais, com o intuito de avaliar se os possíveis efeitos apresentados pelos extratos foram devidos aos compostos extraídos ou ao etanol. Além disso, foi avaliada uma metodologia alternativa para inoculação de fungos em placas de Petri, utilizando discos de papel-filtro imersos em solução micelial em vez de discos de micélio-ágar comumente empregados. Os extratos vegetais apresentaram diferentes graus de fungitoxidade sobre *Ceratocystis fimbriata*. Todos os extratos vegetais apresentaram algum nível de fungitoxidade, sendo que os extratos brutos de canela-da-China e cravo-da-Índia inibiram totalmente o fitopatógeno durante os 10 dias de realização dos testes, indicando potencial para futuros estudos *in vivo*. A nova metodologia, proposta para inoculação dos fungos, mostrou-se efetiva.

Palavras-chave: quivezeiro; *Ceratocystis fimbriata*; extratos vegetais; controle; fitopatógenos; fungitoxidade.

ABSTRACT

The kiwi tree is originally from China, but it was in New Zealand that in the nineteenth century underwent selections and improvements to give rise to the various varieties cultivated today. The first seeds arrived in Brazil in 1971 and cultivation in Rio Grande do Sul began in the early 1980s. The emergence of kiwifruit infected with the *Ceratocystis fimbriata* fungus has caused considerable losses in kiwi production. Phytopathogen causes the disease known as Kiwi wilt, whose symptoms include crown wilt, wood browning due to decay, smaller fruit, and the presence of brown striae on branches, trunks and roots. There are no products that have been proven to eliminate kiwi fruit fungus. Plant extracts have been studied for their potential to inhibit the development of diseases and pests, emerging as an alternative in the control of plant pathologies. Due to the importance of the kiwi tree for the economy and agricultural diversification, this study aims to evaluate, *in vitro*, the fungitoxic potential of different plant extracts on the fungus *Ceratocystis fimbriata*. Ethanol extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), garlic (*Allium sativum*), rue (*Ruta graveolens*), Chinese cinnamon (*Cinnamomum aromaticum*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and clove (*Syzygium aromaticum*) at different concentrations to evaluate its fungitoxic potential on *Ceratocystis fimbriata*. Different concentrations of ethanol, similar to those present in plant extracts, were also tested in order to evaluate if the possible effects presented by the extracts were due to the extracted compounds or ethanol. In addition, an alternative methodology for fungal inoculation in Petri dishes was evaluated using filter paper discs immersed in mycelial solution instead of commonly used mycelium agar discs. Plant extracts presented different degrees of fungitoxicity on *Ceratocystis fimbriata*. All plant extracts showed some level of fungitoxicity, and crude extracts of Chinese cinnamon and clove totally inhibited the phytopathogen during the 10 days of the tests, indicating potential for future *in vivo* studies. The new methodology, proposed for fungal inoculation, proved effective.

Keywords: kiwi; *Ceratocystis fimbriata*; vegetable extracts; control; phytopathogen; fungitoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia e sintomatologia de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	19
Figura 2 – Representação do material vegetal utilizado na preparação dos extratos	23
Figura 3 – Material para inoculação e placa inoculada.....	26
Figura 4 – Comparação de metodologias para inoculação do fungo.....	28
Figura 5 – Placa contendo EB de canela-da-China.....	33
Figura 6 – Placa contendo EB de cravo-da-Índia.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de alecrim.....	29
Gráfico 2 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de alho.....	30
Gráfico 3 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de arruda.....	31
Gráfico 4 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de canela-da-China	32
Gráfico 5 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de capim-cidreira.	34
Gráfico 6 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de cravo-da-Índia	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Bactérias, fungos e pragas causadores de danos ao quivizeiro.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Material vegetal utilizado no preparo dos extratos etanólicos.....	24
Tabela 2 – Preparo das soluções.....	24
Tabela 3 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC).....	29
Tabela 4 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC).....	31
Tabela 5 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC).....	32
Tabela 6 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RS	Rio Grande do Sul
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
mL	Mililitro
° GL	Grau Gay Lussac
g	Gramma
EB	Extrato vegetal bruto
E50	50% de extrato vegetal
E25	25% de extrato vegetal
E10	10% de extrato vegetal
E5	5% de extrato vegetal
AP	Álcool puro (álcool etílico 96°GL)
A50	50% de álcool etílico
A25	25% de álcool etílico
A10	10% de álcool etílico
A5	5% de álcool etílico
UV	Ultravioleta
BDA	Batata-dextrose-ágar
L	Litro
°C	Grau Celsius
atm	Atmosfera
min	Minuto
mm	Milímetro
µL	Microlitro
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
PIC	Porcentagem de inibição do crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	QUIVIZEIRO.....	17
3.1.1	Doenças do quivizeiro.....	17
3.1.1.1	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	18
3.2.1	Alecrim.....	20
3.2.2	Alho.....	20
3.2.3	Arruda.....	21
3.2.4	Canela-da-China.....	21
3.2.5	Capim-cidreira.....	21
3.2.6	Cravo-da-Índia.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.2	OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO.....	23
4.3	OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS.....	23
4.4	PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS ESPÉCIES VEGETAIS	24
4.4.5	Preparo das diluições do extrato bruto e álcool etílico.....	24
4.5	PREPARO DAS PLACAS PARA OS TESTES.....	25
4.6	AVALIAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE COLÔNIAS FÚNGICAS PARA INOCULAÇÃO.....	25
4.7	INOCULAÇÃO DO FUNGO.....	26
4.8	REPIQUE E MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	26
4.9	MEDIÇÃO DAS COLÔNIAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
5.1	POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE ALECRIM SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Ceratocystis fimbriata</i>	29
5.3	POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE ARRUDA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Ceratocystis fimbriata</i>	30
5.4	POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CANELA-DA-	

CHINA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Ceratocystis fimbriata</i>	31
5.5 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CAPIM- CIDREIRA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Ceratocystis</i> <i>fimbriata</i>	33
5.6 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CRAVO-DA- ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Ceratocystis fimbriata</i> ..	34
6 CONCLUSÕES.....	37
7 PERSPECTIVAS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O quivizeiro tem como origem as regiões úmidas e de elevadas altitudes pertencentes ao Vale do Rio Yang-Tsé, na China, onde era conhecido como minoutao (pêssego de macaco). No século XIX, suas sementes foram levadas para a Europa, Estados Unidos e Nova Zelândia, ocorrendo, neste último país, seleções e melhoramentos, originando diversas variedades que são cultivadas atualmente. Os frutos passaram a ser chamados de kiwi (no Brasil, kiwi ou quivi) devido às suas semelhanças com a ave, de mesmo nome, símbolo da Nova Zelândia (SILVEIRA *et al*, 2012).

As primeiras sementes, provenientes da França, chegaram ao Brasil em 1971 por meio do Instituto Agronômico de Campinas. No Rio Grande do Sul, o cultivo iniciou-se no começo da década de 1980, tendo rápida expansão na Serra Gaúcha, principalmente no município de Farroupilha (SILVEIRA *et al*, 2015).

Em 2009, aproximadamente, começaram a aparecer frutos de tamanho reduzido, escurecimento no lenho, murcha e morte das plantas. Para investigar o motivo dessa ocorrência, pesquisadores da EMBRAPA Uva e Vinho coletaram amostras de quivizeiros localizados em Farroupilha. Após análises, foi detectada a presença do fungo *Ceratocystis fimbriata*. Em nenhum outro país além do Brasil foi relatada a infecção de quivizeiros por tal patógeno. Não há produtos ou práticas comprovadas para curar as plantas infectadas (SILVEIRA *et al*, 2015; SÔNEGO *et al*, 2010).

Problemas fitossanitários, causados principalmente por *Ceratocystis fimbriata*, estão afetando a produção de quivi na Serra Gaúcha, acarretando consideráveis perdas. Na safra 2016/2017 foram produzidas 5,25 mil toneladas do fruto, já em 2017/2018 foram 1,25 mil toneladas do fruto (PALUDO, 2019; ZANELLA, 2014).

A quivicultura apresenta potencial mercadológico, já que cerca de 70% do quivi consumido no Brasil é produto de importação, o que é prejudicial à economia nacional. Com uma melhor exploração das condições edafoclimáticas dos estados sulistas, propícias à produção do fruto, a demanda interna dos consumidores seria suprida e o montante empregado na importação movimentaria a economia brasileira (SILVEIRA *et al*, 2015).

Em razão da colheita se dar em período entressafra de culturas com maior tradição na Serra Gaúcha, o cultivo do quivi apresenta-se como uma alternativa

conveniente à diversificação dos produtos agrícolas, possibilitando incremento na renda familiar. Aliado a isso, pode-se citar a rusticidade do quivizeiro, sendo pouco exigente em relação a tratamentos fitossanitários e o elevado teor de nutrientes presentes nos frutos (SILVEIRA *et al*, 2012).

Diversos estudos envolvendo extratos vegetais apontam a eficiência destes em inibir o desenvolvimento de fungos fitopatógenos por fungitoxidade ou por indução de fitoalexinas. Isso demonstra seu grande potencial de aplicação no controle alternativo de doenças e pragas de plantas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

Pegorini *et al* (2019) avaliaram os efeitos *in vitro* e *in vivo* dos extratos pirolenhoso e pimenta, dos óleos essenciais de capim-limão e funcho além do fungicida fosetyl-AI, no controle de *Ceratocystis fimbriata*. Concluíram que, *in vitro*, os óleos essenciais de capim-limão e funcho e o extrato de pimenta inibiram o crescimento do fungo, porém nos testes *in vivo* nenhum tratamento apresentou resultado satisfatório.

Tessaro *et al* (2017) realizaram teste *in vitro* utilizando óleo essencial de funcho para controlar o crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata*, obtendo resultados que demonstraram controle do fungo.

Ao testarem diversas concentrações de óleos essenciais para controle de *Ceratocystis fimbriata* em ensaios *in vitro*, Andreis *et al* (2017) concluíram que o óleo essencial de ho-sho não apresentou inibição no crescimento do fungo. O óleos essenciais de funcho e capim-limão demonstraram fungitoxidade.

Em virtude do potencial que a quivicultura representa para o agronegócio, faz-se necessário buscar produtos que inibam completamente o desenvolvimento do fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial fungitóxico de diferentes extratos vegetais sobre o fungo *Ceratocystis fimbriata*, causador da Murcha do quivizeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia alternativa para inoculação homogênea de *Ceratocystis fimbriata* e que permita a economia de reagentes.
- Elaborar um produto que possa ser facilmente obtido, sem a necessidade de equipamentos específicos, e que possua potencial para inibir completamente o fungo *Ceratocystis fimbriata*.
- Avaliar o efeito *in vitro* de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), arruda (*Ruta graveolens*), canela-da-China (*Cinnamomum aromaticum*), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) e cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), obtidos por extração alcoólica, no crescimento da colônia do fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata*.
- Identificar quais espécies vegetais possuem maior potencial de inibição do fitopatógeno em questão.
- Determinar, quando houver efeito inibitório, a concentração mais eficiente de cada extrato avaliado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 QUIVIZEIRO

Planta perene arbustiva e sarmentosa, pertencente à família *Actinidiaceae* e gênero *Actinidia*. Sua altura varia de acordo com o sistema de condução, podendo apresentar ramos que atingem 6 metros de comprimento (ANTUNES *et al*, 2008; HEIFFIG *et al*, 2005)

Apresenta folhas verdes, caducas, simples e alternas, com pecíolo recoberto por pelos. Possuem tamanho e forma variadas, são ásperas e têm pelos em sua face inferior (ANTUNES *et al*, 2008; HEIFFIG *et al*, 2005).

As flores, de pétalas amarelas, brancas ou rosadas, apresentam os dois sexos concomitantes, sendo um deles estéril. Assim, em plantas masculinas há inúmeros estames com produção de pólen pelas anteras, enquanto o pistilo não é funcional. Nas plantas femininas, os vários estigmas presentes são viáveis ao mesmo tempo em que o pólen produzido é infértil. Apesar do dioicismo, pode ocorrer autopolinização com formação de frutos (ANTUNES *et al*, 2008; SILVEIRA *et al*, 2012).

Os frutos de quivi, bagas, possuem características como sabor e forma variáveis de acordo com a variedade. Apresentam pequenos pelos em sua casca e suas centenas de sementes são dispostas radialmente no interior do fruto. Sua maturação ocorre mesmo após a colheita (fruto não-climatérico). As cultivares *Actinidia deliciosa* possuem frutos com pelos rígidos e longos em sua epiderme, enquanto em cultivares *Actinidia chinensis* a é polpa amarela e a epiderme é lisa (ANTUNES *et al*, 2008; HEIFFIG *et al*, 2005; SILVEIRA *et al*, 2012).

3.1.1 Doenças do quivizeiro

Diversos fungos, bactérias e pragas atuam como agentes que atacam quivizeiros causando danos à planta, podendo levá-la à morte (ANTUNES *et al*, 2008). É fundamental adotar práticas preventivas que visem a minimização da incidência de doenças e pragas. O controle destas inclui a utilização de medidas de proteção, regulação, erradicação, bem como o uso de produtos alternativos (SILVEIRA *et al*, 2012).

Alguns agentes que causam o declínio do quiveiro são relacionados no Quadro 1.

Quadro 1 – Bactérias, fungos e pragas causadores de danos ao quiveiro

Agente	Nome científico
Bactéria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Praga	<i>Ceratitidis capitata</i>
Fungo	<i>Rhizoctonia solani</i>
Praga	<i>Aphis citricola</i>
Bactéria	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
Fungo	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Fungo	<i>Armillaria mellea</i>
Fungo	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Praga	<i>Empoasca vitis</i>
Fungo	<i>Rosellinia necatrix</i>
Praga	<i>Paraulaca dives</i>
Fungo	<i>Botrytis cinerea</i>
Fungo	<i>Ceratocystis fimbriata</i>

Fonte: Adaptado de Antunes (2008) e Silveira *et al* (2012)

3.1.1.1 *Ceratocystis fimbriata*

Fungo fitopatogénico causador de crancos, murchas e secas em diversas espécies de plantas como eucalipto, acácia negra, chuva de ouro, cacaueteiro, seringueira, figueira, mangueira, quiveiro, entre outras (BERGAMIN; KIMATI; AMORIN, 1995; KIMATI *et al*, 2005; SILVEIRA *et al*, 2012).

Possui ascoma em forma de pera (peritécio) com coloração escura, apresenta rostro longo com uma abertura (ostíolo) na extremidade, para liberação de ascósporos. Seus esporos sexuados são unicelulares e translúcidos, já seus esporos assexuados são hialinos e cilíndricos (Figura1-A). Seu anamorfo pertence ao género *Thielaviopsis* (BERGAMIN; KIMATI; AMORIN, 1995; KIMATI *et al*, 2005).

O *Ceratocystis fimbriata* exala substâncias voláteis, de odor frutado, o que atrai insetos que servem como vetores, permitindo sua disseminação por longas distâncias. Também pode ser propagado pelo vento ou por ação humana durante manejo inadequado de plantas (SILVEIRA *et al*, 2012).

O fungo penetra na planta através de ferimentos, insetos vetores ou pelas raízes. Sua interação com a planta induz a produção de substâncias que obstruem o tecido vascular do hospedeiro, na tentativa de barrar a infecção. Essa resposta possui certa eficiência no início da colonização, porém, com a obstrução dos vasos

condutores, não há passagem de água ou nutrientes e as estruturas da planta são comprometidas, podendo levá-la à morte (BAILEY; MEINHARDT, 2016; SILVEIRA *et al*, 2012).

No quivezeiro, o fungo causa escurecimento e apodrecimento interno (Figura 1-B), murcha e presença de estrias escuras nos ramos e tronco (Figura 1-C) e redução no tamanho dos frutos (SILVEIRA *et al*, 2012; SILVEIRA *et al*, 2015).

A doença apresenta alta taxa de mortalidade de quivezeiros, visto que, atualmente não existem produtos ou práticas comprovadas para eliminar a infecção de *Ceratocystis fimbriata* e, assim, curar a planta. Porém, algumas medidas podem ser tomadas para evitar a propagação deste fitopatógeno, como esterilização das ferramentas utilizadas no manejo das plantas, aquisição de exemplares de boa procedência, escolha do local de implementação do pomar com boa exposição solar e solo drenado. As plantas mortas e os ramos infectados devem ser queimados (SILVEIRA *et al*, 2012; ZANELLA, 2014).

Figura 1 – Morfologia e sintomatologia de *Ceratocystis fimbriata*



Figura 1-A: Esporos assexuados. Fonte: Autor (2019)

Figura 1-B: Escurecimento interno do tronco de quivezeiro. Fonte: Adaptado de Silveira et al (2012)

Figura 1-C: Estrias no tronco de quivezeiro. Fonte: Adaptado de Silveira et al (2012)

3.2 PRODUTOS NATURAIS USADOS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Os extratos vegetais, compostos por variadas substâncias que apresentam propriedades citotóxicas, fungicidas, inseticidas etc., são provenientes do metabolismo secundário das plantas, por exemplo, fenóis, alcaloides, monoterpenos, flavonoides. Algumas de suas vantagens em relação aos defensivos químicos

tradicionais são: rápida degradação no ambiente, variadas formas de atuação, menor toxicidade (CAMATTI-SARTORI *et al*, 2011; SANTOS, 2004).

Extratos vegetais não autoclavados possuem maior atividade antifúngica em relação aos autoclavados, indicando alteração dos compostos presentes nos extratos durante o processo de autoclavagem. Quando utilizado etanol como solvente em vez de água, a inibição de crescimento fúngico é mais eficiente (CELOTO *et al*, 2008; VENTUROSOSO *et al*, 2010).

3.2.1 Alecrim

O alecrim, *Rosmarinus officinalis*, é um arbusto perene, originário da Europa, que pode atingir até 2 metros de altura. Possui caule vastamente ramificado e lenhoso, com folhas estreitas e opostas com coloração verde escura na face superior e pelos estelares esbranquiçados na face inferior. No seu óleo essencial estão presentes linalol, cânfora, eucaliptol, cineol, α -pineno, alcaloides, ácidos, taninos, flavonoides e saponinas. Para a realização de extratos pode-se utilizar as folhas, flores ou mesmo toda a planta (GRANDI, 2014; VAZ; JORGE, 2006). Testes realizados por Rozwalka *et al* (2008) demonstraram atividade fungitóxica de extratos de alecrim sobre *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Santos *et al* (2018) relataram inibição na germinação de esporos de *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. A atividade antimicrobiana do alecrim se dá pela presença dos compostos 1,8 cineol, α -pineno, borneol e cânfora (MAIA *et al*, 2014).

3.2.2 Alho

O alho, *Allium sativum*, é uma herbácea originária da Europa e Ásia Ocidental que apresenta bulbo composto por vários bulbilhos variando de branco a violeta, envoltos individualmente por túnica esbranquiçada. Pode atingir até 60 centímetros de altura. Extratos são feitos utilizando os bulbilhos, que apresentam em sua constituição química vitaminas, sais minerais, enzimas, compostos sulfurados (alicina e aliina), além de terpenos como linalol, citral, α e β -felandreno, geraniol (GRANDI, 2014; VAZ; JORGE, 2006). Segundo LEITE *et al* (2012), o extrato bruto de alho apresentou redução do crescimento micelial de *Elsinoe ampelina*. Extrato hidroalcoólico de alho apresentou fungitoxidade sobre *Bipolaris* spp., *Curvularia*

lunata e *Fusarium subglutinans* (COSTA *et al*, 2017). A atividade antimicrobiana do alho é atribuída à alicina (FONSECA *et al*, 2014).

3.2.3 Arruda

A arruda, *Ruta graveolens*, é um subarbusto semi-perene originária do sul da Europa e Mediterrâneo que pode atingir até 1,5 metros de altura. Possui caule ramificado com folhas verde-azuladas, alternas e que apresentam pequenas glândulas oleríferas. Extratos são feitos a partir das folhas, flores ou toda a planta, e contêm diversos alcaloides, derivados furocumarínicos, além de óleo essencial que é constituído por álcoois, compostos terpênicos, dimetilnonilcarbinol, metilheptilcetonas, metilnonil, fenóis, ésteres (GRANDI, 2014; RODRIGUES; GONZAGA, 2001). Arruda *et al* (2015) realizaram testes com extrato de arruda e obtiveram resultados positivos para o controle do crescimento micelial de *Magnaporthe oryzae*. Extratos hexânicos de arruda demonstraram efeito redutor de crescimento micelial em *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfii* (DOMINGUES *et al*, 2009). Os componentes limoneno, linalol, nonanona e undecanona, constituintes do óleo essencial de arruda, são relacionados como os responsáveis por sua atividade antimicrobiana (ORLANDA *et al*, 2009).

3.2.4 Canela-da-China

A canela-da-China, *Cinnamomum aromaticum*, sinônimo científica *Cinnamomum cassia*, é uma árvore de odor aromático e forte, com casca branca. Sua altura pode alcançar até 7 metros. A partir das cascas do caule são feitos extratos que apresentam compostos como eugenol, aldeído cinâmico, furfurool, salicilaldeído, safrol, além de lignina, corante, tanino (GRANDI, 2014). O óleo essencial de canela-da-China apresentou efeito fungitóxico para *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. (OLIVEIRA *et al*, 2018). Cavalcanti *et al* (2011) relataram efeito inibitório do óleo essencial de canela-da-China sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. O ácido cinâmico, cinamaldeído e eugenol conferem atividade antimicrobiana à canela-da-China (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017).

3.2.5 Capim-cidreira

O capim-cidreira, *Cymbopogon citratus*, também conhecido como capim-limão ou capim-santo, é uma erva perene originária da Índia. Apresenta vários colmos que podem atingir até 2 metros de altura. Suas folhas, de textura áspera, são longas e estreitas. Extratos são feitos utilizando as folhas ou o rizoma. Em sua constituição química encontra-se neral, citral, geranial, além de diversos alcaloides, álcoois, aldeídos, flavonoides, triterpenoides como cimbopagona e cimbopogonol (GRANDI, 2014; VAZ; JORGE, 2006). Óleo essencial de capim-cidreira apresentou atividade fungitóxica sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (CORTEZ *et al*, 2015) Brum *et al* (2014) obtiveram melhores resultados utilizando óleo essencial de capim-cidreira para inibir o crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, *Didymella bryoniae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. O citral é o principal responsável pela atividade antimicrobiana do capim-cidreira (CORTEZ *et al*, 2015).

3.2.6 Cravo-da-Índia

O cravo-da-Índia, *Syzygium aromaticum*, é uma árvore que apresenta flores de coloração vermelha ou rosa, aromáticas e hermafroditas. Pode alcançar 15 metros de altura. São usados botões florais secos para a obtenção de extratos cuja constituição química apresenta cafeína, eugenol, cavicol, salicilato de metila, furfurool, teofilina, ésteres, flavonoides (GRANDI, 2014). Venturoso *et al* (2011) avaliaram o potencial de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp., obtendo melhores resultados com o extrato de cravo-da-Índia. Em testes para avaliar a fungitoxidade de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, o extrato aquoso de cravo-da-Índia demonstrou total inibição de crescimento destes fungos (SILVA *et al*, 2012). O cravo-da-Índia possui comprovada ação antifúngica pela presença do eugenol (MAZZAFERA, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

Os ensaios foram realizados no laboratório da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – Unidade em Bento Gonçalves.

4.2 OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO

As cepas de *Ceratocystis fimbriata*, código CNPUV 412, isoladas de quiveiro da variedade Monty na cidade de Farroupilha – RS, foram doadas pela EMBRAPA Uva e Vinho – Bento Gonçalves, mediante solicitação.

4.3 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

As espécies vegetais (Figura 2) de alecrim, alho, arruda, canela-da-China, capim-cidreira e cravo-da-Índia foram selecionadas pelo seu potencial antifúngico descrito na literatura. Com exceção da arruda, coletada de horto particular localizado na residência do autor, em Garibaldi – RS, e utilizada *in natura*, os demais materiais vegetais, desidratados, foram adquiridos no comércio local do mesmo município.

Figura 2 – Representação do material vegetal utilizado na preparação dos extratos



Fonte: Autor (2019)

A: Alecrim; B: Alho; C: Arruda; D: Canela-da-China; E: Capim-cidreira; F: Cravo-da-Índia

4.4 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

As partes vegetais de alecrim, alho, arruda, canela-da-China, capim-cidreira e cravo-da-Índia foram colocadas em frasco âmbar contendo 100 mL de álcool etílico 96°GL (solvente extrator), conforme descrito na Tabela 1. Este foi mantido fechado, ao abrigo da luz e em local fresco durante 12 dias para extração dos compostos presentes nos vegetais.

Devido ao seu volume, a arruda e o capim-cidreira tiveram que ser utilizados em menor quantidade, para que o material vegetal ficasse totalmente imerso no solvente.

Tabela 1 – Material vegetal utilizado no preparo dos extratos etanólicos

Planta	Parte utilizada	Quantidade (g)
Alecrim	Folhas secas	25
Alho	Bulbilhos desidratados	25
Arruda	Folhas <i>in natura</i>	10
Canela-da-China	Cascas em pó	25
Capim-cidreira	Folhas secas	10
Cravo-da-Índia	Botões florais secos	25

Fonte: Autor (2019)

4.4.5 Preparo das diluições do extrato bruto e álcool etílico

Foram preparadas diferentes concentrações de extratos vegetais (Tabela 2) e álcool etílico, a fim de avaliar se os possíveis efeitos fungitóxicos eram devidos aos compostos extraídos dos vegetais ou atribuídos ao solvente extrator.

Tabela 2 – Preparo das soluções

Solução	Volumes utilizados (mL)
Extrato vegetal bruto (EB)	5
50% de extrato vegetal + água destilada (E50)	2,5 + 2,5
25% de extrato vegetal + água destilada (E25)	1,25 + 3,75
10% de extrato vegetal + água destilada (E10)	0,5 + 4,5
5% de extrato vegetal + água destilada (E5)	0,25 + 4,75
Álcool etílico 96°GL (AP)	5
50% de álcool etílico + água destilada (A50)	2,5 + 2,5
25% de álcool etílico + água destilada (A25)	1,25 + 3,75
10% de álcool etílico + água destilada (A10)	0,5 + 4,5
5% de álcool etílico + água destilada (A5)	0,25 + 4,75

Fonte: Autor (2019)

4.5 PREPARO DAS PLACAS PARA OS TESTES

Todos os utensílios utilizados nos testes foram devidamente autoclavados e posteriormente mantidos sob luz UV dentro da cabine de fluxo laminar durante 10 min antes da sua utilização.

O meio de cultivo utilizado foi o BDA (batata-dextrose-ágar), preparado seguindo recomendações do fabricante (42 g/L). Após autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão, durante 15 min, o meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar.

Após a solidificação do meio, foram aplicados 200 µL de cada solução por placa. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, as soluções foram espalhadas sobre toda a superfície do meio. As placas foram mantidas entreabertas para evaporação do solvente. Os tratamentos foram realizados em triplicata, totalizando 33 placas.

4.6 AVALIAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE COLÔNIAS FÚNGICAS PARA INOCULAÇÃO

As colônias de *Ceratocystis fimbriata*, após 14 dias de crescimento em BOD, sem fotoperíodo, na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, não apresentavam tamanho suficiente para que fossem obtidos 33 discos contendo micélio para inoculação nas placas dos testes. A necessidade de mais de uma placa para retirada dos discos implica em condições diferentes de crescimento fúngico, podendo afetar diretamente os resultados dos ensaios.

A fim de solucionar este problema, uma nova metodologia foi proposta e testada: o raspado da superfície micelial de *Ceratocystis fimbriata*, cultivado conforme citado acima, foi solubilizado em solução salina e vertido sobre discos de papel-filtro, os quais posteriormente foram inoculados no centro das placas de BDA. Juntamente a este experimento, foi realizado um ensaio utilizando o método comumente empregado de discos micélio-ágar. Os discos de papel-filtro utilizados tinham 6 mm de diâmetro e os discos de micélio-ágar tinham 5,5 mm de diâmetro.

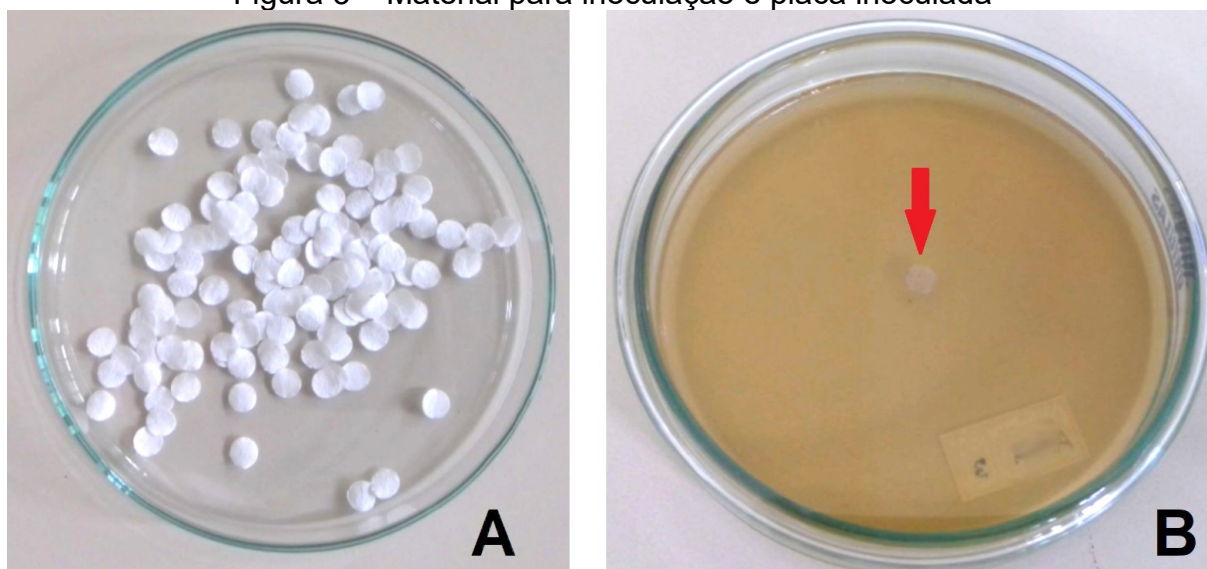
As placas foram armazenadas em BOD, sem fotoperíodo, na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 10 dias. Ao final do 10º dia, o crescimento das colônias dos dois métodos foi comparado visualmente, avaliando o crescimento micelial e esporulação do fungo.

4.7 INOCULAÇÃO DO FUNGO

Colônias de *Ceratocystis fimbriata* com 14 dias de crescimento em meio BDA foram removidas por raspagem com lâmina de vidro e solubilizadas em aproximadamente 5 ml de solução salina 0,9% esterilizada. Após homogeneização da solução micelial esta foi vertida sobre discos de papel-filtro (Figura 3) previamente esterilizados, com 6 mm de diâmetro. Com o auxílio de uma pinça, os discos foram depositados no centro de cada placa previamente tratada com as diluições de extrato ou solvente.

As placas foram armazenadas em estufa incubadora BOD, sem fotoperíodo, por 10 dias na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 3 – Material para inoculação e placa inoculada



Fonte: Autor (2019)

A: Discos de papel-filtro; B: Placa contendo extrato e disco de papel-filtro no centro, indicado pela seta vermelha.

4.8 REPIQUE E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

A cada 14 dias, novas placas contendo *Ceratocystis fimbriata* eram preparadas para serem utilizadas nos testes. Após a inoculação do fungo no meio BDA, através dos discos de papel-filtro, as placas eram armazenadas em estufa incubadora BOD, sem fotoperíodo, na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.9 MEDIÇÃO DAS COLÔNIAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medições foram feitas em 3, 6, 8 e 10 dias após a inoculação do fungo nas placas de Petri, utilizando para tal uma régua e mensurando o diâmetro de crescimento da colônia.

Após as medições, os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t de Tukey a 5% de probabilidade. O software utilizado foi o Graphpad Prism versão 6.0.

Para os resultados estatisticamente significantes, foi calculada a Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC), utilizando, conforme Montipó (2010), a seguinte fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento})}{\text{Diâmetro da testemunha}} * 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentre as plantas selecionadas para a obtenção dos extratos, somente capim-cidreira possui estudo na literatura utilizando óleo essencial para o controle de *Ceratocystis fimbriata* (ANDREIS *et al*, 2017).

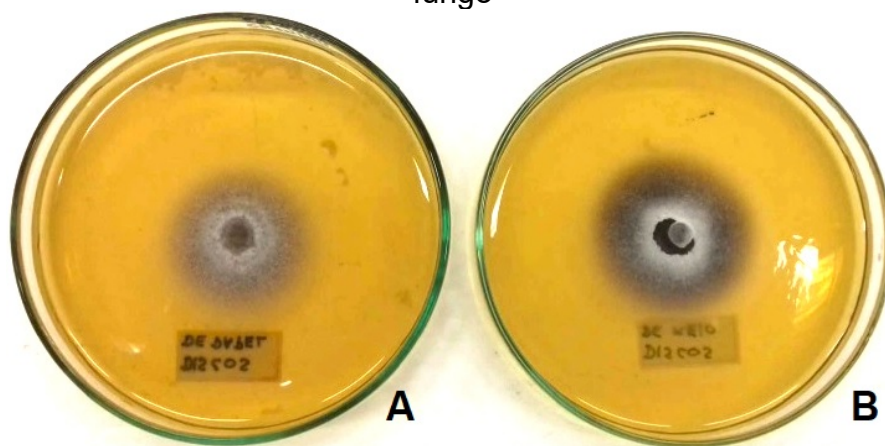
A inexistência de dados na literatura científica a respeito da utilização de extratos vegetais de alecrim, alho, arruda, canela-da-China e cravo-da-Índia para o controle de *Ceratocystis fimbriata* impossibilita a comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros experimentos.

5.1 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA PARA INOCULAÇÃO DE *Ceratocystis fimbriata*

A inoculação do fungo por meio de discos de papel-filtro embebido em solução micelial apresentou crescimento suficiente para a execução da técnica proposta, quando comparada à metodologia de micélio-ágar.

Mesmo havendo um desenvolvimento micelial menor (Figura 4), considera-se a metodologia proposta como mais adequada uma vez que esta permite homogeneidade aos inóculos. Desta forma é possível a comparação dos resultados das placas em um mesmo ensaio, uma vez que todas receberam discos de papel-filtro contendo a mesma quantidade de estruturas vegetativas. Além disso, a economia de reagentes utilizados é outra vantagem desta técnica.

Figura 4 – Comparação de metodologias para inoculação do fungo



Fonte: Autor (2019)

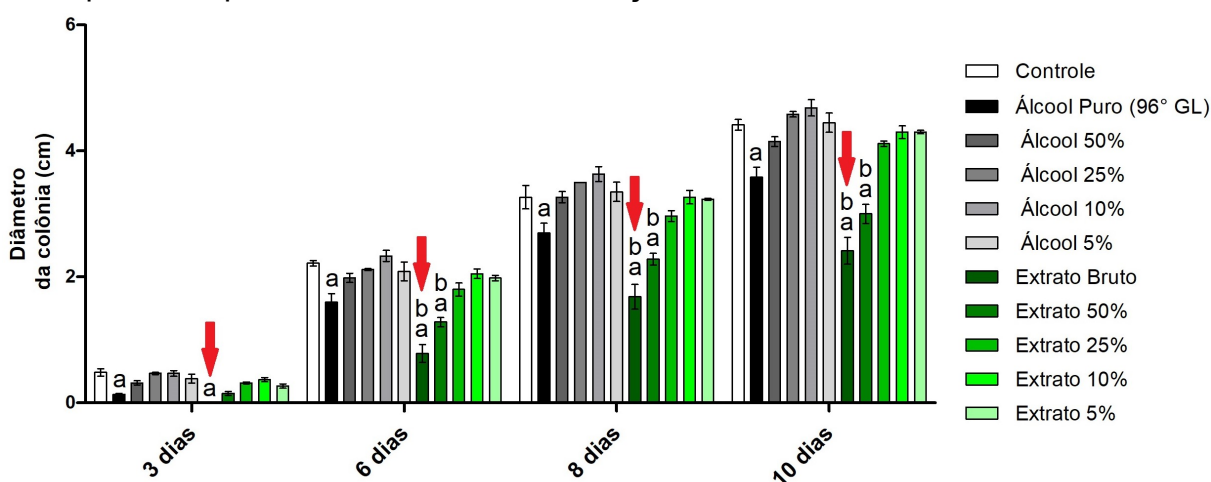
A: Placa com disco de papel-filtro; B Placa com disco micélio-ágar.

5.1 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE ALECRIM SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

Os resultados dos tratamentos, exibidos no Gráfico 1, mostram que ao 3º dia o EB inibiu completamente o crescimento micelial e de forma significativa quando comparado ao BDA. Porém, mesmo não havendo diferença significativa entre AP e EB, deve-se considerar a possibilidade de efeito sinérgico entre o solvente e os compostos do alecrim. Além disso, houve redução do crescimento micelial em 6, 8 e 10 dias tanto para EB quanto para E50.

O extrato etanólico de alecrim apresentou potencial fungitóxico ao reduzir o crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata* nas concentrações EB e E50.

Gráfico 1 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de alecrim



Fonte: Autor (2019)

a: significativamente diferente de BDA; b: extrato significativamente diferente de sua respectiva diluição de álcool. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

Os valores de PIC para os valores significativos (Tabela 3) demonstram que o EB possui o maior PIC quando comparado a AP e BDA respectivamente.

Tabela 3 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC)

Comparação	3º dia	6º dia	8º dia	10º dia
EB x BDA	100,00	64,66	48,47	45,28
AP x BDA	72,41	27,82	17,35	18,87
E50 x BDA	68,97	42,11	30,10	32,08
A50 x BDA	34,48	10,53	0,00	6,04

Fonte: Autor (2019)

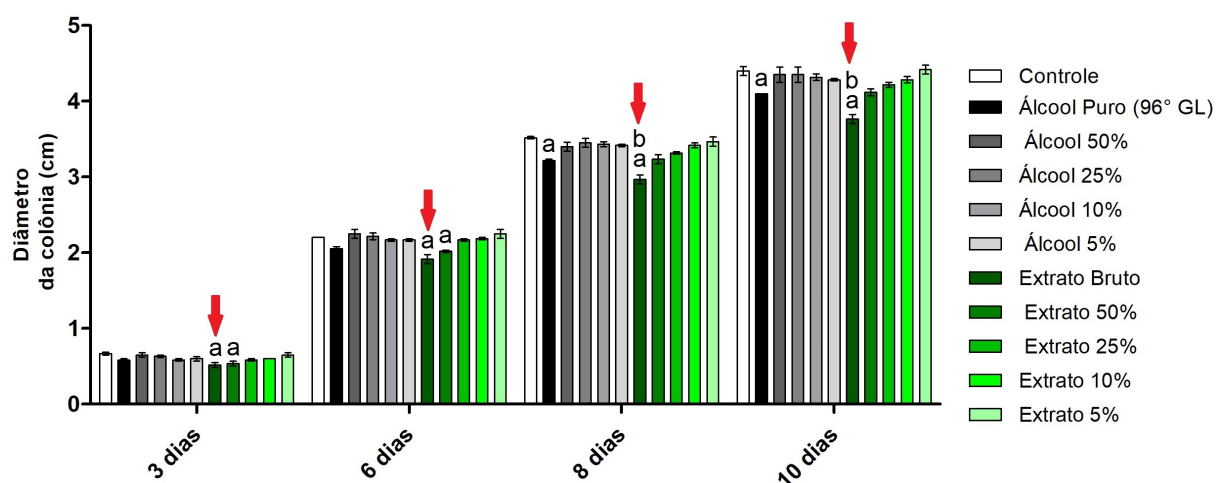
5.2 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE ALHO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

Neste ensaio, as concentrações EB e E50 demonstraram redução no crescimento micelial em relação a BDA. Os efeitos de E50 deixaram de ser significativos, em relação a BDA, a partir do oitavo dia de testes.

O EB apresentou valor mais intenso de redução a partir do 8º dia, quando comparado ao BDA e à sua respectiva concentração etanólica, demonstrando um possível efeito sinérgico entre o etanol e os componentes presentes no extrato.

No entanto, os compostos extraídos do alho demonstraram ser pouco eficientes na redução do crescimento micelial, como observado no início do cultivo, não justificando o emprego do extrato etanólico de alho a fim de inibir o fitopatógeno em estudo.

Gráfico 2 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de alho



Fonte: Autor (2019)

a: significativamente diferente de BDA; b: extrato significativamente diferente de sua respectiva diluição de álcool. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

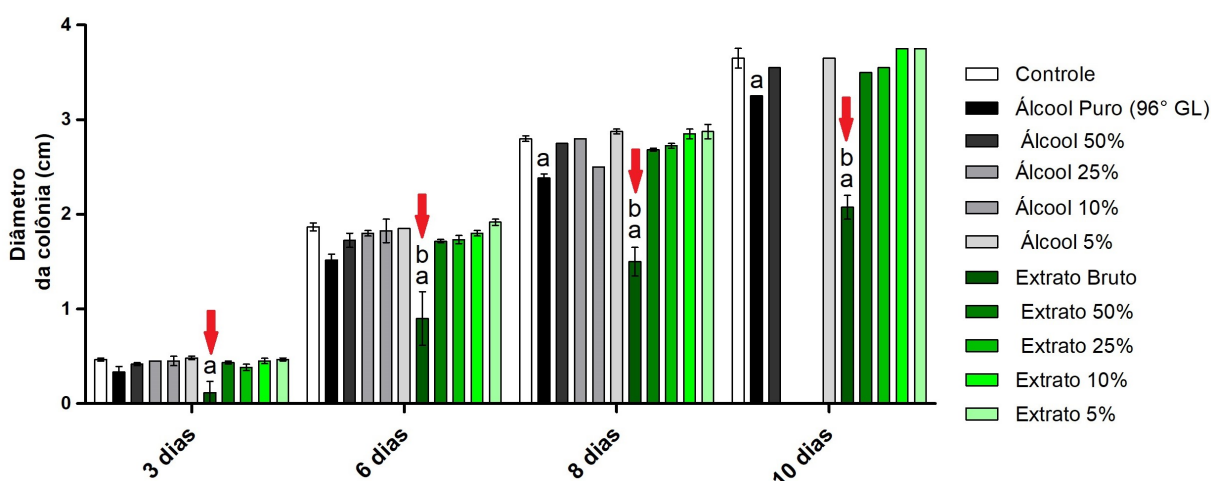
5.3 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE ARRUDA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

Devido ao volume ocupado pela arruda *in natura*, a concentração utilizada foi de 10 g de material vegetal em 100 mL de etanol. Apesar disso, demonstrou fungitoxidade para *Ceratocystis fimbriata*.

O EB demonstrou redução micelial significativa já no 3° dia de testes. Porém, somente a partir do 6° dia houve diferença significativa no crescimento quando comparado tanto a BDA quanto à sua respectiva concentração etanólica, AP.

Contaminações nas placas com as concentrações A25 e A10 impossibilitaram as medições no 8° e no 10° dias.

Gráfico 3 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de arruda



Fonte: Autor (2019)

a: significativamente diferente de BDA; b: extrato significativamente diferente de sua respectiva diluição de álcool. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

O EB se sobressaiu em relação às demais concentrações, apresentando maior valor de PIC em relação às demais concentrações (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC)

Comparação	3° dia	6° dia	8° dia	10° dia
EB x BDA	74,29	51,79	46,43	43,15
AP x BDA	28,57	18,75	15,18	10,96
E50 x BDA	7,14	8,04	4,17	4,11
A50 x BDA	10,71	7,59	1,59	2,74

Fonte: Autor (2019)

5.4 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CANELA-DA-CHINA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

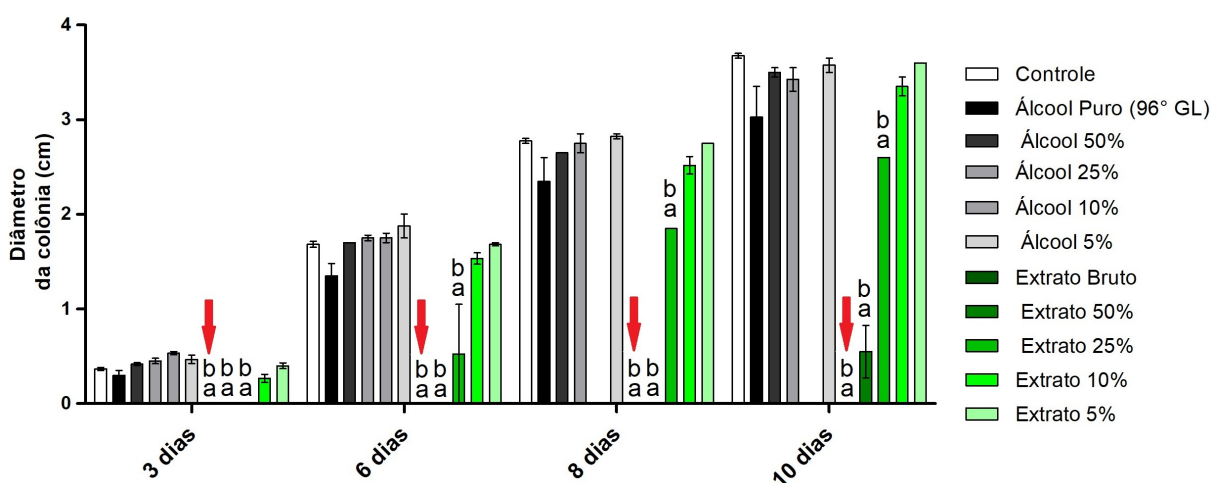
O EB demonstrou PIC de 100% em todos os dias analisados quando comparados ao BDA e ao AP, evidenciando a morte total das estruturas fúngicas a

partir do momento da inoculação.

Tendo em vista que a única concentração que apresentou ausência total de crescimento micelial ao longo de todos os dias de avaliação foi o EB, considera-se esta a melhor concentração.

A partir da diluição de E50 não houve morte de todas as células fúngicas ao entrarem em contato com o extrato no momento da inoculação, uma vez que foi possível observar desenvolvimento micelial a partir do 10º dia. A partir do 8º dia, contaminações nas placas contendo A10, impossibilitaram as medições.

Gráfico 4 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de canela-da-China



Fonte: Autor (2019)

a: significativamente diferente de BDA; b: extrato significativamente diferente de sua respectiva diluição de álcool. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

O EB apresentou PIC de 100% (Tabela 5) durante os 10 dias de testes, demonstrando controle total no crescimento do fungo, qualificando a canela-da-China para possíveis testes *in vivo*.

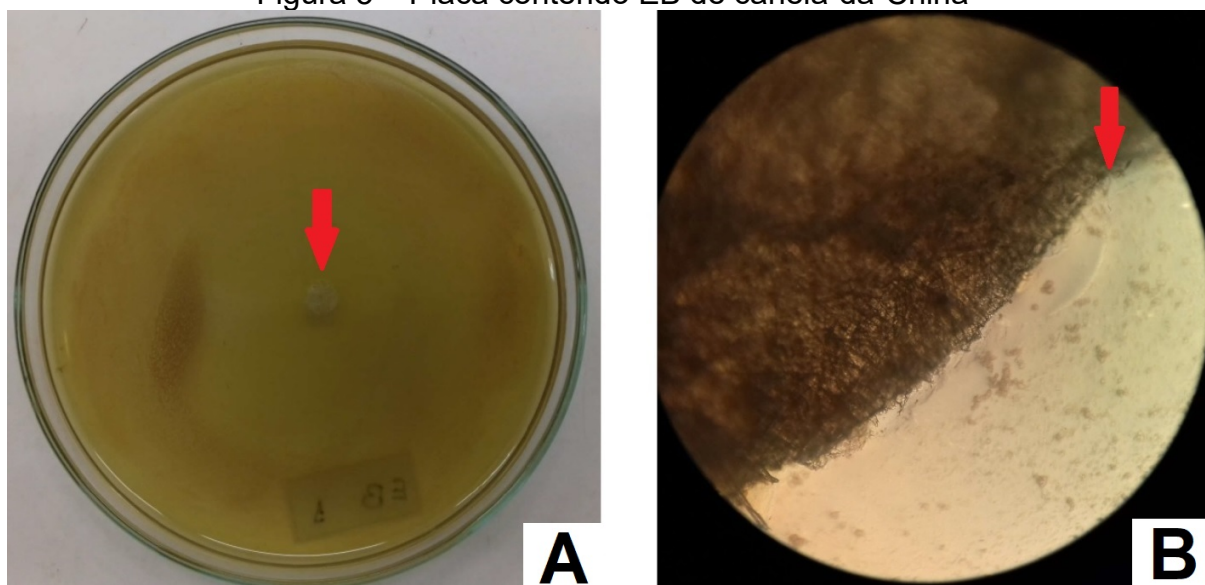
Tabela 5 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC)

Comparação	3º dia	6º dia	8º dia	10º dia
EB x BDA	100,00	100,00	100,00	100,00
AP x BDA	18,18	19,80	15,32	17,69
E50 x BDA	100,00	100,00	100,00	77,75
A50 x BDA	0,00	0,00	4,50	4,76
E25 x BDA	100	37,62	33,33	29,25
A25 x BDA	0	0	0,90	6,80

Fonte: Autor (2019)

Ao final do 10° dia de testes, as placas contendo extrato bruto etanólico de canela-da-China foram analisadas a olho nu (Figura 5-A) e em microscópio óptico (Figura 5-B). Verificou-se que não haviam estruturas fúngicas presentes, evidenciando, assim, o real efeito inibitório do EB no crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata*.

Figura 5 – Placa contendo EB de canela-da-China



Fonte: Autor (2019)

A: Placa demonstrando ausência de crescimento micelial a partir do disco (seta vermelha); B: Ampliação de 10x em microscópio óptico da borda do disco de papel-filtro (seta vermelha), demonstrando ausência de estrutura fúngicas.

5.5 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CAPIM-CIDREIRA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

Devido ao volume ocupado pelo capim-cidreira, a concentração utilizada foi de 10 g de material vegetal em 100 mL de etanol.

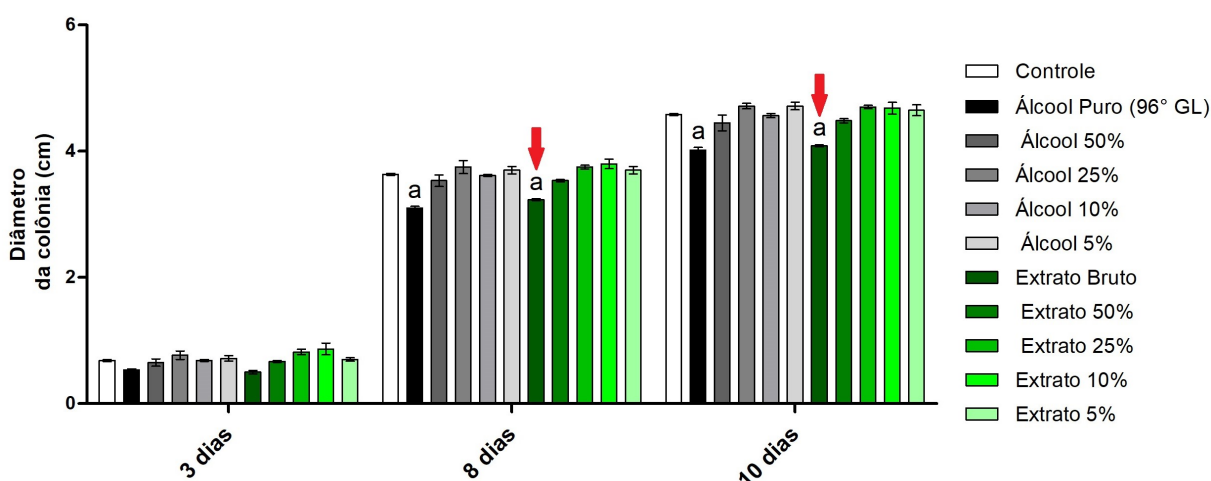
O extrato etanólico do capim-cidreira não demonstrou efetividade sobre o crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata* em nem um dos dias avaliados.

Esta observação deve-se ao fato de que AP e EB demonstraram inibir de forma estatisticamente semelhante o crescimento micelial quando comparados com BDA, demonstrando ausência de efeito dos componentes do extrato etanólico de capim-cidreira sobre o desenvolvimento de *Ceratocystis fimbriata*.

As medições no 6° dia de testes não foram realizadas por questões de acesso ao laboratório.

Os resultados obtidos diferem dos encontrados por Andreis *et al* (2017), possivelmente devido à concentração utilizada, já que Andreis e colaboradores utilizaram óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, obtido por hidrodestilação, nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20%, enquanto neste estudo foi utilizado extrato alcoólico vegetal obtido a partir de 10 g de capim-cidreira imerso em 100 mL.

Gráfico 5 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de capim-cidreira



Fonte: Autor (2019)

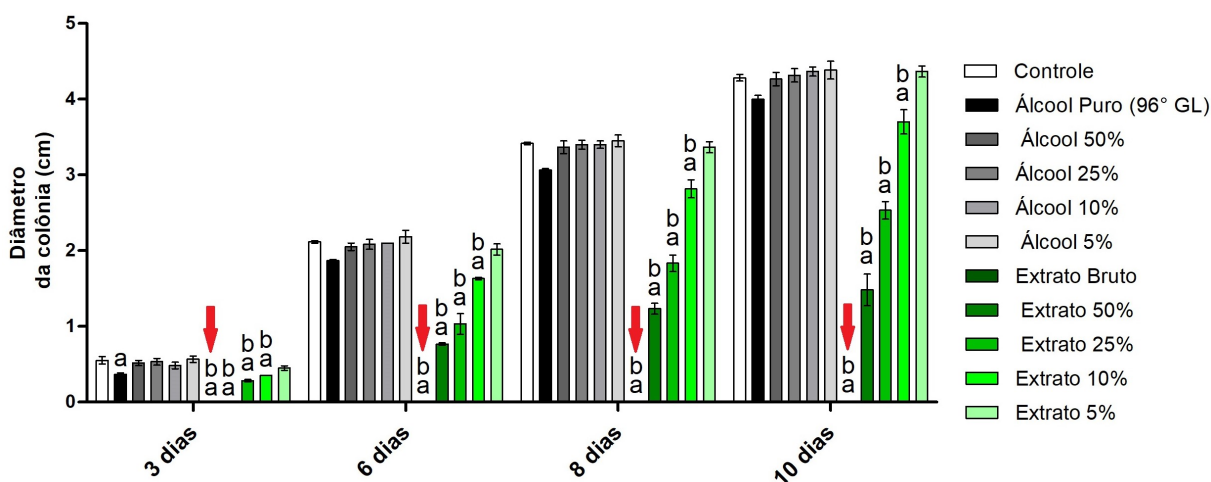
a: significativamente diferente de BDA. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

5.6 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE CRAVO-DA-ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Ceratocystis fimbriata*

Como pode ser observado no Gráfico 6, o extrato etanólico de cravo-da-Índia nas diluições E50, E25 e E10 demonstraram menor efetividade que EB, ainda que apresentando redução significativa do crescimento micelial quando comparados ao BDA e sua respectiva concentração etanólica. O crescimento micelial indica a presença de estruturas fúngicas que permaneceram vivas após inoculação nas placas.

O EB inibiu totalmente o desenvolvimento micelial de *Ceratocystis fimbriata* em 3, 6, 8 e 10 dias. A eficiência manifestada pelo emprego do extrato etanólico bruto de cravo-da-Índia, indica a possível presença de compostos que exercem efeito fungitóxico sobre o fitopatógeno avaliado, oportunizando a continuidade dos estudos com cravo-da-Índia.

Gráfico 6 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* quando exposto a diferentes concentrações de extrato etanólico de cravo-da-Índia



Fonte: Autor (2019)

a: significativamente diferente de BDA; b: extrato significativamente diferente de sua respectiva diluição de álcool. As setas vermelhas indicam resultados significativos de redução do diâmetro micelial.

Os valores de PIC das diluições mais eficientes e suas respectivas concentrações etanólicas ao longo dos 10 dias de testes são apresentados na Tabela 6.

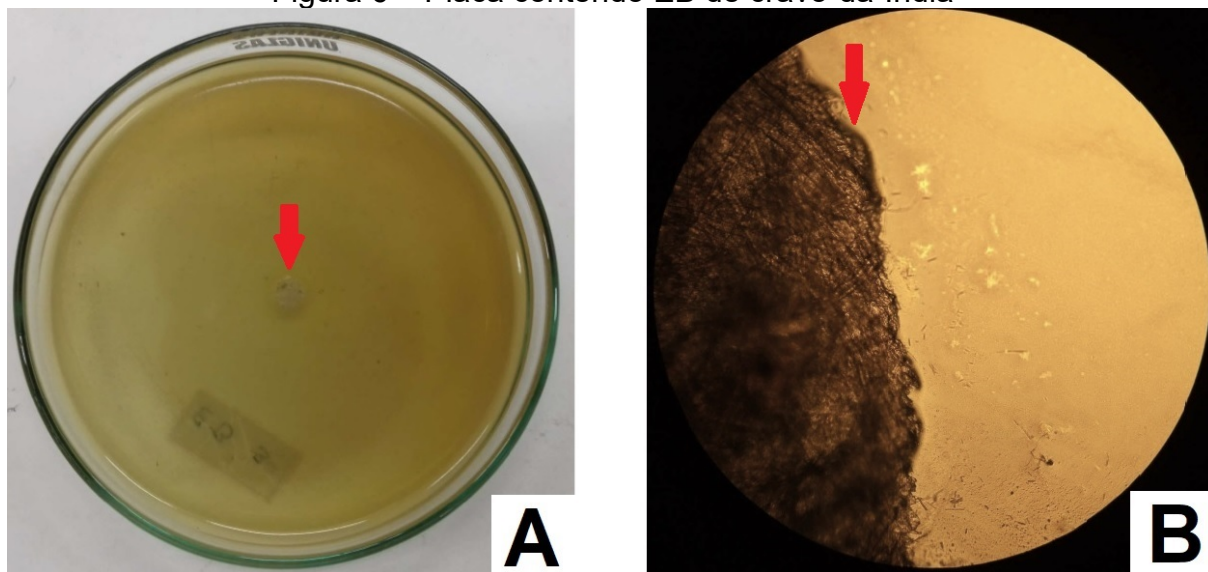
Tabela 6 – Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC)

Comparação	3° dia	6° dia	8° dia	10° dia
EB x BDA	100,00	100,00	100,00	100,00
AP x BDA	33,33	11,81	10,24	6,61
E50 x BDA	100,00	63,78	63,90	65,37
A50 x BDA	6,06	3,15	1,46	0,39
E25 x BDA	48,48	51,18	46,34	40,86
A25 x BDA	3,03	1,57	0,49	0,00
E10 x BDA	36,36	22,83	17,56	13,62
A10 x BDA	21,21	4,72	4,88	2,33

Fonte: Autor (2019)

Ao final do 10° dia de testes, as placas contendo extrato bruto etanólico de cravo-da-Índia foram analisadas a olho nu (Figura 6-A) e em microscópio óptico (Figura 6-B). Verificou-se que não haviam estruturas fúngicas presentes, evidenciando, assim, o real efeito inibitório do EB no crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata*.

Figura 6 – Placa contendo EB de cravo-da-Índia



Fonte: Autor (2019)

A: Placa demonstrando ausência de crescimento micelial a partir do disco (seta vermelha); B: Ampliação de 10x em microscópio óptico da borda do disco de papel-filtro (seta vermelha), demonstrando ausência de estrutura fúngicas.

6 CONCLUSÕES

A metodologia proposta, utilizando discos de papel-filtro para inoculação, demonstrou efetividade na obtenção de estruturas de propagação de *Ceratocystis fimbriata*.

Para os testes realizados, os extratos etanólicos brutos de canela-da-China e cravo-da-Índia apresentaram inibição total do crescimento micelial de *Ceratocystis fimbriata*.

O não crescimento da colônia, quando utilizado extrato bruto de canela-da-China e cravo-da-Índia indica que os componentes extraídos do material vegetal pelo solvente etanol possuem atividade fungitóxica para *Ceratocystis fimbriata*, demonstrando potencial para futuros testes *in vivo*. Os demais extratos testados, mesmo apresentando redução no crescimento micelial, não são considerados bons para controlar o fitopatógeno, pois, ainda que com uma taxa reduzida, por causa do efeito fungitóxico, a infecção se espalhará pela planta, podendo levá-la à morte.

Apesar de EB e AP serem estatisticamente diferentes ao nível de 5% de significância, não se pode excluir a possibilidade de efeito sinérgico entre o etanol (solvente) e os componentes presentes na canela-da-China e no cravo-da-Índia, uma vez que há como garantir que houve evaporação total do álcool presente no EB antes da inoculação do fungo.

Os demais vegetais testados, apesar de não apresentarem resultados de total inibição, devem ser considerados para futuros testes *in vivo*, visto que há possibilidade de atuarem como elicitores.

7 PERSPECTIVAS

A avaliação dos componentes do extrato etanólico de canela-da-China e cravo-da-Índia pode ser realizada por meio da técnica de cromatografia em coluna de sílica, separando os compostos presentes em seus óleos essenciais e, após, testá-los individualmente em diferentes concentrações, para determinar atividade fungitóxica dos mesmos sobre *Ceratocystis fimbriata*.

Novos experimentos utilizando óleo essencial concentrado dos vegetais empregados neste estudo podem ser realizados a fim de verificar o potencial fungitóxico sobre *Ceratocystis fimbriata*.

A aplicação dos extratos vegetais nas plantas infectadas, por meio de injeção, pode ser experimentada, devendo-se acompanhar o efeito sobre a infecção e sobre as plantas.

Testes *in vivo* de pulverização podem ser realizados para avaliação dos componentes dos extratos como medida preventiva, sendo necessário determinar o volume mínimo e concentração para evitar o desenvolvimento do fungo.

REFERÊNCIAS

- ANDREIS, D. *et al.* **Efeito de óleos essenciais no controle de *Ceratocystis fimbriata* em *Actinidia deliciosa***. In: 9º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS. Universidade de Caxias do Sul, RS, 2017. Disponível em: http://www.sboe.net.br/cd/Resumos/Resumo9SBOE_0046.pdf. Acesso em: 10 out. 2019.
- ANTUNES, M. D. *et al.* **Kiwi: da produção à comercialização**. Universidade do Algarve, 2008. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/5682/1/Kiwi.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- ARRUDA, R. L. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica do extrato de *Ruta graveolens* L. na inibição do crescimento micelial de *Magnaporthe oryzae*. In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS, 9, 2015, Santo Antônio de Goiás, GO. **Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1039702/1/CNPAF2015p98.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.
- BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
- BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. 1 v.
- BRUM, R. B. C. S. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. **Magistra**, v. 26, n. 3, p. 361-371, 2017. Disponível em: <https://magistraonline.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/download/471/183>. Acesso em: 8 jul. 2019.
- CAMATTI-SARTORI, V. *et al.* Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011. Disponível em: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/9904/6963>. Acesso em: 8 maio 2019.
- CAVALCANTI, Y. W. *et al.* Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 40, n. 5, 2011. Disponível em: <https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018ef7f8c9d0a098b4ec9/pdf/rou-40-5-208.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- CELOTO, M. I. B. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum, Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 01-05, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/asagr/v30n1/v30n1a01.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2019.

CORTEZ, L. E. R. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). **Mundo saúde**, v. 39, n. 4, p. [433-440], 2015. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/mundo_saude_artigos/Avaliacao_atividade_antifungica_oleos.pdf. Acesso em: 22 out. 2019.

COSTA, N. C. *et al.* Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica preliminar do extrato vegetal de alho no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 1, p. 161-166, 2017. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7102599.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2019.

DOMINGUES, R. J. *et al.* Ação “in vitro” de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 643-649, 2009. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v76_4/domingues.pdf. Acesso em: 10 jun. 2019.

FONSECA, G. M. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 679-684, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/07.pdf>. Acesso em: 22 set. 2019.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Mediciniais Mineiras, Nativas e Cultivadas**. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014.

HEIFFIG, L. S. *et al.* **Kiwi**: cultura alternativa para pequenas propriedades rurais. Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca e Comunicação, 2005. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/file/3659/download?token=8wjt9m4Z>. Acesso em: 14 out. 2019.

LEITE, C.D. *et al.* Extrato de alho no controle in vitro e in vivo da antracnose da videira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 556-562, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14n3/19.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2005. 2 v.

MAIA, A. J. *et al.* Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 330-339, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v49n5/0100-204X-pab-49-05-0330.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2019.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v26n2/a11v26n2.pdf>. Acesso em 22 out. 2019.

MONTIPÓ, Sheila. **Potencial Antifúngico de Produtos Naturais Sobre Patógenos da Videira (*Vitis spp*)**. 2010, 69 f. Monografia (graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Bento Gonçalves, 2010.

OLIVEIRA, B. M. de *et al.* Ação da Inoculação dos Óleos Essenciais de Orégano, Canela e Cravo sobre *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* em Grãos de Milho. *In*: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA, 7, 2018, Londrina, PR. **Anais** [...]. Disponível em: http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/910_20181103_02-33-20_809.pdf. Acesso em 22 maio 2019.

ORLANDA, J. F. F. *et al.* **Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae)**. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Águas de Lindóia, SP, 2010. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T0124-2.pdf>. Acesso em: 22 out. 2019.

PALUDO, R. **Emater/RS-Ascar faz balanço da produção de frutas na Serra**. 2019. Disponível em: <https://estado.rs.gov.br/emater-rs-ascar-faz-balanco-da-producao-de-frutas-na-serra-gaucha>. Acesso em: 19 out. 2019.

PEGORINI, R. D. *et al.* Uso de produtos alternativos para controle de *Ceratocystis fimbriata* em mudas de quiveiro. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 51, 2019, Recife, PE. **Anais** [...]. Disponível em: <http://www.cbfito2019.com.br/files/cbf-anais-final.pdf>. Acesso em: 19 set. 2019.

RODRIGUES, V. G. S.; GONZAGA, D. S. de O. M. **Arruda**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2001. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100482/1/Folder-arruda.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2019.

ROZWALKA, L. C. *et al.* Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n2/a01v38n2.pdf>. Acesso em: 13 maio 2019.

SANTOS, C. H. da S.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1719, 2017. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial76_completa/artigos-separados/1719.pdf. Acesso em: 22 out. 2019.

SANTOS, L. H. N. dos *et al.* Ação de Óleos Essenciais na Inibição da Germinação de Esporos de *Aspergillus sp.* E *Fusarium sp.*. *In*: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA, 7, 2018, Londrina, PR. **Anais** [...]. Disponível em: http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/910_20181103_02-30-46_800.pdf. Acesso em 21 maio 2019.

SANTOS, P. L. dos *et al.* **Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas.** Goiânia, GO: Enciclopédia Biosfera. p. 2562-2576, 2013. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/utilizacao%20de%20Extratos.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2019.

SILVA, J. L. da *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, RN, v. 7, n. 1, p. 80-86, 2012. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/download/841/1082>. Acesso em: 20 jun. 2019.

SILVEIRA, S. V. da *et al.* **Aspectos Técnicos da Produção de Quivi.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/85616/1/doc079.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2019.

SILVEIRA, S. V. da *et al.* **Diagnóstico do Sistema de Produção do Quivi em Pomares de Farroupilha/RS: Principais Demandas.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130724/1/Doc93.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2019.

SÔNEGO, O. R. *et al.* **Primeiro relato da murcha-de-ceratocystis em kiwi.** In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Tropical Plant Pathology, 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/881218/1/S233.pdf>. Acesso em: 13 set. 2019.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos.** Floresta, v. 30, n. 1/2, 2000. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/floresta/article/download/2361/1973>. Acesso em: 14 maio 2019.

TESSARO, F. A. *et al.* **Avaliação in vitro do óleo essencial de funcho (*Foeniculum vulgare*) sobre crescimento de *Ceratocystis fimbriata*.** In: XXV ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES. Universidade de Caxias do Sul, RS, 2017. Disponível em: http://jovenspesquisadores.com.br/2017/uploads/resumos/1/Felipe_Afonso_Tessaro_242.pdf. Acesso em: 15 ago. 2019.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Alecrim.** Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAP/56607/1/FOL68.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2019.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Alho.** Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/812660/1/FOL70.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2019.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Capim Cidreira**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/812817/1/FOL77.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2019.

VENTUROSO, L. R. *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n1/v37n1a03.pdf>. Acesso em: 15 maio 2019.

VENTUROSO, L. R. *et al.* Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 499-505, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n4/a14v12n4.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2019.

ZANELLA, V. **Pesquisadores e produtores aliados para garantir a sustentabilidade da cultura do Quivi**. 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1920968/pesquisadores-e-produtores-aliados-para-garantir-a-sustentabilidade-da-cultura-do-quivi>. Acesso em: 16 nov. 2019.