

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA CASCA DE *Zanthoxylum riedelianum* E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Autora: Larissa Liz Sousa Lara
Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal

Rio Verde – GO
Novembro 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA CASCA DE *Zanthoxylum riedelianum* E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Autora: Larissa Liz Sousa Lara
Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde – GO
Novembro 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

LL318a Lara, Larissa Liz Sousa
Análise da composição química do óleo essencial da casca de *Zanthoxylum riedelianum* e avaliação de sua atividade antifúngica / Larissa Liz Sousa Lara; orientadora Cristiane de Melo Casal; co-orientadora Cassia Cristina Fernandes Alves. -- Rio Verde, 2020.
31 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. Hidrodestilação. 2. Metabólitos secundários. 3. Fungicida natural. 4. *Sclerotinia sclerotiorum*. 5. *Rhizopus stolonifer*. I. Casal, Cristiane de Melo, orient. II. Alves, Cassia Cristina Fernandes, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

Tese Artigo Científico
 Dissertação Capítulo de Livro
 Monografia – Especialização Livro
 TCC - Graduação Trabalho Apresentado em Evento
 Produto Técnico e Educacional - Tipo:

Nome Completo do Autor: Larissa Liz Sousa Lara

Matrícula: 2018203310310040

Título do Trabalho: Análise da composição química do óleo essencial da casca de *Zanthoxylum riedelianum* e avaliação de sua atividade antifúngica.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 04/03/2021

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 04/03/2021.

Local Data

Larissa Liz Sousa Lara

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Cristiane de Melo Casal

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 81/2020 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Zanthoxylum riedelianum*
E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Autora: Larissa Liz Sousa Lara
Orientadora: Cristiane de Melo Cazal

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica - Área de Concentração Agroquímica

APROVADA em 26 de novembro de 2020.

Prof. Dr. Eugênio Miranda
Sperandio
Avaliador externo - IF Goiano /
Rio Verde

Prof.^a Dr.^a Marilene Silva Oliveira
Avaliadora interna - IF Goiano / Rio
Verde

Prof.^a Dr.^a Cristiane de Melo Cazal
Presidente da Banca - IF Sudeste de Minas Gerais / Campus Barbacena

Documento assinado eletronicamente por:

- Cristiane de Melo Cazal, Cristiane de Melo Cazal - Professor Avaliador de Banca - Campus Barbacena (1), em 16/12/2020 16:58:32.
- Marilene Silva Oliveira, 2019103310340111 - Discente, em 09/12/2020 14:02:56.
- Eugenio Miranda Sperandio, 2019102331540209 - Discente, em 03/12/2020 10:28:16.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 20/11/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 213099
Código de Autenticação: 7f25c373a5



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas, por me fortalecer e guiar durante toda essa jornada;

A Nossa Senhora, por interceder sempre que clamo;

Aos meus pais, Cleidimar e Jaqueline Sheila, meu irmão, Paulo Henrique, por sempre me apoiar e incentivar. Obrigada por todas as orações, cuidados e amor.

À minha orientadora, Dr.^a Cristiane de Melo Cazal, pelas orientações, ensinamentos, competência e apoio;

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, por todos os ensinamentos, paciência, incentivo e por ter sido, em vários momentos uma importante conselheira;

Aos meus colegas de mestrado em especial aos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, que de forma direta e indireta contribuiu para este trabalho. Obrigada por todo companheirismo;

A todos meus amigos e amigas, que sempre me apoiaram e incentivaram;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação, pelos conhecimentos transmitidos;

A CAPES–Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Larissa Liz Sousa Lara, filha de Jaqueline Sheila de Sousa Lara e Cleidimar de Almeida Lara, nasceu em 24 de fevereiro de 1996 na cidade de Iporá-GO. Possui técnico e graduação em licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Iporá-GO. Em setembro de 2018, iniciou no curso de pós-graduação *stricto sensu* em Agroquímica, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde-GO. Atuando na linha de pesquisa em Química dos Produtos Naturais.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Óleos essenciais	1
1.2 Potencial antifúngico dos óleos essenciais	2
1.3 <i>Zanthoxylum riedelianum</i>	4
1.4 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	5
1.5 <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) de Vuill.....	7
1.6 Controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i>	8
1.7 Referências bibliográficas	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. CAPÍTULO I.....	17
Resumo	17
3.1 Introdução	18
3.2 Material e métodos	19
3.2.1 Material vegetal	19
3.2.2 Extração do óleo essencial.....	19

3.2.3 Identificação da composição química do óleo essencial	19
3.2.4 Avaliação do efeito antifúngico do óleo essencial da casca do caule de <i>Zanthoxylum riedelianum</i> frente aos fungos <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i>	20
3.3 Resultados e discussão	21
3.4 Conclusão	24
3.5 Referências bibliográficas	25

ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

Tabela 1: Composição química do óleo essencial da casca de *Zanthoxylum riedelianum*.

..... 22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1: Biossíntese simplificada das principais rotas dos metabólitos secundários. Fonte: Taiz & Zeiger, (2013).	2
Figura 2: Árvore (A), tronco (B) e folhas (C) da espécie <i>Zanthoxylum riedelianum</i> , localizada na cidade de Israelândia-Goiás. Fonte: Própria (2019).	4
Figura 3: Sintomas causados pela <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . (A) Desenvolvimento inicial da lesão em caule. (B), (C) e (D) Expansão gradual da lesão. (E) Lesão cobre a planta inteira causando a morte da planta. (F) Escleródio desenvolvido dentro do caule morto. Fonte: Kamal et al. (2015).	6
Figura 4: <i>Rhizopus stolonifer</i> em fruto de morangueiro. Fonte: Reis & Costa, (2011). ...	8
Figura 5: Estrutura química do fluazinam. Fonte: Própria (2019).	9
Figura 6: Estrutura química do dicloran. Fonte: Própria (2019).	9
CAPÍTULO I	
Figura 1: Percentual de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em diferentes concentrações do óleo essencial da casca do caule de <i>Zanthoxylum riedelianum</i> . As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	23
Figura 2: Percentual de inibição do crescimento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> em diferentes concentrações do óleo essencial da casca do caule de <i>Zanthoxylum riedelianum</i> . As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	23

ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A	
Tabela 1: Rendimento da hidrodestilação da casca do caule de <i>Z. riedelianum</i>	28
APÊNDICE B	
Figura 1: Cromatograma obtido em CG-EM para OEZR. Condições: Gás de arraste Hélio (He); Temperatura inicial de 60°C com elevação da temperatura a 240°C na razão de 3°C min ⁻¹ e elevação para 280°C com razão de 15°C min ⁻¹ ; Temperaturas do injetor, da interface e da fonte foram 240, 250 e 250°C, respectivamente.	29
APÊNDICE C	
Figura 1: Estrutura química de todos os compostos identificados no OEZR.	30
APÊNDICE D	
Figura 1: Inibição do crescimento micelial do OEZR contra <i>S. sclerotiorum</i> após o crescimento total do controle negativo.	31
Figura 2: Inibição do crescimento micelial do OEZR contra <i>R. stolonifer</i> após o crescimento total do controle negativo.	31

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

BDA	Batata dextrose Ágar
C	Carbono
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
IK	Índice de Kovats
IR	Índice de retenção
NI	Não identificados
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OEZR	Óleo essencial de <i>Zanthoxylum riedelianum</i>
ICM	Inibição do Crescimento Micelial
TR	Tempo de retenção
%RA	Porcentagem da área relativa
RI _{EXP}	Índice de retenção em relação aos <i>n</i> -alcanos (C ₇ -C ₃₀)
RI _{LIT}	Índice de retenção encontrado na literatura (Adams, 2007)
Ss12 BRM 29673	Código do fungo
H ₂	Gás Hidrogênio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
L	Litros
mL	Mililitros
mLmin ⁻¹	Mililitros por minutos
mm	Milímetros
g	Gramas
°C	Grau Celsius
°C min ⁻¹	Grau Celsius por minutos
S	Sul

W	Oeste
μL	Microlitro
μLmL^{-1}	Microlitro por mililitros
m	Metros
cm	Centímetro
v/v	Volume por volume
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

RESUMO

LARA, LARISSA LIZ SOUSA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, novembro de 2020. **Análise da composição química do óleo essencial da casca de *Zanthoxylum riedelianum* e avaliação de sua atividade antifúngica.** Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal. Coorientadora: Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves.

O *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer* são fungos fitopatogênicos que infectam diversas culturas. O controle desses patógenos tem sido feito em grande maioria por fungicidas sintéticos, porém vem se observando aumento na resistência a esses pesticidas. Diante disso, e dos problemas resultantes do uso de tais produtos para o ambiente e para saúde humana, métodos alternativos de controle têm sido estudados, dentre quais, o emprego dos óleos essenciais. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química do óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum* (OEZR) (Rutaceae) e avaliar a atividade biológica do mesmo sobre *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, sua composição química foi determinada por análise CG-EM e o potencial antifúngico foi avaliado *in vitro* contra *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer* em meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). O processo de hidrodestilação forneceu óleo essencial com rendimento médio $0,02\% \pm 0,006$, com cor amarelado e aroma peculiar. A análise química revelou 13 compostos voláteis diferentes. Os principais compostos foram E-nerolidol (67,21%), α -selinene (14,94%) e β -selinene (7,41%). OEZR demonstrou potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer* em todas as concentrações avaliadas, em um comportamento dose-dependente. Sendo os resultados mais promissores na

concentração do OEZR de 600 e 150 μLmL^{-1} inibiu mais de 70% e 80% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer*, respectivamente. O presente estudo mostra que o óleo da casca tem potencial antifúngico satisfatório para ser utilizado no controle de fungos de pré e pós-colheita. A luz do conhecimento atual, este trabalho descreve pela primeira vez a composição química e atividade antifúngica do OEZR frente a diferentes fungos fitopatógenos, contribuindo para conhecimento da espécie, bem como da sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVES: Hidrodestilação, metabólitos secundários, fungicida natural, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer*.

ABSTRACT

LARA, LARISSA LIZ SOUSA. Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology - Campus Rio Verde - GO, November 2020. **Analysis of the chemical composition of the essential oil from bark of *Zanthoxylum riedelianum* and evaluation of its antifungal activity.** Advisor: Dr^a. Cristiane de Melo Casal. Co-supervisor: Dr^a. Cássia Cristina Fernandes Alves.

Sclerotinia sclerotiorum and *Rhizopus stolonifer* are phytopathogenic fungi that infect different cultures. The control of these pathogens has been done in great majority by synthetic fungicides, however there has been an increase in resistance to these pesticides. Given this, and the problems included in the use of such products for the environment and for human health, alternative methods of control have been studied, among them, the use of essential oils. Therefore, the present work aimed to analyze the chemical composition of the essential oil from stem bark of *Zanthoxylum riedelianum* (ZREO) (Rutaceae) and to evaluate its biological activity on *S. sclerotiorum* and *R. stolonifer*. The essential oil was obtained by hydrodistillation, its chemical composition was provided by GC-MS analysis and the antifungal potential was evaluated *in vitro* against *S. sclerotiorum* and *R. stolonifer* in PDA (Potato-dextrose-agar) culture medium. The hydrodistillation process provided an essential oil with an average yield of 0.02% ± 0.006, with a yellowish color and peculiar aroma. Chemical analysis revealed 13 different volatile compounds. The main compounds were E-nerolidol (67.21%), α -selinene (14.94%) and β -selinene (7.41%). ZREO had potential antifungal statement against *S. sclerotiorum* and *R. stolonifer* in all subjects, in a dose-dependent behavior. The most promising results was in the ZREO concentration of 600 and 150 μLmL^{-1} that

inhibited more than 70% and 80% of the mycelial growth of *S. sclerotiorum* and *R. stolonifer*, respectively. The present study shows that the bark oil has satisfactory antifungal potential to be used in control of pre- and post-harvest fungi. In the light of current knowledge, this work is the first that describe the chemical composition and antifungal activity of ZREO against different phytopathogenic fungi, contributing to the knowledge of the species, as well as its application.

KEYWORDS: Hydrodistillation, secondary metabolites, natural fungicide, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óleos essenciais

As plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que não têm função direta com o seu crescimento e desenvolvimento, essas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários ou produtos naturais (Taiz & Zeiger, 2013). Dentre esses, destacam-se os constituintes dos óleos essenciais que possuem diversas funções ecológicas (Nazzaro et al. 2017).

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias voláteis orgânicas, lipofílicas com baixo peso molecular, responsáveis pela fragrância de muitas plantas, autodefesa, atração e proteção contra perda de água e aumento de temperatura foliar, podendo ser extraídos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas que são submetidos por processos de destilação para sua obtenção (Hyldgaard et al. 2012; Morais et al. 2006; Silveira et al. 2012; Tariq et al. 2019).

Os compostos orgânicos voláteis produzidos como metabólitos secundários pelas plantas são constituídos de hidrocarbonetos (terpenos), compostos oxigenados (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) e compostos contendo nitrogênio (Nerio et al. 2010). A maior classe de produtos secundários são os terpenos, que são sintetizados a partir de acetil-CoA ou intermediários glicolíticos (Figura1) (Taiz & Zeiger, 2013).

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa, pois varia entre as espécies e partes de um mesmo vegetal, além disso, essas espécies botânicas podem ser afetadas pelo local de cultivo, técnica de extração, condições de coleta, diferentes estágios de desenvolvimento da planta e fatores climáticos (Matias et al. 2016; Miranda et al. 2016; Nea et al. 2020; Tanoh et al. 2020; Xavier et al. 2020).

A caracterização química torna possível conhecer os componentes do óleo

essencial de diversas espécies vegetais, e esses compostos químicos podem ser identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), por meio da comparação de seus espectros de massas e de seus índices de retenção com aqueles existentes na biblioteca do equipamento e na literatura (Adams, 2007; Brochini & Lago, 2007).

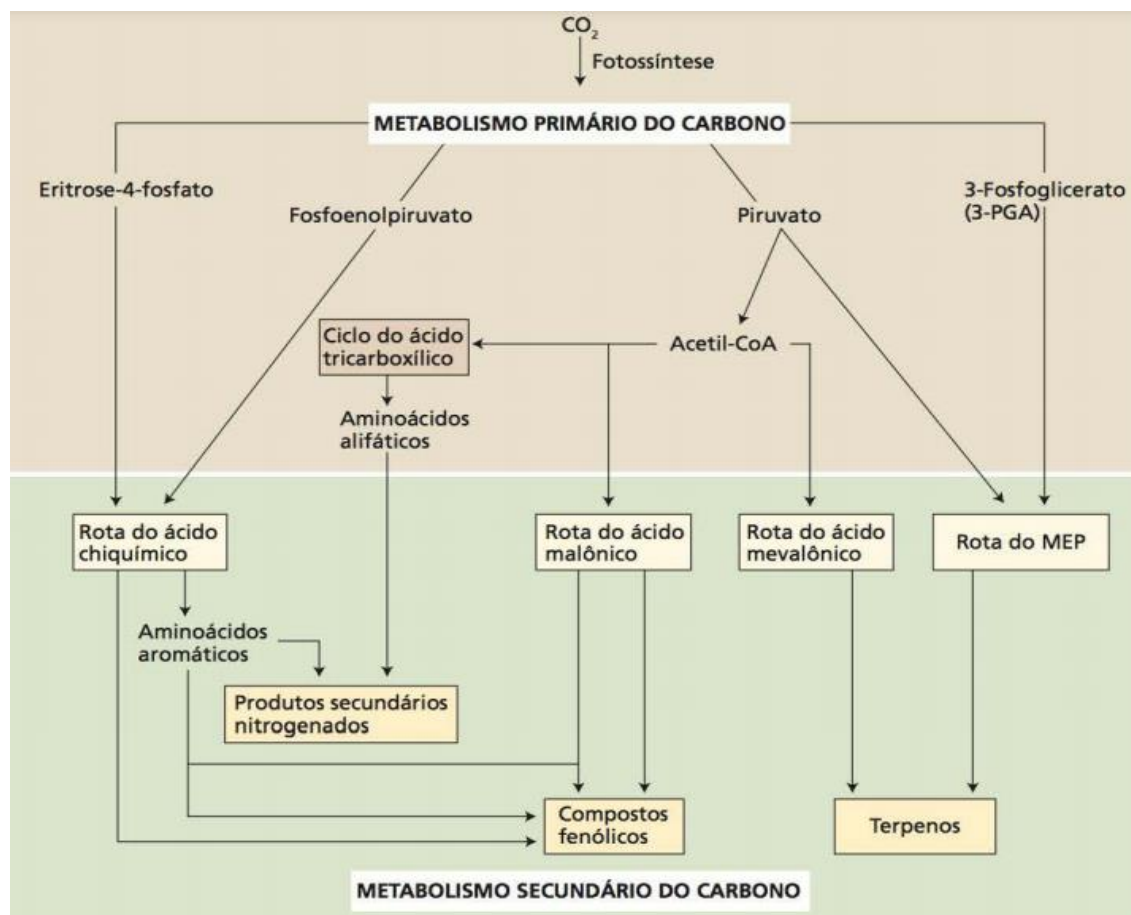


Figura 1: Biossíntese simplificada das principais rotas dos metabólitos secundários. Fonte: Taiz & Zeiger, (2013).

Devido os óleos essenciais apresentar diferentes compostos químicos e odor característico, os mesmos são bastante aplicados na agronomia, farmacologia como fins medicinal, perfumaria, cosmética e alimentos (Bizzo et al. 2009).

1.2 Potencial antifúngico dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são mencionados como possuidores de propriedades antifúngicas e estão sendo bastante utilizados na agricultura como método alternativo para o controle de insetos-praga e de doenças causadas por fungos, nematoides, vírus e bactérias (Santra & Banerjee, 2020; Soares et al. 2012).

Os efeitos antifúngicos dos óleos essenciais podem ser causados pelas propriedades dos compostos naturais, principalmente os terpenos e terpenoides que por sua natureza altamente lipofílica e baixo peso molecular são capazes de romper a membrana celular, causando morte celular ou inibindo a esporulação e germinação de fungos, além de causar vazamento de citoplasma e por inibir biossíntese de DNA (Nazzaro et al. 2017).

A revisão de D'agostino et al. (2019) relata que os óleos essenciais de algumas espécies das famílias geraniaceae, lauracea, apiaceae, myrtaceae e lamaceae possuem efeitos antifúngicos e são bastante promissores para tratamento de cepas. Além disso, descrevem os efeitos do mecanismo de ação dos compostos carvacrol, geraniol, cinamaldeído e timol sobre alguns fungos.

Estudo de Fonseca et al. (2015) mostrou que o óleo de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) reduziu acentuadamente o crescimento de vários fungos fitopatogênicos, dentre eles *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo que a redução do crescimento micelial foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações do óleo essencial. Os óleos essenciais das espécies *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum verum* e *Citrus paradisi* nas concentrações de 0,5% e 1% tiveram efeitos inibitórios nos fungos *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporium gypseum* (Meness & Zubov, 2019).

Davari & Ezazi (2017), em seu estudo observaram que os óleos essenciais de *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* e *Eucalyptus sp.* tem potencial antifúngico contra dez fungos fitopatogênicos, sendo que o óleo essencial de *Z. Majdae* na concentração de 1500 μL^{-1} inibiu completamente o crescimento de *Fusarium graminearum*, *Fusarium asiaticum*, *Fusarium redolens*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*.

O estudo de Prietro et al. (2011) avaliaram atividade antifúngica do óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum monophyllum*, *Z. rhoifolium* e *Z. fagara* contra *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, mostrando que *Zanthoxylum monophyllum* mostrou maior atividade em *Fusarium oxysporum* e *Z. fagara* foi mais ativo contra *Colletotrichum acutatum*.

Dessa forma, os óleos essenciais de algumas espécies demonstram ser uma alternativa viável para substituir os fungicidas sintéticos, com a finalidade de diminuir a quantidade dessas substâncias no meio ambiente. Alguns trabalhos já apresentaram atividades pesticidas utilizando óleo essencial dos frutos da espécie *Zanthoxylum*

riedelianum pertencente à família Rutaceae, porém até o momento não existe estudo com óleos essenciais da casca do caule (Costa et al. 2017; Pereira et al. 2018).

1.3 *Zanthoxylum riedelianum*

A espécie vegetal *Zanthoxylum riedelianum* Engl. conhecida popularmente como, laranjeira-brava, mamica, mamica-amarela, mamica-de-cadela, mamica-de-porca e mamicão, pertence ao gênero *Zanthoxylum* e a família Rutaceae (Beirigo et al. 2016; Pirani, 2002).

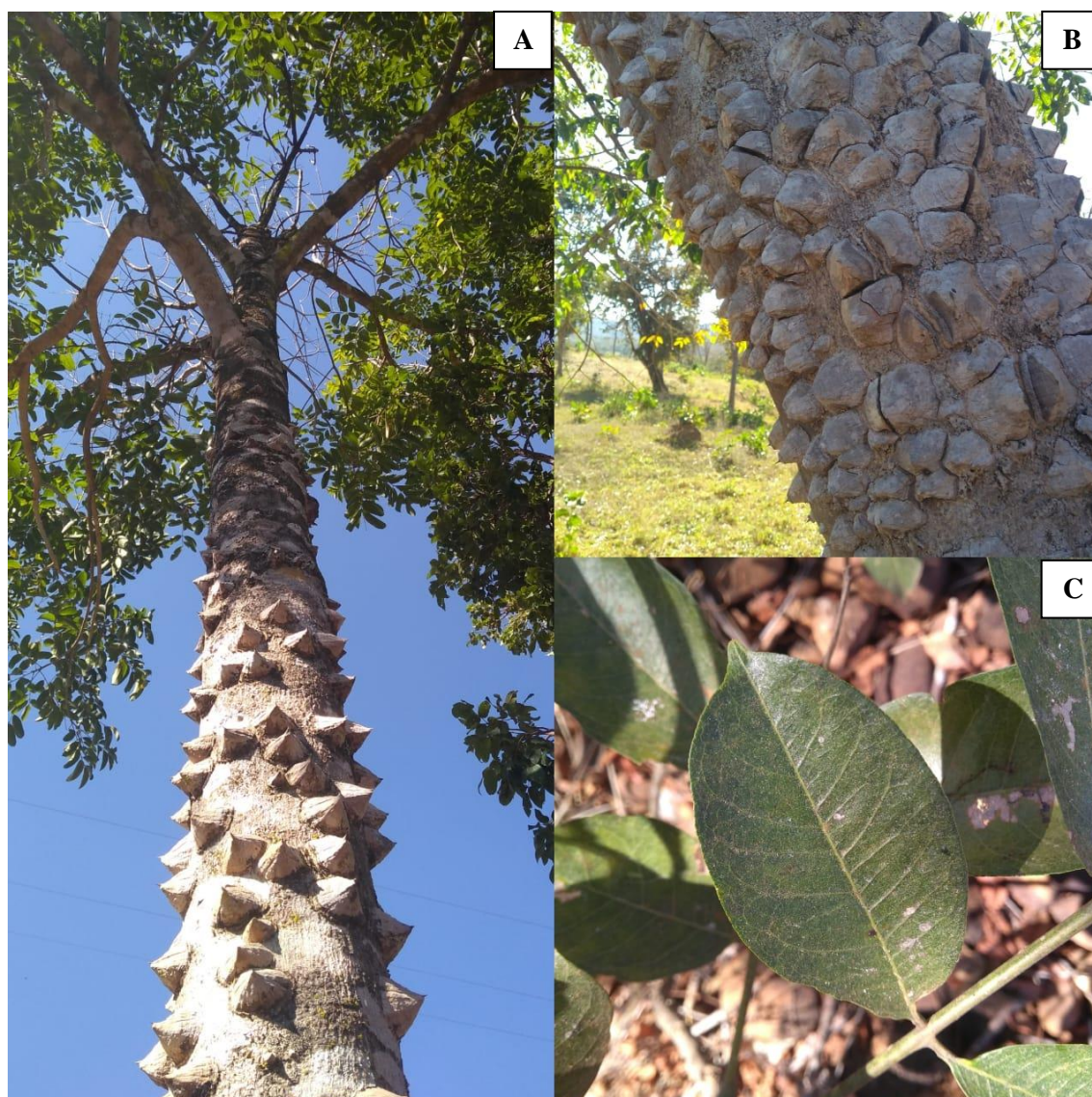


Figura 2: Árvore (A), tronco (B) e folhas (C) da espécie *Zanthoxylum riedelianum*, localizada na cidade de Israelândia-Goiás. Fonte: Própria (2019).

No Brasil a *Zanthoxylum riedelianum*, é mais comum no Centro-Oeste e Sudeste

(Minas Gerais e São Paulo), mais rara na Amazônia. Ocorre em diversos tipos de formações, principalmente matas úmidas, cerradões e cerrados, entre 400 e 1.500 m altitude. É bastante caracterizada por apresentar no seu tronco acúleos (Figura 2) espessos de 40 a 60 cm de diâmetro, que são utilizados comercialmente (Pirani, 2002).

A espécie *Z. riedelianum* já apresentou atividades biológicas, como anti-inflamatória, analgésica, reumatismo e manchas na pele (Fernandes et al. 2009; Lima et al. 2007). O estudo de Christofoli (2014) relata 28 constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*, sendo os compostos majoritários γ -elemeno (24,81%), fitol (18,16%), biciclogermacreno (16,18%), *cis*-nerolidol (8,26%) e D-germacreno (6,52%), que apresentou reduzem e inibição a postura de ovos e ninfas de *Bemisia tabaci* com eficiência acima de 80%. Já Guy et al. (2001) verificou nove compostos voláteis nas folhas, espatulenol (65,2%), aromadendreno (4,7%), óxido de cariofileno (3,7%), *cis*-nerolidol (1,9%), β -cariofileno(0,7%), β -elemeno (0,6%), δ -cadineno (0,6%), α -humuleno (0,3%) e limoneno (0,01%).

A composição química dos óleos essenciais dos frutos de *Z. Riedelianum*, no estudo de Costa et al. (2017) revelou 16 compostos diferentes, os principais foram γ -elemeno (21,19%), D-germacreno (14,23%), sabineno (11,89%) e limoneno (11,30%) que apresentou repelência e redução na taxa oviposição de *B. tabaci*. Pereira et al. (2018) mostraram em seu estudo 22 compostos orgânicos no óleo essencial dos frutos, sendo β -myrceno (22,79%), limoneno (29,22%), biciclogermacreno (18,13%) e D-germacreno (14,40%) os majoritários, apresentando na forma livre e nanoencapsulada potencial deterrente de oviposição e inseticida contra *B. tabaci*.

1.4 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo Ascomycota, ordem Helotiales, família *Sclerotiniaceae* e gênero *Sclerotinia*, que causa a doença conhecida popularmente como mofo branco e podridão de esclerotinia (Bolton et al. 2006). Esse patógeno está distribuído mundialmente e ataca diversas culturas de importância econômica, sendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras, tais como soja, girassol, canola, ervilhas, feijão, fumo, tomate, batata e plantas daninhas (García et al. 2012; Hu et al. 2018).

A infecção do fungo se encontra em condições favoráveis entre a temperatura de 20 a 25°C e ambientes com altas umidades (Gomes et al. 2017). A infecção acontece

quando *S. sclerotiorum* ataca as plantas hospedeiras por meio de ascósporos que podem ser descarregados à força para cima da apotecia para o ar, ou por micélio originado de tecido infectado ou de escleródios (estruturas de resistência) germinados (Xi et al. 2020). Em condições favoráveis e quando os ascósporos pousam no tecido suscetível do hospedeiro, o fitopatógeno pode germinar e iniciar um novo ciclo de infecção (Lehner et al. 2015; Leite, 2005; Xi et al. 2020).

Os sintomas causados pelo *S. sclerotiorum* (Figura 3) são observados a partir do desenvolvimento do micélio na superfície do órgão infectado, com aspecto cotonoso, de coloração parda e consistência mole, seguida pela produção de escleródios, inicialmente brancos, tornando-se negros quando maduros (Kreyci, 2016). Esses escleródios podem permanecer no solo por um longo tempo, aproximadamente uns oito anos, tornando difícil seu controle (Leite, 2005).

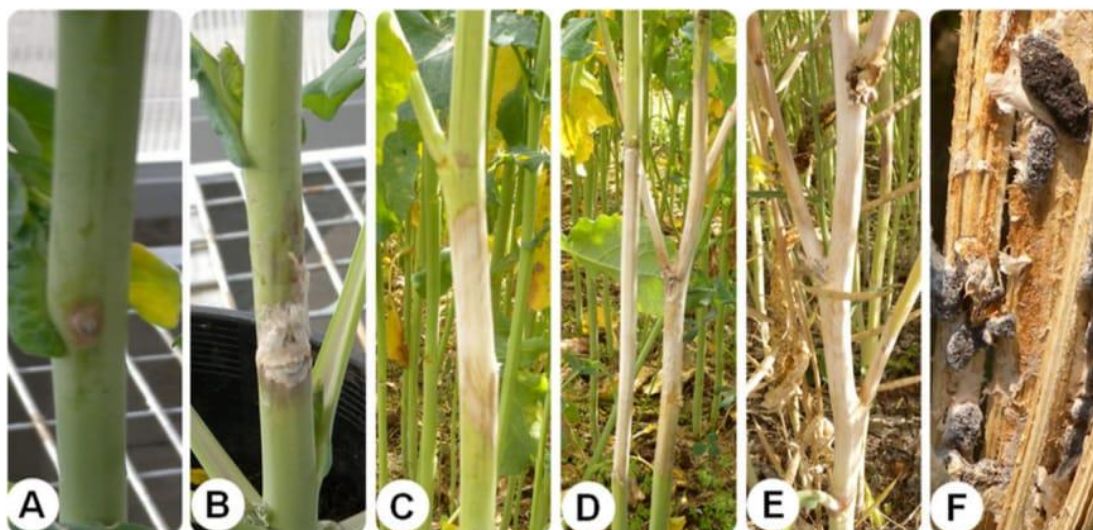


Figura 3: Sintomas causados pela *Sclerotinia sclerotiorum*. (A) Desenvolvimento inicial da lesão em caule. (B), (C) e (D) Expansão gradual da lesão. (E) Lesão cobre a planta inteira causando a morte da planta. (F) Escleródio desenvolvido dentro do caule morto. Fonte: Kamal et al. (2015).

De acordo com Henneberg et al. (2012), as epidemias causadas por esse agente fitopatogênico nas culturas, têm sido o responsável pela diminuição da produção em vários países, que chegam aproximadamente em perdas de 100%. A doença mofo branco causada pela *S. sclerotiorum* reduz aproximadamente 70% da produtividade da cultura de soja no Brasil, sendo que os estados mais afetados são Goiás, Bahia, Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do sul, São Paulo, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul (Meyer et al. 2016).

No Brasil *S. sclerotiorum* é considerado o fitopatógeno mais importante para cultura de girassol pelos prejuízos causados, em condições de alta umidade e baixa temperatura, o fungo impede o cultivo de girassol na região do Sul como cultura comercial (Oliveira et al. 2010). Os autores ainda relatam que *S. sclerotiorum* pode causar a queda de aquênios, resultando em perda total da produção.

Esse fitopatógeno causa também sérios problemas em plantios de hortaliças, tais como, abóbora, repolho, alface, tomate, batata, ervilha e dentre outras (Reis et al. 2007). Os prejuízos causados na alface (*Lactuca sativa*) por *S. sclerotiorum* pode alcançar a 100%, sendo um fato bastante preocupante aos produtores, pois em determinadas épocas do ano pelas condições favoráveis ao ataque do patógeno fica difícil de cultivar essa hortaliça (Silva et al. 2014).

Em consequência a estes problemas, é importante buscar medidas que visam combater esse fungo, tendo como base os produtos naturais.

1.5 *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) de Vuill

O *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., também é um fungo que causa diversos danos em culturas, considerado um dos principais causadores de doenças pós-colheita (Bassetto et al. 2007). O mesmo pertence ao filo Zygomycota, família Mucoraceae e gênero *Rhizopus*, conhecido popularmente como podridão mole e podridão de rhizopus (Sun et al. 2015).

Esse agente patogênico ataca diversas culturas como figo, mamão, tomate, maracujá, cenoura, morango e dentre outras (Oliveira & Santos-Filho, 2007; Reis & Costa, 2011). Essa doença desenvolve com maior intensidade após período chuvoso o que contribui para a queda de flores (Bomfim et al. 2010). O *Rhizopus stolonifer* pode ser encontrado em material orgânico no solo, frutos caídos em contato com solo podem ser infectados com o fungo, que produz muitos esporos e contribui para disseminação do patógeno pelo ar (Baggio, 2012).

A contaminação inicia quando o fungo invade os tecidos através de ferimentos, apodrecendo frutos inteiros, que é caracterizada por lesões aquosas irregulares, que rapidamente aumentam de tamanho, tornando-se cobertas por um micélio branco e (Figura 4), em seguida, por uma massa de esporângios negros (Oliveira & Santos-Filho, 2007; Reis & Costa, 2011).

A doença causada pelo *R. stolonifer* possui grande importância econômica para a gravioleira (Junqueira & Junqueira, 2014). Uns dos primeiros relatos dessa doença foram no Distrito Federal, e provocaram prejuízos significativos em cultura de gravioleira por causar perdas dos frutos na pré e pós-colheita (Junqueira et al. 1996).



Figura 4: *Rhizopus stolonifer* em fruto de morangueiro. Fonte: Reis & Costa, (2011).

O estudo de Lopes et al. (2010), relata que o *R. stolonifer* é um dos fitopatógenos mais importantes em causar danos em frutos de morango em pós-colheita na região serrana do Espírito Santo, os mesmos observaram que o fungo tende a ser mais frequentes em meses chuvosos, temperaturas mais altas e em período de armazenamento. Esse fitopatógeno também é um dos principais fungos que causam perdas qualitativas e quantitativas em culturas de pêsego (Abreu et al. 2008).

Devido a esses prejuízos, buscam pesquisas alternativas para minimizar/combater essa doença, pela crescente preocupação com a segurança ambiental e a procura por alimentos mais seguros, além da preocupação econômica (Cia et al. 2010).

1.6 Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer*

O principal método utilizado na agricultura no controle de fungos são os compostos químicos sintéticos ou combinações destes (Meyer et al. 2015). Para controle

de *S. sclerotiorum*, os fungicidas eficientes estão distribuídos em diferentes grupos relacionados ao seu modo de ação, dentre eles, o fluazinam (Figura 5) que é um inibidor da fosforilação oxidativa, atuando sobre a respiração do patógeno (Meyer et al. 2018).

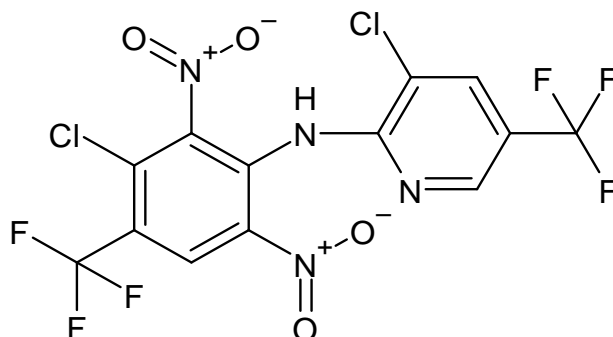


Figura 5: Estrutura química do fluazinam.
Fonte: Própria (2019).

A utilização de fungicidas no campo para o controle do *R. stolonifer* podem diminuir a incidência dessa doença, pela redução do inóculo e o número de lesões causadas por outros patógenos (Oliveira & Santos-Filho, 2007). O Dicloran (Figura 6) está entre os principais fungicidas sintéticos usados para controlar a doença causada por esse fitopatógeno (Del Valle et al. 2008).

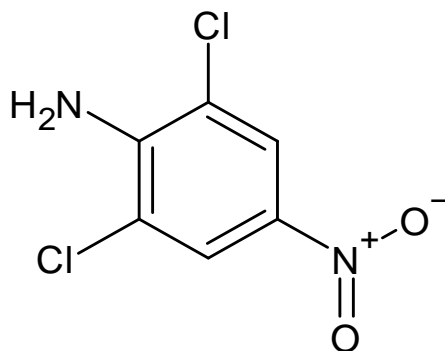


Figura 6: Estrutura química do dicloran. Fonte: Própria (2019).

Contudo, a aplicação contínua dos produtos sintéticos tem sido a principal causa de efeitos negativos não intencionais, incluindo resistência de patógenos, comprometimento no meio ambiente e na saúde humana por serem altamente tóxicos (Diniz et al. 2008; Zhou et al. 2019).

A revisão de Lopes & Albuquerque (2018), demonstra que os impactos dos agrotóxicos vão desde composição do solo, passando para contaminação da água e do

ar, podendo causar grandes problemas nos organismos aquáticos e terrestres, além disso, toda essa alteração do ecossistema, animais e vegetais usados na alimentação humana também podem interferir de forma negativa a saúde humana.

Algumas pesquisas identificaram agrotóxicos nos alimentos, indicando risco para saúde humana, Lorenz et al. (2014), em seu estudo detectaram e quantificaram amostras de pesticidas em maçã, tomate e morango produzidas e comercializadas no estado de Santa Catarina. Um estudo também demonstrou que alguns compostos sintéticos foram encontrados em amostras de laranjas na cidade de São Paulo, sendo que alguns desses pesticidas encontrados estavam acima do limite máximo de resíduos (Nakano et al. 2016).

Segundo o Instituto Federal de Câncer (2019) a exposição aos agrotóxicos pode causar uma série de doenças dependendo do produto que foi utilizado, tempo de exposição e quantidade de substância absorvida pelo organismo, e os efeitos causados da exposição podem ser agudos (aparecimento rápido dos sintomas) ou crônicos (que os sintomas aparecem após exposições repetidas a pequenas quantidades por um período prolongado).

Nesse sentido, métodos alternativos estão sendo avaliados para serem utilizados no controle desses fungos fitopatogênicos. Substâncias derivadas de plantas como os óleos essenciais vêm sendo estudadas pelo seu efeito inibidor no desenvolvimento dos fungos (Silva et al. 2012). Alguns estudos com óleo essencial já apresentaram efeito antifúngico sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer* (Al-Maskri et al. 2011; Dias et al. 2019; Silva et al. 2018).

De acordo com Valadares et al. (2018) os óleos essenciais extraídos das inflorescências e folhas de *Piper aduncum* apresentaram alto potencial antifúngico sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando que doses a partir de 20 µL do óleo essencial das inflorescências não diferiram estatisticamente do fungicida comercial Frownicide 500 SC, utilizado como controle positivo e as doses acima de 10 µL apresentou valores de inibição acima de 95%. Xavier et al. (2016) mostraram em seu estudo que diferentes doses do óleo essencial das folhas de *Cardiopetalum calophyllum* apresenta inibição sobre *S. sclerotiorum*, sendo que a maior inibição foi a dosagem de 300 µL com 87,63%.

O estudo de Elizei et al. (2016) mostrou que nas concentrações de 1500 e 2000 µLL⁻¹, o óleo essencial de café verde em contato direto proporcionou redução da esporulação do fungo *R. stolonifer*, sendo estatisticamente semelhante ao óleo essencial

de cravo-da-índia. O óleo essencial de *Melissa officinalis* apresentou ação antifúngica *in vitro* pela técnica de intoxicação alimentar e pelo teste de atividade volátil sobre *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*, doenças pós-colheita de maçã (El Ouadi et al. 2017).

Apesar desses estudos sobre as atividades biológicas dos óleos essenciais no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer*, ainda não há relatos sobre ação de óleos essenciais da casca do caule de *Z. riedelianum* no controle desses fungos fitopatogênicos, demonstrando a importância de maiores estudos.

1.7 Referências bibliográficas

- Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Illinois (IL): Allured Publishing Corporation.
- Abreu FM, Lourenço SA, Bassetto E, Gonçalves FP, Martins MC, Amorim L. (2008). Effect of sanitizing products on the postharvest control of brown rot (*Monilinia fructicola*) and soft rot (*Rhizopus stolonifer*) in peaches. Summa Phytopathol. 34: 86-88.
- Al-Maskri AY, Hanif MA, Al-Maskari MY, Abraham AS, Al-Sabahi JN, Al-Mantheri O. (2011). Essential oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): a desert crop. Nat. Prod. Commun. 6: 1487-1490.
- Baggio JS. (2012). Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da podridão mole. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) apresentada a Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bassetto E, Amorim L, Benato EA, Gonçalves FP, Lourenço SA. (2007). Effect of UV-C irradiation on postharvest control of brown rot (*Monilinia fructicola*) and soft rot (*Rhizopus stolonifer*) of peaches. Fitopat. Bras. 32: 393-399.
- Beirigo PJS, Torquato H FV, Santos CHC, Carvalho MG, Castro RN, Paredes-Gamero E J, Sousa PT, Jacinto MJ, Silva VC. (2016). [1-8-NαC]-Zanriorb A1, a proapoptotic orbitide from leaves of *Zanthoxylum riedelianum*. J. Nat. Prod. 79: 1454-1458.
- Bizzo H, Hovell AMC, Rezende CM. (2009). Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives. Quím. Nova, 32: 588-594.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol. Plant Pathol. 7: 1-16.
- Bomfim MP, São José AR, Rebouças TNH, Almeida SS, Souza IVB, Dias NO. (2010). Antagonistic effect *in vitro* and *in vivo* of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit. Summa Phytopathol. 36: 61-67.
- Brochini CB, Lago JH. (2007). Use of chromatographic and spectrometric techniques to help the identification of volatile compounds. Rev. Bras. Farmacogn. 17: 266-270.
- Cia P, Benato EA, Pascholati SF, Garcia EO. (2010). Chitosan on the postharvest control of soft rot in 'rama forte' persimmon. Bragantia. 69: 745-752.
- Christofoli M. (2014). Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius)

- biótipo B. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Rio Verde.
- Costa ECC, Christofoli M, Costa GCDS, Peixoto MF, Fernandes JB, Forim MR, Pereira KDC, Silva FG, Cazal CDM. (2017). Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). *Sci. Hortic.* 226: 327-332.
- D'agostino M, Tesse N, Frippiat JP, Machouart M, Debourgogne A. (2019). Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules.* 24: 3713.
- Davari M, Ezazi R. (2017). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus sp.* against some important phytopathogenic fungi. *J. Mycol. Med.* 27: 463-468.
- Del Valle MG, Baños SB, Lauzardo ANH, Sánchez MGG, Lazcano EA. (2008). Control strategies of *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, causal agent of posharvest rots in agricultural products. *Rev. mex. fitopatol.* 26: 49-55
- Dias ALB, Sousa WC, Batista HRF, Alves CCF, Souchie EL, Silva FG, Pereira PS, Sperandio EM, Cazal CM, Forim MR, Miranda MLD. (2019). Chemical composition and *in vitro* inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Braz. J. Biol.* 80: 460-464.
- Diniz SPSS, Coelho JS, Rosa GS, Specian V, Oliveira RC, Oliveira RR. (2008). Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai.* 10: 9-11.
- Elizei VG, Chalfoun SM, Botelho DMS, Rebelles P PR. (2016). Antifungal activity, *in vitro*, of the green coffee oil. *Arq. Inst. Biol.* 83: 1-4.
- El Ouadi Y, Manssouri M, Bouyanzer A, Majidi L, Bendaif H, Elmsellem H, Shariati MA, Melhaoui A, Hammouti B. (2017). Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microb. Pathog.* 107: 321-326.
- Fernandes CC, Vieira PC, Silva VC, Dall'oglio EL, Silva LES, Sousa Jr PT. (2009). 6-Acetyl-N-methyl-dihydrodecarine, a new alkaloid from *Zanthoxylum riedelianum*. *J. Braz. Chem. Soc.* 20: 379-382.
- Fonseca MCM, Lehner MS, Gonçalves MG, Paula Júnior TJ, Silva AF, Bonfim FPG, Prado AL. (2015). Potential of essential oils from medicinal plants to control plant pathogens. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai.* 17: 45-50.
- Garcia R,Á, Juliatti FC, Cassemiro TA. (2012). Production of sclerotia on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary in culture media. *Biosci. J.* 28: 1-7.
- Gomes RSS, Araujo AE, Nascimento LC, Feitoza EDA, Demartelaere ACF. (2017). Caracterização da *Sclerotinia sclerotiorum*, transmissão e qualidade fisiológica em sementes de algodoeiro. *Acta Iguazu.* 6:105-113.
- Guy I, Charles B, Guinaudeau H, Ferreira ME, Arias AR, Fournet A. (2001). Essential oils from *Zanthoxylum chiloperone* and *Z. riedelianum* growing in Paraguay. *Pharm. Biol.* 39: 152-154.
- Henneberg L, Grabicoski EMG, Jaccoud-Filho DS, Panobianco M. (2012). Incidence of *Sclerotinia sclerotiorum* on soybean seeds and sensitivity of detection tests. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47: 763-768.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microb.* 3: 1-24.

- Hu S, Zhang J, Zhang Y, He S, Zhu F. (2018). Baseline sensitivity and toxic actions of boscalid against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Prot.* 110: 83-90.
- Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. (2019). Agrotóxico. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 21 de outubro de 2020.
- Junqueira NTV, Cunha MM, Oliveira MAS, Pinto ACQ. (1996). Graviola para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: Embrapa-SPI, 67 p. (Série publicações técnicas FRUPEX, 22).
- Junqueira NTV, Junqueira, KP. (2014). Principais doenças de Anonáceas no Brasil: descrição e controle. *Rev. Bras. Frutic.* 36: 55-64.
- Kamal MM, Savocchia S, Lindbeck KD, Ash GJ. (2015). Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. *Australas. Plant Pathol.* 45: 1-14.
- Kreyci PF. (2016). *Sclerotinia sclerotiorum*: característica morfológicas, agressividade, sensibilidade “in vivo” a fungicidas e resistências de isolados a tiofanato metílico. 2016. 149 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) apresentada a Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Lima LM, Perazzo FF, Carvalho JCT, Bastos JK. (2007). Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. *J. Pharm. Pharmacol.* 59: 1151-1158.
- Leite RMVBC. (2005). Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, 3 p. (Comunicado Técnico 76).
- Lehner MS, Paula Junior TJ, Hora Junior BT, Teixeira H, Vieira RF, Carneiro JES, Mizubuti ESG. (2015). Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro scales. *J. Plant Pathol.* 64, 921-931.
- Lopes CVA, Albuquerque GSC. (2018). Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. *Saúde em debate*, 42: 518-534.
- Lopes UP, Zambolim L, Costa H, Pereira OL, Lopes UN, Ricci PC, Costa AF. (2010). Doenças em pós-colheita de morango na região serrana do Espírito Santo. 2010. *Hort. Bras.* 28: S1066-S1072.
- Lorenz JG, Costa LLF, Suchara EA, Sant'Anna ES. (2014). Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian South. *J. Braz. Chem. Soc.* 25: 1583-1591.
- Matias EF, Alves EF, Silva MK, Carvalho VR, Figueredo FG, Ferreira J V, Coutinho HDM, Silva JMFL, Ribeiro-Filho J, Costa JG. (2016). Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Ind. Crops Prod.* 87: 45-53.
- Meness LR, Zubov T. (2019). The Inhibitory Effect of Essential Oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. *Science*, 50: e18–e22.
- Meyer MC, Campos HD, Godoy CV, Utiamada CM, Pimenta CB, Jaccoud-Filho DS, Borges EP, Siqueri FV, Juliatti FC, Nunes-Junior J, Carneiro LC, Silva LHCP, Sato LN, Madalosso M, Martins MC, Balardin RS, Silva SA, Venancio WS. (2015). Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2014/2015: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 4 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 114).
- Meyer MC, Campos HD, Godoy CV, Utiamada CM, Pimenta CB, Jaccoud-Filho DS,

- Borges EP, Juliatti FC, Nunes-Junior J, Carneiro LC, Silva LHCP, Sato LN, Madalosso M, Goussain M, Martins MC, Debortoli MP, Balardin RS, Venancio WS. (2016). Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122).
- Meyer MC, Campos HD, Godoy CV, Utiamada CM, Seii AH, Dias AR, Jaccoud-Filho DS, Borges EP, Juliatti FC, Nunes-Junior J, Silva LH CP, Sato LN, Martins MC, Venancio WS. (2018). Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 140).
- Miranda CASF, Cardoso MG, Batista LR, Rodrigues LMA, Figueiredo ACS. (2016). Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. *Rev. Ciênc. Agron.* 47: 213-220.
- Morais SM, Catunda-Junior FEA, Silva ARA, Neto JSM, Rondina D, Cardoso JHL. (2006). Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. *Quím. Nova.* 29: 907-910.
- Nakano VE, Kussumi TA, Lemes VRR, Kimura IA, Rocha SB, Alaburda J, Oliveira MCC, Ribeiro RA, Faria ALR, Waldhelm KC. (2016). Evaluation of pesticide residues in oranges from São Paulo, Brazil. *Food Sci. Technol.* 36: 40-48.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo VD. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10: 86-106.
- Nea F, Kambiré DA, Genva M, Tanoh EA, Wognin EL, Martin H, Brostaux Y, Tomi F, Lognay GC, Tonzibo ZF, Fauconnier ML. (2020). Composition, seasonal variation, and biological activities of *Lantana camara* essential oils from côte d'Ivoire. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25: 2400-2422.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* 101: 372-378.
- Oliveira ACB, Rosa APSA, Brighenti AM, Carvalho CGP, Aguiar G, Loro JC, Caraffa M, Leite RMVBC. (2010). Manejo da cultura do girassol - uma abordagem técnica de uso prático. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 46 p.
- Oliveira AAR, Santos-Filho HP. (2007). Podridão de *Rhizopus*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 26.
- Pereira KC, Quintela ED, Silva DJ, Nascimento VA, Rocha DVM, Silva JFA, Forim MR, Silva FG, Cazal CM. (2018). Characterization of nanospheres containing *Zanthoxylum riedelianum* fruit essential oil and their insecticidal and deterrent activities against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Molecules.* 23: 1-19.
- Pietro JA, Patiño O, Delgado WA, Moreno JP, Cuca LE. (2011). Chemical composition, insecticidal, and antifungal Activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. *Chil. J. Agric. Research.* 71: 73-82.
- Pirani JR. Rutaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS, Bittrich V, Kameyama C. (2002). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Editora Hucitec, 2, 281-308.
- Reis A, Costa H. (2011). Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. Brasília: Embrapa Hortaliças, 9 p. (Embrapa Hortaliça. Circular Técnica, 96).
- Reis A, Costa H, Lopes CA. (2007). Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças, 5 p. (Embrapa Hortaliça. Comunicado Técnico, 45).
- Santra HK, Banerjee D. (2020). Natural products as fungicide and their role in crop

- protection. *Nat. Bioactive Prod. in Sustain. Agr.* 131-219.
- Silva EAJ, Silva VP, Alves CCF, Alves JM, Souchie EL, Barbosa LCA. (2018). Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Semin. Ciênc. Agrár.* 39: 865-874.
- Silva GBP, Heckler LI, Blume E, Santos RF. (2014). Alfaca: alvo fácil (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Cultivar HF (Pelotas)*, 89: 10-11.
- Silva JS, Oliveira RC, Diniz SPSS. (2012). Bioactivity of essential oils of *Mentha arvensis* L. in the control of phytopathogenic fungi. *Pesq. agropec. pernamb.* 17: 99-100.
- Silveira SM, Cunha-Júnior A, Scheuermann GN, Scchi FL, Verruk S, Krohn M, Vieira RW. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (*eucalyptus*) and *Lavandula angustifolia* (lavender). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 71: 471-80.
- Soares CSA, Silva M, Costa MB, Bezerra CES, Carvalho LM, Soares AHV. (2012). Insecticidal activity of essential oils on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) in roses. *Rev. Bras. Agroecol.* 7: 169-175.
- Sun Y, Gu X, Wang Z, Huang Y, Wei Y, Zhang M, Tu K, Pan L. (2015). Growth simulation and discrimination of *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum acutatum* using hyperspectral reflectance Imaging. *PLOS ONE*, 10.
- Taiz L, Zeiger E. (2013). Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: *Fisiologia vegetal*. 5 ed., Artmed, 918 p.
- Tanoh EA, Boué GB, Nea F, Genva M, Wognin EL, Ledoux A, Martin H, Tonzibo ZF, Frederich M, Fauconnier ML. (2020). Seasonal effect on the chemical composition, insecticidal properties and other biological activities of *Zanthoxylum leprieurii* Guill. & Perr. essential oils. *Foods*. 9: 550.
- Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* 134.
- Valadares ACF, Alves CCF, Alves JM, Deus IPB, Oliveira-Filho JG, Santos TCL, Dias HJ, Crotti AEM, Miranda MLD. (2018). Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *An. Braz. Acad. Sci.* 90: 2691-2699.
- Xavier J, Alves N, Setzer WN, Silva J. (2020). Chemical diversity and biological activities of essential oils from *Licaria*, *Nectrandra* and *Ocotea* Species (Lauraceae) with Occurrence in Brazilian Biomes. *Biomolecules*. 10: 869.
- Xavier MN, Alves JM, Carneiro NS, Souchie EL, Silva EAJ, Martins CHG, Ambrosio MALV, Egea MB, Alves CCF, Miranda MLD. (2016). Chemical composition from essential oil of *Cardiopetalum calophyllum* Schltld. (Annonaceae) and their antioxidant, antibacterial and antifungal activities. *Rev. Virt. Quím.* XX.
- Xia S., Xu Y., Hoy R., Zhang, J., Qin L., Li, X. (2019). The Notorious Soilborne Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: An Update on Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*. 9: 27-49.
- Zhou L, Zhang Z, Wei M, Xie Y, He S, Shi H, Lin Z. (2019). Evaluation of the antifungal activity of individual and combined monoterpenes against *Rhizopus stolonifer* and *Absidia coerulea*. *Environ. Sci. Pollut. R.* 26: 7804-7809.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a composição química do óleo essencial do cerne e da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) e avaliar a atividade biológica do mesmo sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer*.

2.2 Específicos

- Obter o rendimento médio do óleo essencial do cerne e da casca do caule da espécie *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae);
- Analisar a composição química dos óleos essenciais por Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais extraídos frente aos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer*.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Natural Product Research)

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DO CAULE DE *Zanthoxylum riedelianum*.

Resumo

O *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer* são fungos fitopatogênicos que infectam diversas culturas. Os óleos essenciais vêm sendo utilizados como método alternativo ao controle químico. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a composição química do óleo essencial do cerne e da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum* (OEZR) e avaliar seu potencial antifúngico. O ZREO obtido por hidrodestilação foi analisado por GC-MS e avaliado quanto à atividade antifúngica *in vitro*. Os compostos majoritários da análise química foram *E*-nerolidol (67,21%), α -selinene (14,94%) e β -selinene (7,41%). OEZR demonstrou potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer* em todas as concentrações avaliadas, em um comportamento dose-dependente. Sendo os resultados mais promissores contra *R. stolonifer*, em que a concentração de $150 \mu\text{LmL}^{-1}$ inibiu mais de 80% do crescimento micelial. A luz do conhecimento atual, este trabalho descreve pela primeira vez a composição química e atividade antifúngica.

Palavras-chaves: *Zanthoxylum riedelianum*, Rutaceae, *E*-nerolidol, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer*

3.1 Introdução

Os fungos fitopatogênicos afetam diversas culturas e atualmente esta causando danos consideráveis. Dentre os principais fungos de pré-colheita, destacam-se a *Sclerotinia sclerotiorum*, o agente causador da doença mofo branco que apresenta alto potencial de causar prejuízo à soja, ervilha, feijão e outras culturas de importância econômica (Mathews et al. 2019; Sang et al. 2019; Westrick et al. 2019). Já fungos de pós-colheita, como *Rhizopus stolonifer* causa a doença podridão mole em diversas frutas, afetando a sua qualidade e validade dos mesmos (Zhou et al. 2017; Ramos-Guerrero et al. 2018).

O controle desses fungos normalmente é realizado utilizando substâncias químicas sintéticas (Oliveira et al. 2019). Entretanto, o uso excessivo desses defensivos agrícolas seleciona indivíduos resistentes, tornando-os ineficiente no controle desses agentes, além de causarem diversos danos à saúde humana e ao meio ambiente (Oliveira et al. 2016; Ootani et al. 2013). Com o objetivo de melhorar a produção agrícola e diminuir os impactos ambientais, substâncias naturais podem ser utilizadas como alternativa de controle (Whiley et al. 2018).

Os óleos essenciais (OEs) são alternativa promissora, pois têm revelado em vários estudos seu potencial fungicida (Dias et al. 2019; El Ouadi et al. 2017; Ghasemi et al. 2020; Ma et al. 2015; Maness e Zubov, 2019; Sati et al. 2013; Singh et al. 2016). Os compostos químicos encontrados nos óleos essenciais são produzidos como metabólitos secundários pelas plantas, que possuem baixo peso molecular e são constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e compostos oxigenados (Nerio et al. 2010; Pandini et al. 2018).

Alguns estudos utilizando OEs do gênero *Zanthoxylum* mostraram o potencial destes no controle de pragas agrícolas (Christofoli et al. 2015; Costa et al. 2017; Pereira et al. 2018). O gênero *Zanthoxylum* pertencente à família Rutaceae, possui aproximadamente 250 espécies que são bastante caracterizadas por apresentarem acúleos no caule (Pirani e Devecchi, 2018).

Dentre as espécies, encontra-se *Zanthoxylum riedelianum* Engl, conhecida popularmente como mamica de porca, comumente encontrada no Centro-Oeste (Beirigo et al. 2016). *Z. riedelianum* é muito utilizada na medicina popular em diferentes tipos de inflamações, reumatismo e manchas na pele (Fernandes et al. 2009). Estudos recentes relatam a mortalidade de ninfas e redução significativa na taxa de oviposição de

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae), utilizando óleos essenciais dos frutos dessa espécie (Costa et al. 2017; Pereira et al. 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico do óleo essencial do cerne e casca do caule de *Z. riedelianum* e avaliar a atividade antifúngica do mesmo sobre *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer*.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal

A casca do caule e o cerne de *Z. riedelianum* foram coletados em uma zona rural no município de Israelândia, Goiás, Brasil (16°18'49.2" S, 50°53'22.4" W). A exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde sob o número de registro IFRV 1001.

3.2.2 Extração do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial o cerne e a casca do caule de *Z. riedelianum* foram desfibradas e trituradas. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de hidrodestilação por 3 horas, utilizando o aparelho Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 3 L, e foi colocado 300 g do material vegetal submersas em 1200 mL de água destilada, com aquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. O hidrolato foi submetido à extração líquido/líquido em funil de separação com 10 mL de diclorometano em triplicata. Em seguida, a fase orgânica foi recolhida e seca por sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), seguido por filtração. O solvente foi removido por pressão reduzida por meio de um evaporador rotativo e o óleo essencial foi armazenado sob refrigeração até a análise e testes.

O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo essencial obtido com a massa de material vegetal utilizado na extração.

3.2.3 Identificação da composição química do óleo essencial

O óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum* foi dissolvido em acetona e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando o aparelho PerkinElmer® Clarus® SQT8 com uma coluna PerkinElmer® Elite-5ms (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 µm). A temperatura da coluna foi programada com temperatura inicial de 60°C com elevação da temperatura a 240°C na

razão de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e elevação para 280°C com razão de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O gás de arraste foi o He a taxa de fluxo de 20 mLmin^{-1} .

O equipamento foi ajustado para operar no modo de injeção, o volume de injeção foi de $1 \mu\text{l}$ (split de 1:10) e as temperaturas do injetor e o detector foram mantidos a 240 e 280°C , respectivamente. A concentração relativa dos componentes foi obtida em porcentagem (%) da área do pico correspondente em relação à área total dos picos.

A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada no índice de retenção linear (índice de Kovats (IK)) calculado em relação aos tempos de retenção da série homóloga de n-alcenos (C-07 a C-30) e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas da biblioteca do equipamento, por comparação destes com dados da literatura (Adams, 2007).

3.2.4 Avaliação do efeito antifúngico do óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum* frente aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer*.

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673) foi fornecido pela Embrapa Arroz e Feijão, com sede em Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. E o isolado de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., foi coletado em novembro de 2018, por isolamento direto de estruturas fúngicas de uvas infectadas. Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório de microbiologia agrícola do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

A atividade antifúngica do óleo essencial da casca do caule de *Z. riedelianum* foi avaliada seguindo a metodologia de difusão de disco descrita por Diánez et al. (2018) com algumas modificações, em concentrações de 37,5, 75, 150, 300, 600 μLmL^{-1} em Tween 80 a 5%. Utilizou-se um controle Tween 80 a 5% (v/v) e controle negativo (contendo apenas o micélio) como testemunha.

As placas de Petri foram previamente esterilizadas e preparadas com meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). Após a solidificação do meio, $100 \mu\text{L}$ das suspensões do óleo essencial e solução Tween 80 a 5% foram adicionados separadamente e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície de toda placa. Posteriormente, foram depositados discos de 5 mm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio no centro da placa, seladas com parafilme e incubados a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$

com fotoperíodo de 12 horas. Utilizando um paquímetro foi medido diariamente o crescimento micelial do diâmetro das colônias existentes até o crescimento total das colônias na placa controle negativo.

A atividade antifúngica foi determinada pela média das repetições de cada tratamento em relação ao crescimento da testemunha, através do percentual de Inibição do Crescimento Micelial (Al-Reza et al. 2010), cuja fórmula é:

$$\text{ICM} = \frac{\text{crescimento controle} - \text{crescimento tratamento}}{\text{crescimento controle}} \times 100\%$$

O tratamento foi realizado em quadruplicata e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizada no programa computacional R, sendo a comparação entre médias feita pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e discussão

A partir do processo de hidrodestilação do cerne de *Z. riedelianum* não houve nenhum aparecimento de óleo essencial. Já a casca do caule dessa espécie forneceu óleo essencial amarelado com rendimento médio $0,02\% \pm 0,006$. No apêndice A está apresentado o número de extrações, a massa do material vegetal, massa e rendimento dos óleos essenciais obtidos.

A análise química do óleo essencial revelou 13 compostos voláteis diferentes (Tabela 1). O cromatograma obtido da casca do caule de *Z. riedelianum* está apresentado no Apêndice B. Os compostos majoritários foram *E*-nerolidol (67,21%); α -selineno (14,94%); β -selineno (7,41%). As estruturas químicas dos compostos identificados se encontram no Apêndice C.

Estudos da composição química do óleo essencial de outras partes da espécie *Z. riedelianum* têm sido realizados, verificando que somente o β -elemeno e β -cariofileno encontrados neste trabalho, também foram identificados nos frutos e folhas. O estudo de Costa et al. (2017) identificaram γ -elemeno (21,19%), D-germacreno (14,23%), sabineno (11,89%) e limoneno (11,30%) como compostos majoritários encontrados no óleo essencial dos frutos de *Z. riedelianum*. Já Pereira et al. (2018) verificaram em seu estudo que os compostos principais dos frutos são o limonene (29,22%), β -myrceno (22,79%), germacreno D (14,40%) e bicyclogermacreno (18,13%).

Tabela 1: Composição química do óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum*.

Composto	TR (min)	RI _{EXP}	RI _{LIT}	% RA
4-Hidroxi-4-metilpentan-2-ona	3.694	830	831	1,50
(E)-Hex-3-en-1-ol	3.974	846	844	0,02
(E)-Hex-2-en-1-ol	4.204	855	854	0,06
Decano	7.740	998	1000	0,06
β -elemeno	23.597	1385	1389	3,36
β -cariofileno	24.777	1413	1417	0,86
Trans- α -bergamoteno	25.397	1429	1432	2,68
β -selineno	27.573	1483	1489	7,41
α -selineno	27.903	1491	1498	14,94
<i>E</i> -nerolidol	30.620	1561	1561	67,21
NI	32.810	1618		1,41
Hexadecan-1-ol	41.859	1872	1874	0,41
Pimaradieno	44.330	1953	1948	0,07
Total				100

TR: Tempo de retenção; **RI_{EXP}:** Índice de retenção em relação aos *n*-alcanos (C₇-C₃₀); **RI_{LIT}:** Índice de retenção encontrado na literatura (Adams 2007); **% RA:** Porcentagem da área relativa; **NI:** Não identificados.

Outro estudo sobre essa mesma espécie verificou spathulenol (65,2%), aromadendreno (4,7%), *cis*-nerolidol (1,9%), β -elemeno (0,6%), β -caryophylleno (0,7%) e outros componentes no óleo essencial das folhas (Guy et al. 2001). Os compostos químicos majoritários encontrados no óleo essencial (OE) das cascas de *Zanthoxylum riedelianum* diferem com os de maior porcentagem das folhas e frutos da mesma espécie. Entretanto, são partes aéreas diferentes coletadas em diferentes regiões, climas, sazonalidade e propriedades do solo, uma vez que são fatores que interferem na composição química dos óleos essenciais (Isah, 2019; Sripathi et al. 2017).

As porcentagens de inibição do crescimento micelial (ICM) de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizopus stolonifer* pela ação do essencial de *Z. riedelianum* estão apresentadas nas figuras 1 e 2, respectivamente. No apêndice D, encontra-se também a ICM *in vitro* desses fitopatógenos.

Os resultados dos testes antifúngicos utilizando OEZR foram satisfatórios, uma vez que todas as concentrações inibiram o crescimento micelial dos fungos testados. Observou também a partir dos resultados que a solução de Tween a 5% utilizada na preparação das concentrações do óleo essencial para emulsificação, não interferiu na inibição do crescimento micelial de nenhum fungo estudados, ou seja, não houve diferença do controle negativo.

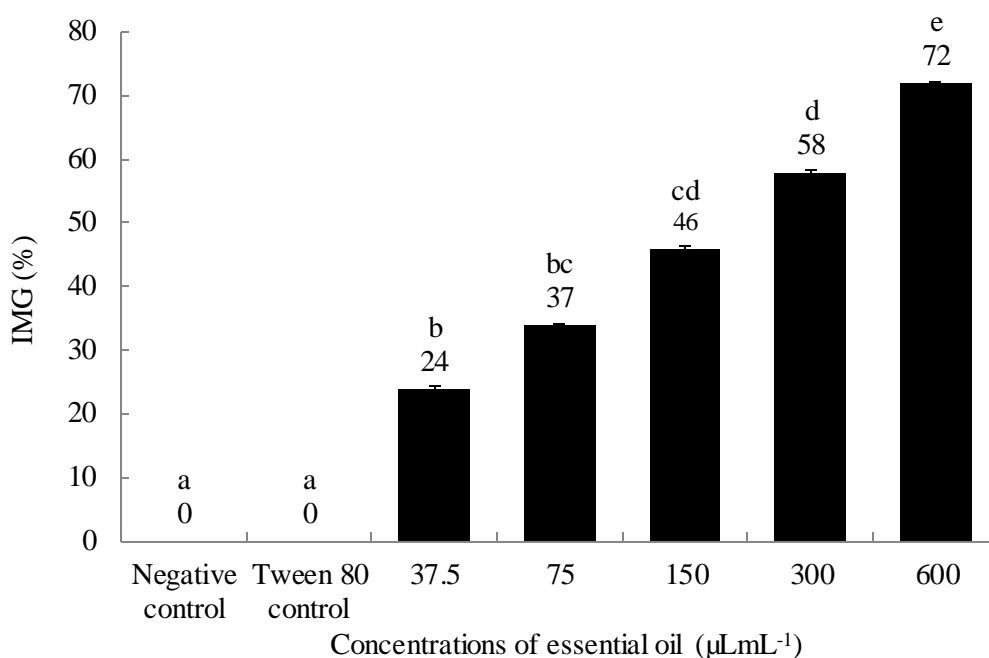


Figura 1: Percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes concentrações do óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

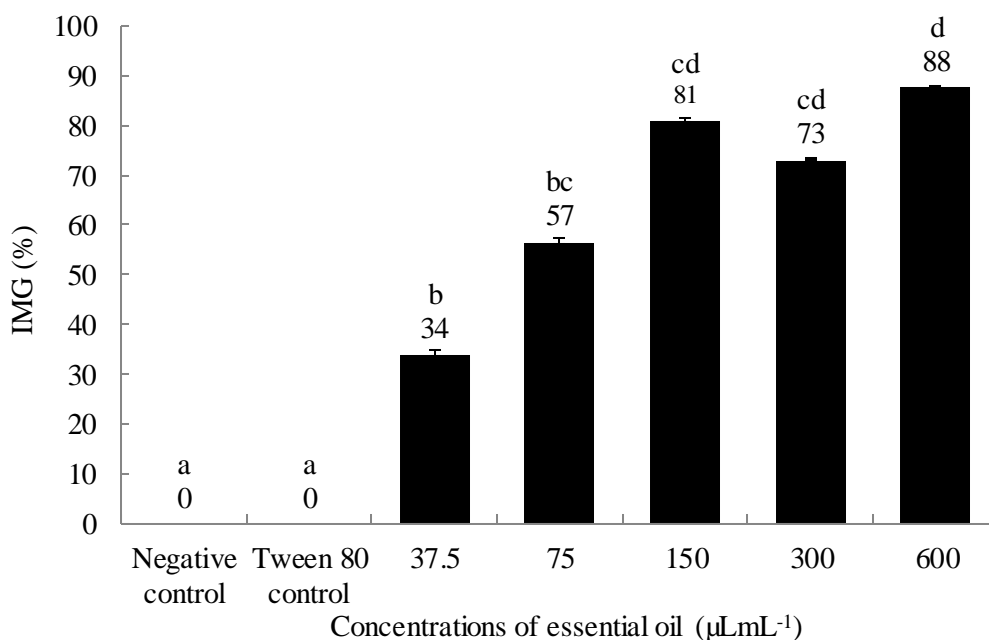


Figura 2: Percentual de inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* em diferentes concentrações do óleo essencial da casca do caule de *Zanthoxylum riedelianum*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O óleo essencial da casca do caule de *Z. riedelianum* demonstrou potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer* em todas as concentrações avaliadas, em comportamento dose-dependente, sendo os resultados mais promissores contra *R. stolonifer*, em que a concentração de $150 \mu\text{LmL}^{-1}$ inibiu mais de 80% do crescimento micelial, não diferindo estatisticamente dos resultados das concentrações do OEZR de 300 e $600 \mu\text{LmL}^{-1}$, que inibiram 73% e 88%, respectivamente, o crescimento do fungo. Já para o fitopatógeno *S. sclerotiorum* a concentração de $600 \mu\text{LmL}^{-1}$ do OEZR inibiu 72% do crescimento micelial.

Estudos que trabalharam com óleo essencial de algumas espécies da família Rutaceae também apresentaram atividade antifúngica sobre esses fungos, a pesquisa de Rezende et al. (2020) avaliaram o potencial fungicida do óleo essencial de duas variedades de casca fresca de *Citrus sinensis* no fungo *R. stolonifer*, observaram a inibição acima de 93% em ambas, na maior dose avaliada (100 μL). Silva et al. (2019), revelaram em seus estudos que o óleo essencial das folhas de *Murraya paniculata* na dose de 300 μL , inibiu 91,2% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

O potencial antifúngico do óleo essencial das cascas de *Z. Riedelianum* pode estar relacionado com a presença do componente majoritário o *E*-nerolidol, tendo em vista que esse composto já foi demonstrado ativo contra *Corynespora cassiicola* (Passos et al. 2012). Chen et al. (2020) verificaram que o *E*-nerolidol funciona como sinal volátil e fornece defesa robusta contra o patógeno *Colletotrichum fructicola*. É importante destacar que as atividades dos óleos essenciais sobre os fungos, podem ser pela capacidade de alterar estruturas citológicas que incluem desorganização das mitocôndrias, rompimento da parede e membrana celular por compostos lipofílicos (Perveen et al. 2018).

3.4 Conclusão

A luz do conhecimento, este é o primeiro relato da composição química e atividade antifúngica do OEZR frente a diferentes fitopatógenos, contribuindo para conhecimento da espécie, bem como da sua aplicação. O OEZR demonstrou potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer* em todas as concentrações utilizadas. Sendo os resultados mais promissores na concentração do OEZR de 600 e $150 \mu\text{LmL}^{-1}$ inibiu mais de 70% e 80% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *R. stolonifer*, respectivamente. Tomados em conjunto, estes dados pressupõem que o óleo essencial

da casca de *Z. riedelianum*, é fonte natural promissora de novos agentes antifúngicos que têm a vantagem de serem menos prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana.

3.5 Referências bibliográficas

- Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Illinois (IL): Allured Publishing Corporation.
- Al-Reza SM, Rahman A, Ahmed Y, Kang SC. (2010). Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pestic. Biochem. Physiol. 96: 86-92.
- Beirigo, PJS Torquato HFV, Santos CHC, Carvalho MG, Castro RN, Paredes-Gamero EJ, Sousa PT, Jacinto MJ, Silva VC. (2016). [1-8-N α C]-Zanriorb A1, a Proapoptotic Orbitide from Leaves of *Zanthoxylum riedelianum*. J. Nat. Prod. 79: 1454-1458.
- Chen S, Zhang L, Cai X, Li X, Bian L, Luo Z, Li Z, Chen Z, Xin Z. (2020). (E)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. Hort. Res. 7: 1-15.
- Christofoli M, Costa ECC, Bicalho KU, Domingues VC, Peixoto MF, Alves C CF, Araújo WL, Casal CM. (2015). Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. Ind. Crops Prod. 70: 301-308.
- Costa ECC, Christofoli M, Costa GCDS, Peixoto MF, Fernandes JB, Forim MR, Pereira KDC, Silva FG, Casal CDM. (2017). Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). Sci. Hortic. 226: 327-332.
- Diáñez F, Santos M, Parra C, Navarro MJ, Blanco R, Gea FJ. (2018). Screening of antifungal activity of twelve essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. Lett. Appl. Microbiol. 67: 400-410.
- Dias ALB, Sousa WC, Batista HRF, Alves CCF, Souchie EL, Silva FG, Pereira PS, Sperandio EM, Casal CM, Forim MR, Miranda MLD. (2020). Chemical composition and *in vitro* inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. Braz. J. Biol. 80: 460-464.
- El Ouadi Y, Manssouri M, Bouyanzer A, Majidi L, Bendaif H, Elmsellem H, Shariati MA, Melhaoui A, Hammouti B. (2017). Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. Microb. Pathog. 107: 321-326.
- Fernandes CC., Vieira, PC., Silva, VC., Dall'Oglio EL., Silva LES., Sousa, PT. (2009). 6-Acetonil-N-methyl-dihydrodecarine, a New Alkaloid from *Zanthoxylum riedelianum*. J. Braz. Chem. Soc. 20: 379-382.
- Ghasemi G, Alirezalu A, Ishkeh SR, Ghosta Y. (2020). Phytochemical properties of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser (Iranian accession) and its antioxidant and antifungal activities. Nat. Prod. Res. doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1741576>.
- Guy I, Charles B, Guinaudeau H, Ferreira ME, Arias AR, Fournet A. (2001). Essential oils from *Zanthoxylum chiloperone* and *Z. riedelianum* growing in Paraguay. Pharma. Biol. 39: 152-154.

- Isah T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol. Res.* 52: 1-25.
- Ma B, Ban X, Huang B, He J, Tian J, Zeng H, Chen Y, Wang Y. (2015). Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing *Sclerotinia* rot of rapeseed. *PLOS ONE*. 10: 1-15.
- Maness LR, Zubov T. (2019). The inhibitory effect of essential oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporium gypseum*. *Clin. Lab. Med.* 50: 18-22.
- Mathews JR, Sivparsad BJ, Laing MD. (2019). Greenhouse evaluation of *Trichoderma harzianum* for the control of *Sclerotinia* wilt (*Sclerotinia sclerotiorum*) of sunflower. *S. Afr. J. Plant Soil.* 361: 69-72.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* 101: 372-378.
- Oliveira ES, Viana FMP, Martins MVV. (2016). Alternatives to fungicides in the control of banana anthracnose. *Summa Phytopathol.* 42: 340-350.
- Oliveira J, Parisi MCM, Baggio JS, Silva PPM, Paviani B, Spoto MHF, Gloria EM. (2019). Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. *Int. J. Food Microb.* 292: 150-158.
- Ootani MA, Aguiar RW, Ramos ACC, Brito DR, Silva JB, Cajazeira JP (2013). Use of essential oils in agriculture. *J. Biotechnol.* 4: 162-174.
- Ramos-Guerrero A, González-Estrada RR, Hanako-Rosas G, Bautista-Baños S, Acevedo-Hernández G, Tiznado-Hernández ME, Gutiérrez-Martínez P. (2018). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro tests. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 755-763.
- Rezende JL, Fernandes CC, Costa AOM, Santos LS, Vicente Neto F, Sperandio EM, Souchie EL, Colli AC, Crotti AEM, Miranda MLD. (2020). Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Food Sci. Technol.* 40: 405-409.
- Sang H, Chang HX, Chilvers MI. (2019). A *Sclerotinia sclerotiorum* transcription factor involved in sclerotial development and virulence on Pea. *mSphere*. 4: e00615-18.
- Sati SC, Sati N, Ahluwalia V, Walia S, Sati OP. (2013). Chemical composition and antifungal activity of *Artemisia nilagirica* essential oil growing in northern hilly areas of India. *Nat. Prod. Res.* 27: 45-48.
- Silva FFA, Alves CCF, Oliveira Filho JG, Vieira TM, Crotti AEM, Miranda MLD. (2019). Chemical constituents of essential oil from *Murraya paniculata* leaves and its application to *in vitro* biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci. Technol.* 39: 413-417.
- Singh R, Ahluwalia V, Singh P, Kumar N, Sati OP, Sati N. (2016). Antifungal and phytotoxic activity of essential oil from root of *Senecio amplexicaulis* Kunth. (Asteraceae) growing wild in high altitude-Himalayan region. *Nat. Prod. Res.* 30: 1875-1879.
- Sripathi R, Jayagopal D, Ravi S. (2017). A study on the seasonal variation of the essential oil composition from *Plectranthus hadiensis* and its antibacterial activity. *Nat. Prod. Res.* 32: 871-874.
- Pandini JA, Pinto FGS, Scur MC, Santana CB, Costa WF, Temponi LG. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Braz. J. Biol.* 78: 53-60.

- Passos JL, Barbosa LCA, Demuner AJ, Alvarenga ES, Silva CM, Barreto RW. (2012). Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. *Molecules*. 17: 11447-11455.
- Pereira KC, Quintela ED, Silva DJ, Nascimento VA, Rocha DVM, Silva JF A, Forim MR, Silva FG, Cazal CM. (2018). Characterization of nanospheres containing *Zanthoxylum riedelianum* fruit essential oil and their insecticidal and deterrent activities against *Bemisia tabaci* (hemiptera: aleyrodidae). *Molecules*. 23: 1-19.
- Perveen K, Bokhari NA, Siddique I, Al-Rashid SAI. (2018). Antifungal activity of essential oil of *Commiphora molmol* oleo gum resin. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. 21: 667-673.
- Pirani JR, DevecchiMF. (2018). Flora of the *canga* of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Rutaceae. *Rodriguésia*. 69: 209-217.
- Westrick NM, Ranjan A, Jain S, Grau CR, Smith DL, Kabbage M. (2019). Gene regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* during infection of *Glycine max*: on the road to pathogenesis. *BMC Genom*. 20: 1-22.
- Whiley H, Gaskin S, Schroder T, Ross K. (2018). Antifungal properties of essential oils for improvement of indoor air quality: a review. *Rev. Environ. Health*. (33): 63-76.
- Zhou D, Wang Z, Li M, Xing M, Xian T, Tu K. (2017). Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. *J. Appl. Microbiol*. 124: 166-178.

APÊNDICE A

Tabela 1: Rendimento da hidrodestilação da casca do caule de *Z. riedelianum*.

Número de Extrações	Massa (g) da casca <i>in natura</i>	Massa (g) do óleo essencial	Rendimento (%)
1	300	0,04	0,01
2	300	0,05	0,02
3	300	0,06	0,02
4	300	0,06	0,02
5	300	0,04	0,01
6	300	0,05	0,02
7	300	0,16	0,01
8	400	0,07	0,02
9	800*	0,13	0,02
10	800*	0,18	0,02
11	800*	0,21	0,03
12	400*	0,07	0,02
13	2500*	0,22	0,01
14	1400*	0,21	0,02
15	1500*	0,11	0,01
TOTAL	11700	1,66	
MÉDIA			0,02

*: foram realizados mais de uma extração.

APÊNDICE B

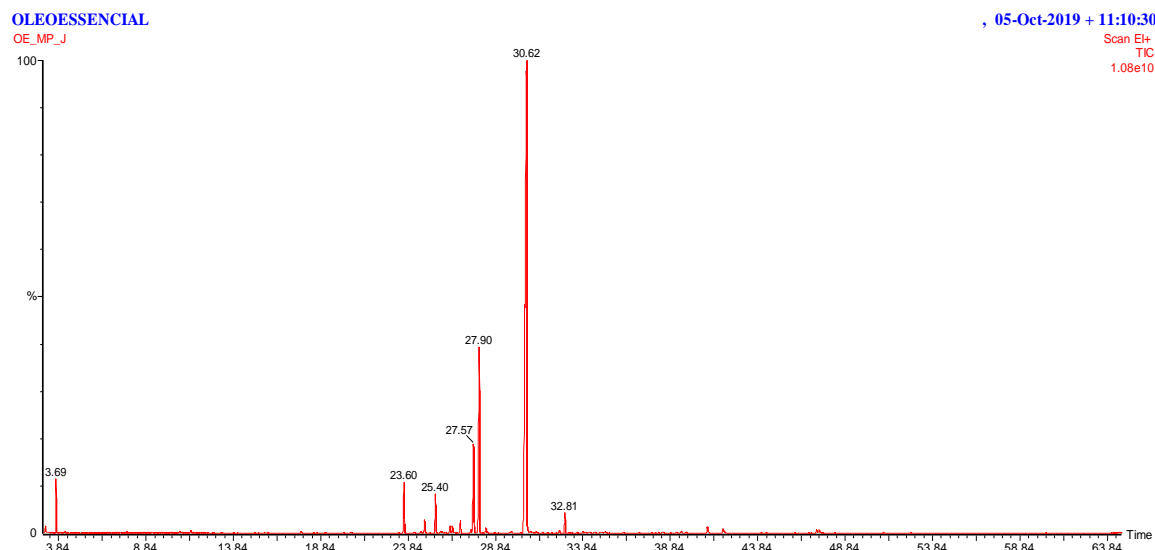


Figura 1: Cromatograma obtido em CG-EM para OEZR. Condições: Gás de arraste Hélio (He); Temperatura inicial de 60°C com elevação da temperatura a 240°C na razão de 3°C min⁻¹ e elevação para 280°C com razão de 15°C min⁻¹; Temperaturas do injetor, da interface e da fonte foram 240, 250 e 250°C, respectivamente.

APÊNDICE C

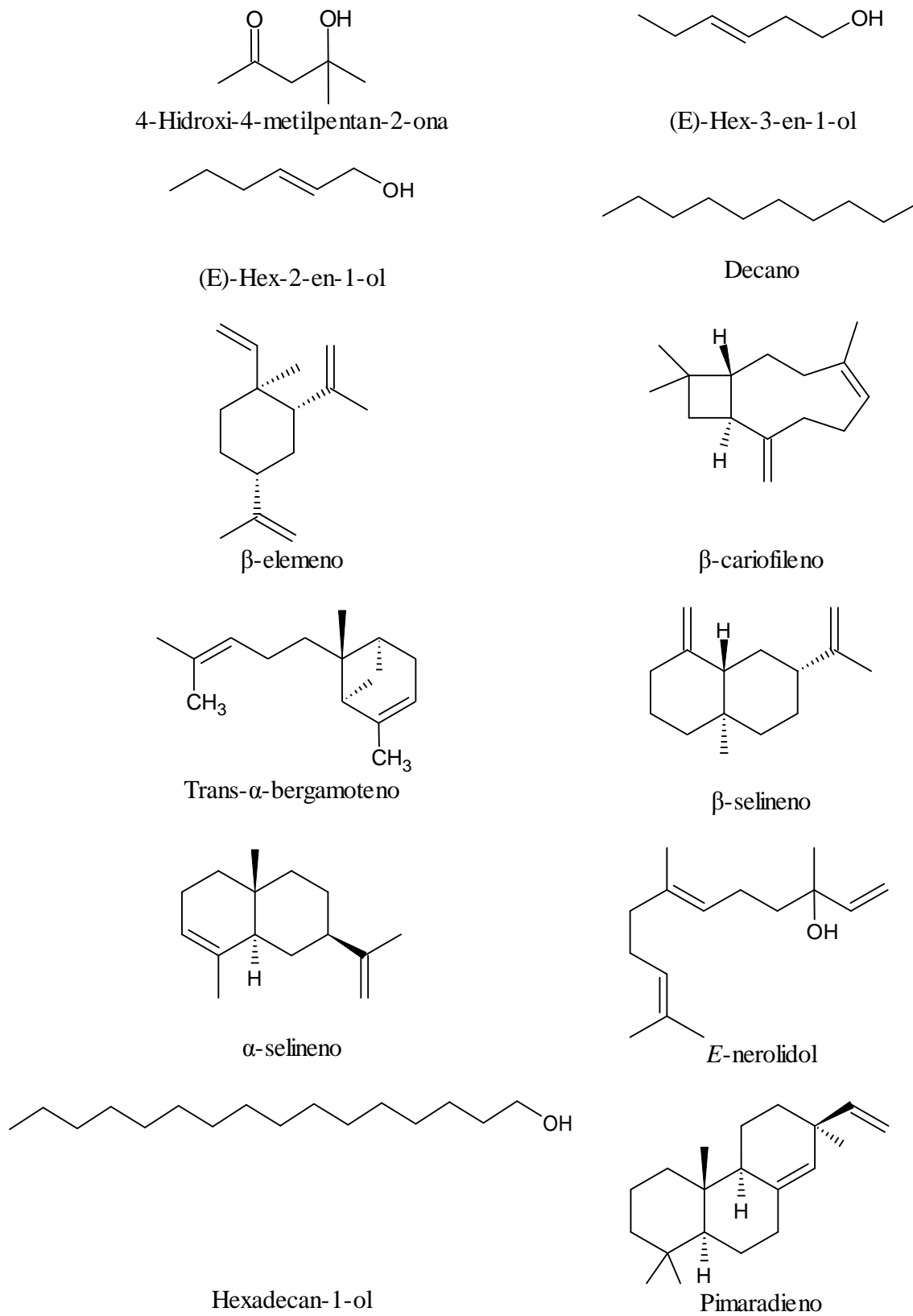


Figura 1: Estrutura química de todos os compostos identificados no OEZR.

APÊNDICE D

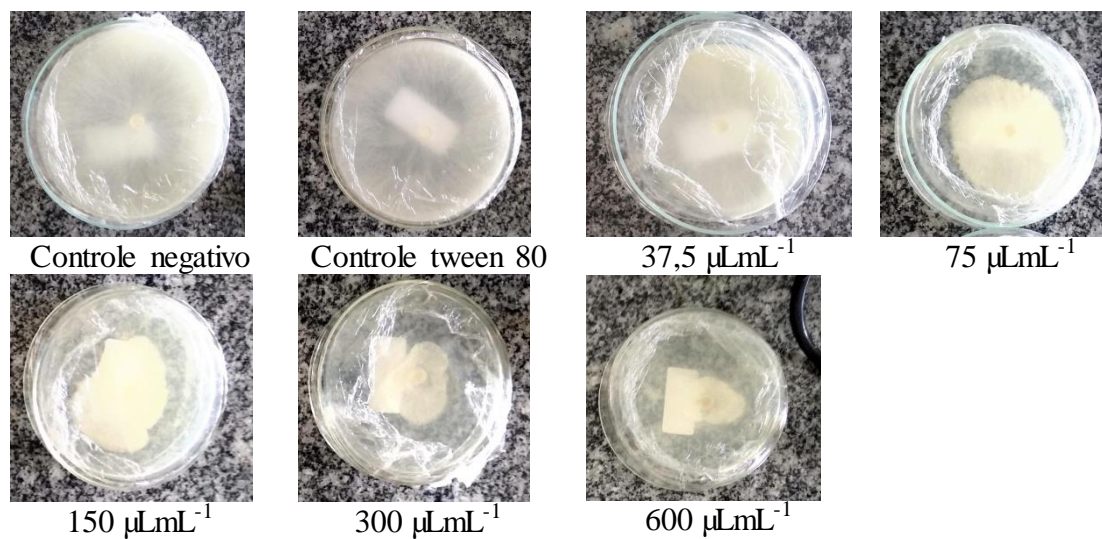


Figura 1: Inibição do crescimento micelial do OEZR contra *S. sclerotiorum* após o crescimento total do controle negativo.

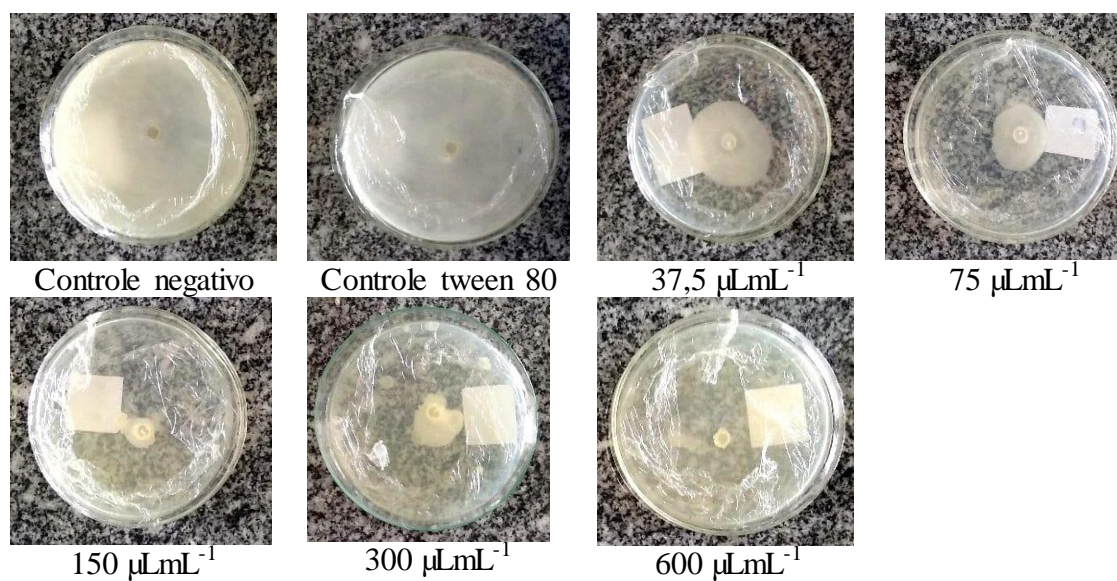


Figura 2: Inibição do crescimento micelial do OEZR contra *R. stolonifer* após o crescimento total do controle negativo.