

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VIVIANE MOITIM PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO MICELIAL IN VITRO DO *Botrytis cinerea* UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVACA
(*Ocimum gratissimum*L.)**

ALEGRE-ES

2022

VIVIANE MOITIM PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO MICELIAL IN VITRO DO *Botrytis cinerea* UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVACA
(*Ocimum gratissimum* L.)**

Monografia apresentada à Coordenadoria do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal do Espírito Santo, campus de Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Menini
Co-orientadora: Dra. Armanda Aparecida Júlio

ALEGRE-ES

2022

P436a Pereira, Viviane Moitim

Atividade inibitória do crescimento micelial *in vitro* do *Botrytis cinerea* utilizando óleo essencial de alfavaca / Viviane Moitim Pereira – 2022.
45 f. : il.

Orientador: Luciano Menini
Co-orientador: Armanda Aparecida Júlio

Monografia (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo. Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas, 2022.

1. Essências e Óleos essenciais. 2. Pragas-controle. 3. Agricultura Alternativa. 4. Manjerição. 5. *Botrytis cinerea*. I. Menini, Luciano. II. Júlio, Armanda Aparecida. III. Título. IV. Instituto Federal do Espírito Santo.

CDD 23: 661.806

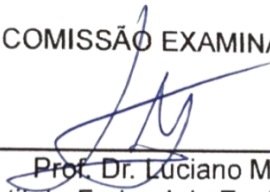
VIVIANE MOITIM PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DO
Botrytis cinerea UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAVACA
(*Ocimum gratissimum* L.)**

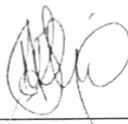
Monografia apresentada à Coordenadoria do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal do Espírito Santo, campus de Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em 17 de novembro de 2022


COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Luciano Menini
Instituto Federal do Espírito Santo
Orientador



Dra. Armanda Aparecida Júlio
Instituto Federal do Espírito Santo
Co-Orientadora



Prof. Dra. Lilianne Gomes Silva
Instituto Federal do Espírito Santo



Me. Aldino Neto Venancio
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico esse trabalho aos meus pais e meus irmãos por eles sempre terem acreditado em mim e no meu potencial, me ajudado a chegar onde cheguei e por nunca medirem esforços para me ajudar, sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Joelita Ferreira Moitim e Joaquim Saturnino Pereira por todo o apoio, sustentação e por me motivarem sempre a dar o melhor de mim.

Aos meus irmãos Filemom Moitim, Hayalla Moitim e Valéria Moitim, pela motivação e por nunca me deixarem desistir, mesmos nas piores situações.

Ao meu orientador Luciano Menini por toda ajuda e pelo apoio no meu desenvolvimento profissional.

A minha coorientadora Armanda Aparecida Júlio, por ser uma grande parceira, pelos conselhos e ajuda no meu desenvolvimento, a você meu grande obrigada.

Aos meus colegas de laboratório especialmente Aldino e Gustavo, por toda ajuda durante o processo de execução deste trabalho, me incentivando e me mantendo otimista mesmo diante das dificuldades, a vocês a minha imensa gratidão.

Aos meus amigos Rayane, Jeany, Yuri e Letícia, muito obrigada pelas risadas nos momentos de tensão e por sempre me encorajarem e aos meus tios Joelson Lopes, Aldiene Oliveira, Joelma Lopes e Crispiniano Nascimento . Jamais vou me esquecer por sempre estarem ao meu lado. Muito obrigada por tudo.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) pela oportunidade e estrutura, a Fundação de Inovação e Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela disponibilização do fungo utilizado neste trabalho.

A todos que contribuíram na minha formação, a vocês minha eterna gratidão.

Muito Obrigada!

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

Os agrotóxicos fazem parte de um enorme grupo de compostos orgânicos que auxiliam efetivamente o agronegócio, possibilitando um rendimento considerável das culturas e da produção de alimentos. No Brasil, a cada ano, a agricultura vem batendo recordes de produção, sendo o país também o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Estudos comprovam que o uso desses compostos químicos é maléfico à saúde humana, dos animais e ao meio ambiente diante disso, a busca por alimentos orgânicos, livres de substâncias químicas nocivas vêm ganhando notoriedade no mercado nacional. Com isso, este trabalho tem como objetivo buscar novas alternativas ao uso dos agroquímicos sintéticos convencionais por meio do uso do óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum*). Foi realizada a extração e a caracterização do óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum*) e testes *in vitro* da atividade fungicida do óleo essencial contra o patógeno *Botrytis cinerea*. Nos testes de atividade fungicida foram utilizadas 5 concentrações distintas do óleo de alfavaca emulsionadas (0,094; 0,188; 0,500; 1,500; 3,000 µL/mL) frente ao fitopatógeno. O óleo essencial de alfavaca mostrou-se eficiente na inibição micelial do *Botrytis cinerea*, sendo mais eficaz na concentração de 1,500 µL/mL, que inibiu cerca de 80 % do crescimento do micélio fúngico. Com base nos resultados, conclui-se que o óleo essencial de alfavaca afeta o crescimento do *Botrytis cinerea*, sendo eficiente na inibição micelial do fungo em condições *in vitro*.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Botrytis cinerea*, Eugenol, *Ocimum gratissimum* L.

ABSTRACT

Pesticides are part of a huge group of organic compounds that effectively help agribusiness, enabling a considerable yield of crops and food production. In Brazil, every year, agriculture has been breaking production records, and the country is also the world's largest consumer of pesticides. Studies prove that the use of these chemical compounds are harmful to human health and the environment, therefore, the search for organic food, free of harmful chemical substances, has been gaining notoriety in the national market. With this, this work aims to seek new alternatives to the use of conventional synthetic agrochemicals through the use of essential oils. The extraction and characterization of the essential oil of basil (*Ocimum gratissimum*) and in vitro tests of the fungicidal activity of the essential oil against the pathogen *Botrytis cinerea* were carried out. In the fungicidal activity tests, 5 different concentrations of emulsified basil oil (0.094; 0.188; 0.500; 1.500; 3.000 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were used against the phytopathogen. The essential oil of basil was efficient in the mycelial inhibition of *Botrytis cinerea*, being more effective in the concentration of 1,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$, which inhibited about 80% of the fungal mycelium growth. Based on the results, it is concluded that basil essential oil affects the growth of *Botrytis cinerea*, being efficient in the mycelial inhibition of the fungus under in vitro conditions.

Keywords: Essential oil, *Botrytis cinerea*, Eugenol, *Ocimum gratissimum* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do eugenol.

Figura 2. Estruturas reprodutivas do *Botrytis cinerea*.

Figura 3. Inibição micelial do *Botrytis cinerea* frente ao composto eugenol.

Figura 4. Inibição micelial do *Botrytis cinerea* frente ao óleo essencial de alfavaca.

Figura 5. Gráfico usado para estimativa da CI_{50} e CI_{90} para o óleo essencial de alfavaca e para o eugenol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do OE de alfavaca.

Tabela 2. Determinação da umidade, densidade e índice de refração do óleo essencial de alfavaca.

Tabela 3. Inibição do óleo essencial de alfavaca e eugenol.

Tabela 4. Estimativa da CI_{50} e CI_{90} para o óleo essencial de alfavaca e para o eugenol.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

CG - Cromatografia a gás ou cromatógrafo a gás

CG/EM-Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas.

eV – eletrovolt

He - Hélio

IR - Índice de retenção

min - Minutos

m/m – Razão massa/massa

m/z – Razão massa/carga

N₂ - Nitrogênio

OE - Óleo essencial

RPM – Rotação por minuto

UFV – Universidade Federal de Viçosa

v/v – Razão volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

g - Gramas

m - Metros

mg - Miligrama

MhZ - Mega hertz

mL - Mililitros

mm- Milímetros

% - porcentagem

μL/mL - Microlitros por mililitros

°C - Graus centígrados

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50 por cento

CI₉₀ – Concentração inibitória de 90 por cento

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS DA PESQUISA.....	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	DESENVOLVIMENTO	17
2.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.1	Óleos essenciais	17
2.1.2	Atividade biológica das plantas medicinais	19
2.1.3	Óleos essenciais no controle do mofo cinzento	20
2.1.4	Importância do cultivo de morango para o Estado do Espírito Santo	22
2.2	METODOLOGIA.....	23
2.2.1	Extração do óleo essencial da alfavaca (<i>Ocimum gratissimum L.</i>)	23
2.2.2	Identificação e descrição dos compostos químicos presentes na alfavaca (<i>Ocimum gratissimum L.</i>)	24
2.2.3	Determinação da densidade e do índice de refração	25
2.2.4	Estimativa da concentração inibitória (CI₅₀ e CI₉₀)	25
2.2.5	Preparo das emulsões do óleo essencial	25
2.2.6	Avaliação da ação antifúngica do óleo essencial <i>in vitro</i>	26
2.2.7	Análise dos dados	26
2.3	RESULTADO E DISCURSSÃO	27
2.3.1	Caracterização dos compostos do óleo essencial de alfavaca	27
2.3.2	Densidade e índice de refração do óleo essencial de alfavaca	28
2.3.3	Ação antifúngica do óleo essencial de alfavaca sob condições <i>in vitro</i>	29
2.3.4	Concentrações de inibição micelial (CI₅₀ e CI₉₀)	33
3.	CONCLUSÃO	34
4.	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos fazem parte de um enorme grupo de compostos orgânicos que auxiliam efetivamente o agronegócio, possibilitando um rendimento considerável das culturas e da produção de alimentos. Cada agrotóxico produzido atualmente possui uma ação específica para organismos-alvos, porém, ocorre a contaminação de diversas outras espécies devido a volatilização desses compostos (GOMES *et al.*, 2020; ADENEKAN; JOHNSON, 2019).

A utilização desses produtos químicos assegura maior capacidade de produção, gerando uma falsa sensação de segurança alimentar, entretanto, seu uso é indispensável para o agronegócio e para atender a demanda de alimentos para a população. Neste contexto, os grandes latifundiários são os que mais se beneficiam do uso desses produtos na agricultura, pois lucram em cima das exportações dos produtos produzidos no país (KAEL *et al.*, 2020). No Brasil, a cada ano, a agricultura vem batendo recordes de produção, sendo o país também o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Na literatura, diversos estudos comprovam que o uso desses compostos químicos é maléfico à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Além de causarem intoxicações que acarretam no surgimento de doenças crônicas e agudas, e conseqüentemente à morte nos casos mais graves (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Diante do exposto, a busca por alimentos orgânicos, livres de substâncias químicas nocivas, vêm ganhando notoriedade no mercado nacional (DEONIR *et al.*, 2020). Uma boa parcela da população busca por alimentos com o mínimo de degradação dos recursos naturais, destacando os produtos com selos que garantem a não utilização de defensivos agrícolas em sua produção (KASPER *et al.*, 2018).

Dentre os diversos ramos da agricultura, o estado do Espírito Santo é um grande representante no setor frutícola e produz boa parte das frutas no mercado nacional, como a produção de morango-silvestre (*Fragaria vesca L.*), abacaxi (*Ananas comosus L.*) e banana (*Musa paradisíaca L.*) (SILVA *et al.*, 2014). Entretanto, esses cultivos sofrem muito por doenças causadas principalmente por fungos e insetos, gerando grandes prejuízos (TERAO, 2019).

O morango, dentro da indústria frutícola, é um produto amplamente cultivado e consumido, sendo uma das culturas que mais se utiliza agroquímicos no modo convencional. A principal doença que acarreta em danos na produção de morangos é o mofo cinzento, causado pelo *Botrytis cinerea*. Quando não há o controle deste fungo, as perdas são aproximadamente de 30 a 40%, e em situações onde a doença pode ser intensificada mediante condições ambientais favoráveis, as perdas podem se aproximar de 60% (WÜRZ *et al.*, 2020).

A grande esporulação deste fitopatógeno aumenta sua variabilidade genética, provocando gerações mais resistentes que as anteriores, o que ressalta uma grande preocupação do uso convencional de fungicidas não serem mais eficazes, além de apresentarem riscos à saúde e ao ambiente em que é exposto (DRAWANZ, 2020).

Frente aos problemas existentes devido ao uso de agroquímicos sintéticos, a busca por alimentos mais saudáveis tem crescido muito. Dessa forma, o uso de produtos naturais, como os óleos essenciais, vem sendo muito estudado por apresentar um grande potencial para manejar doenças fúngicas em diferentes culturas agrícolas (DA SILVA; HANADA; DE BRITO, 2019). Por isso, este trabalho teve como objetivo buscar novas alternativas ao uso dos agroquímicos convencionais por meio do uso de óleos essenciais a fim de promover uma agricultura mais sustentável e produtos mais saudáveis.

1.1 OBJETIVOS DA PESQUISA

1.1.1 Objetivo geral

Estudar a atividade do óleo essencial de alfavaca como alternativa antifúngica no manejo do *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) do morango.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial da alfavaca através da técnica de hidrodestilação;
- Caracterizar o óleo essencial a fim de determinar sua composição química;

- Avaliar da ação antifúngica *in vitro* do óleo essencial de alfavaca frente ao fungo *Botrytis cinerea*;
- Determinar a concentração inibitória mínima de 50 e 90 por cento (CI₅₀ e CI₉₀);

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Óleos essenciais

Durante o ciclo de vida, as plantas desenvolvem compostos químicos fundamentais para o funcionamento de seu organismo. Um dos compostos presentes nas plantas são compostos aromáticos, que possuem uma ampla aplicabilidade, sendo utilizados desde setores farmacêuticos até mesmo na agronomia (GARCIA *et al.*, 2019). Os óleos essenciais (OE) estão presentes nas células vegetais, produzidos através de um metabolismo secundário muito importante para atração de polinizadores, comunicação entre as espécies e também na defesa contra a herbivoria de predadores. Os OE promovem, para as plantas, proteção contra o estresse causado por mudanças de temperatura, deficiência de nutrientes, concentrações de água absorvida e possíveis danos acarretados a exposição intensa a luz UV (GÓES *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis encontrados em plantas aromáticas, e das substâncias presentes nos óleos essenciais, os terpenos e os sesquiterpenos são predominantes (MATOS *et al.*, 2019; SILVA-TRUJILLO *et al.*, 2022). Devido às diversas propriedades e à grande variedade de terpenos encontrados na sua composição, os óleos essenciais possuem alto valor agregado, por isso são utilizados como matéria-prima para obtenção diversos compostos isolados importantes, bem como são utilizados como insumo em diversos setores industriais (WOLFFENBUTEL, 2010).

Os óleos essenciais extraídos das plantas medicinais, em sua maioria, possuem substâncias com forte atividade fungicida e inseticida, e apresentam grandes vantagens quando comparados aos agroquímicos convencionais, que além de serem nocivos para o ambiente e para os seres vivos em geral, podem interferir no controle natural de microrganismos, gerando seres multirresistentes. Diversos estudos retratam a alta capacidade dos óleos essenciais em agir como fungicidas naturais impedindo a ação fúngica (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015; PALFI; KONJEVODA; VRANDEČIĆ, 2019).

O *Syzygium aromaticum*, também conhecido como cravo da Índia, é uma planta nativa do continente Asiático, faz parte da família das *Myrtaceae*, possuem uma flor extremamente aromática e é muito utilizada na culinária e na medicina popular devido as suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes dentre outras (MBAVENG; KUETE, 2017). O OE de cravo da Índia possui compostos fenólicos na sua composição, sendo o eugenol seu principal constituinte. Existem diversos registros na literatura que retratam a eficiência do OE de cravo da Índia frente a bactérias como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, e também fungos das espécies *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Scopulariopsis* (SINGH *et al.*, 2020).

Outro gênero importante é o *Lippia*, que abrange um grande número de espécies medicinais, sendo importantes para a medicina tradicional brasileira, além de possuírem diversas atividades biológicas (MELO *et al.*, 2020). A *Lippia sidoides*, popularmente chamada de alecrim pimenta, comum nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, possui um OE rico em timol, composto fenólico com grande atividade antifúngica e antibacteriana, além do timol, pode-se encontrar o seu isômero cavacrol, que juntos ampliam a atividade biológica do óleo (BALDIM *et al.*, 2019; VERAS *et al.*, 2017).

O óleo essencial de alfavaca destaca-se pela sua lipossolubilidade, baixa toxicidade e por possuir atividade biológica contra uma grande variedade de microrganismos, com um amplo espectro e fungos e fungos. Os seus compostos químicos agregam grande importância ao óleo essencial pelas suas capacidades analgésicas, imunoestimulantes e antibacterianas (LINARD, 2008; TANGERINO, 2006). Estudos

vem comprovando também que a utilização do óleo essencial de alfavaca introduzidos na alimentação de peixes promovem o aumento de células caliciformes, melhorando a mucosa intestinal dos peixes, e conseqüentemente a digestão e absorção de nutrientes (SYAHIDAH *et al.*, 2015).

2.1.2 Atividade biológica das plantas medicinais

As plantas medicinais têm sido utilizadas por povos indígenas em todo o mundo há muito tempo e desempenham um papel importante no tratamento de doenças humanas e animais. A maioria dos medicamentos modernos tem sido desenvolvidos a partir de compostos isolados de plantas medicinais, com base em suas aplicações etnofarmacológicas. O interesse mundial pelo uso de plantas medicinais vem crescendo, e seus efeitos benéficos estão sendo redescobertos e aplicados em diversas áreas de estudo (ANDRADE *et al.*, 2018).

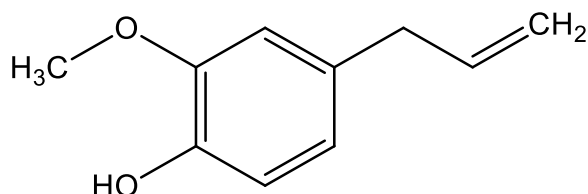
As plantas medicinais são consideradas reservatórios para uma variedade de compostos biologicamente ativos com diversas propriedades terapêuticas. Os amplos efeitos terapêuticos, associados às plantas medicinais, incluem atividades anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais, antimaláricas e analgésicas (AYE *et al.*, 2019).

A alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), também conhecida como Alfavacão, alfavaca-cravo ou manjerição doce, é uma planta muito utilizada na forma de chá pela medicina tradicional/popular por possuir ação contra algumas doenças, como cefaleia, desinterias intestinais, problemas respiratórios, entre outras (FIGUEIREDO, 2021). A planta é originária do oriente, classificada como um subarbusto de folhas ovaladas e flores pequenas arroxeadas, possui um aroma forte e agradável muito característico do cravo (PEREIRA; MAIA, 2007). A alfavaca (*O. gratissimum*) pertencente ao gênero *Ocimum* e da família *Lamiaceae*, tem aproximadamente 30 espécies de ervas que são produtoras de óleos essenciais, tendo como compostos majoritários o eugenol e o timol (BIZZO; HOVEL; REZENDE, 2009).

O eugenol, denominado também como 4-alil-2-metoxifeno (figura 1), é um composto oleoso incolor variando a tons de amarelo claro, é classificado como um

fenilpropanóide, sendo pouco solúvel em água (FARMAKOLOJIK; ÖZELLIKLERI,2017).

Figura 1: Estrutura química do eugenol.



Fonte: MEHER; CHAKRABORTY, 2018.

Várias atividades biológicas do eugenol já são descritas, como anti-inflamatória, antiparasitária, antiviral, antioxidante, antibacteriana e antifúngica (HASSANPOUR, SHAMS-GHAHFAROKHI, RAZZAGHI-ABYANEH,2020). Os mecanismos de ação do eugenol, no que se refere à atividade antifúngica, incluem alterações nas paredes celulares dos microrganismos e o enfraquecimento dos sistemas de defesa através da lipoxigenase, mediada por uma cascata de radicais livres, resultando em danos à membrana (RASTOGI *et al.*, 2008; LEE; JIN, 2008; KARUMATHIL *et al.*, 2016). Além disso, estudos mostraram que a interferência com enzimas de aminoácidos contribui para a atividade fungicida do eugenol. Efeitos sinérgicos entre o eugenol e outros compostos atuam na síntese da parede celular do microrganismo acarretando em sua lise celular (RAJA *et al.*, 2015; MAK *et al.*, 2019).

2.1.3 Óleos essenciais no controle do mofo cinzento

Na agricultura, a fruticultura é fortemente afetada pela ação de fungos patogênicos, provocando danos significativas na produção. Dentre os fungos fitopatogênicos, o *Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico, conhecido popularmente por mofo cinzento, sendo responsável por perdas em diversas culturas frutíferas, como de uvas (*Vitis vinifera* L.) e de morangos (*Fragaria vesca* L.) (TRIPATHI; DUBEY; SHUKLA, 2008).

Figura 2: Estruturas reprodutivas do *Botrytis cinerea* L.



Fonte: Próprio autor, 2022.

O *Botrytis cinerea* é um dos principais causadores de danos durante a produção e no pós-colheita do morango, gerando grandes perdas econômicas. O morango, por ser sensível a variação de temperaturas e por sua elevada taxa de respiração, torna-se altamente suscetível a proliferação do *B. cinerea*. Com o surgimento de cepas resistentes e a alta incidência do uso dos fungicidas convencionais, surgiu a necessidade de se desenvolver novas maneiras de inibir o crescimento de microrganismos. Neste contexto, os óleos essenciais vêm recebendo grande notoriedade (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021; BANANI *et al.*, 2018; HUIYU *et al.*, 2020).

Os OEs de *Cinnamomum zeilanicum*, *Citrus nobilis var. tangerinae*, *Citrus sinensis var. dulcis*, *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon nardus*, *Lavandula hybrida*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha pipertita*, *Romarinus officinalis*, *Syzigium aromaticum*, segundo Lorenzetti *et al.* (2011), possuem ação inibitória frente ao *B. cinerea*. Além dos efeitos diretos dos óleos essenciais sobre os fitopatógenos, os óleos demonstram grande resistência no processo de indução de resistência em plantas. Isto é, tem a capacidade de ativar as linhas de defesa da planta, bloquear ou atrasar Infecção de diferentes sistemas patológicos pré- e pós-colheita (NIKKHAH *et al.*, 2017).

2.1.4 Importância do cultivo de morango para o Estado do Espírito Santo

Os morangos fazem parte do plano de produção sustentável, por isso é fundamental a redução do uso de defensivos sintéticos nesta cultura, que é tão vulnerável a insetos e fungos (BALBINO *et al.*, 2013). Por sua importância econômica e social para o estado do Espírito Santo, criou-se em 2008 normas técnicas específicas de acompanhamento da Produção Integrada de Morango (PIMo), que foram publicadas nas Instruções Normativas de número 14, de 1 de abril de 2008, que conta também com o cadastramento dos produtores junto ao Incaper (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência, Técnica e Extensão Rural) com finalidade de garantir qualidade dos morangos. Cada produtor possui um número de cadastro, que é utilizado junto à embalagem com um logotipo *Morango das montanhas do Espírito Santo, qualidade com responsabilidade*. A cada safra, o número de cadastro é renovado com o objetivo de manter a rastreabilidade de algum possível problema (ANTUNES, 2006).

A produção do morango se concentra em cidades que apresentam climas mais amenos, como Afonso Cláudio, Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá e Venda Nova do Imigrante, consideradas como região Polo do Morango no Estado, tendo uma área de 300 hectares, produzindo cerca de 10.000 toneladas nessas regiões. A gestão do Polo Morango tem trabalhado arduamente para manter efetivamente a produtividade e qualidade dos morangos capixabas e implementar boas práticas agrícolas mantendo as práticas orgânicas em toda a produção. O monitoramento visa minimizar o uso de agroquímicos para melhor atender aos pré-requisitos para um programa de produção sustentável de morango. Atividade agroindustrial nas regiões das Montanhas capixabas (NASCIMENTO, 2020).

Em geral, o morango entra no mercado como uma alternativa de diversificação, principalmente para pequenas e médias propriedades rurais, ajudando a viabilizar a lavoura e aumentar a renda dos produtores rurais. No Espírito Santo o cultivo do morango possui grande importância socioeconômica, principalmente pelo elevado contingente de mão de obra nas operações de produção, colheita e pós-colheita (COSTA, 2015). Trata-se de uma atividade tipicamente familiar, onde cerca de 89% da área cultivada está nessas propriedades (REICHERT; MADALI, 2003).

A inserção da cultura de morango no Estado capixaba, até meados da década de noventa, teve expansão gradativamente lenta, mas a partir daí houve um significativo aumento das culturas no Espírito Santo (BALBINO; MARIN, 2006). Uma perspectiva relevante a ser apontada é de que o desenvolvimento do cultivo do morango envolveu alguns fatores de manejo, melhorando a comercialização dos frutos principalmente a distâncias maiores das regiões produtoras (COSTA, 2015). Também vem sendo implementado, nos últimos anos, o turismo rural ou agroturismo, pois alguns agricultores que produziam morangos, movidos pela necessidade de ampliar sua renda, resolveram abrir suas pequenas propriedades para receber os turistas, o que resultou na implantação do conceito de colhe-pague. Esta prática foi beneficiada pela introdução de novas tecnologias, que possibilitaram, sobretudo, aumentar o período de produção e a qualidade do produto (FERRÃO; GOMY, 2014).

2.2 METODOLOGIA

Os ensaios foram conduzidos nos laboratórios de Química Aplicada e de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus Alegre. Para a obtenção do material vegetal, foram coletadas folhas e flores da alfavaca (*O gratissimum L.*), no distrito de Rive, município de Alegre, localizada na região sul do Espírito Santo (-20.762329, -41.457606).

2.2.1 Extração do óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*)

As folhas e flores coletadas da planta alfavaca foram armazenadas em local protegido para secagem em estufa de circulação de ar forçada, de marca e modelo Marconi MA033/630, onde permaneceram durante 2 dias sob temperatura de 40° C. Após a secagem, o material seco foi cortado a fim de reduzir a sua área superficial e melhorar a eficiência da extração do óleo essencial.

A extração do óleo essencial da alfavaca foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. Foram adicionados 60g do material seco e 1000mL de água destilada em um balão de fundo redondo com capacidade para 2000mL, conforme proposto por Dos Santos (2021).

A obtenção do hidrolato ocorreu após 4 horas de extração, sendo retirado do aparelho e submetido a centrifugação de 6000 RPM, durante 10 minutos, para separar o óleo da água. O óleo obtido foi pesado para determinação do rendimento, sendo o processo realizado em triplicata, e depois foi armazenado em frascos de vidro, protegido da luz e em uma temperatura inferior a -10°C , para posterior identificação química e testes de atividade fungicida.

O rendimento médio do óleo essencial extraído foi obtido através do cálculo da média do rendimento das extrações, e os resultados expressos em porcentagem de massa de óleo essencial (g) por biomassa de folha seca (g) (% , m/m). Esses valores foram obtidos através das pesagens das amostras em balança analítica após a separação do óleo essencial da água, segundo a metodologia proposta por Souza et al. (2017).

2.2.2 Identificação e descrição dos compostos químicos presentes na alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.)

Os compostos químicos dos óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), sendo empregadas em ambas as análises as seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária SH-Rxi-5HT da SHIMADZU (30 m x 0,25 mm x, 025 mm); N_2 (em análise de GC/FID) e He (em análises de CG/MS) como gás de arraste com fluxo de 3,0 mL/min; a temperatura do forno segue uma programação em que permanece por 3 minutos a uma temperatura inicial de 40°C e em seguida será aumentando gradativamente $3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir 240°C , mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos; temperatura do injetor de 250°C ; temperatura do detector de 280°C ; razão de split de 1:30. As análises por GC/MS serão realizadas em um equipamento operado por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/segundo e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z).

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados das espectrotecas Willey7, NIST05, NIST05s, com a co-injeção de padrões e pelos índices de retenção IR (Linear Temperature Programmed Retention Indexes). Para o cálculo dos Índices de IR, foi utilizada uma mistura de *n*-alcanos lineares (C7 a C40) como padrão. O índice de IR é um índice de retenção com programação linear de temperatura, e é utilizado quando a corrida cromatográfica é realizada com uma programação linear de temperatura.

2.2.3 Determinação da densidade e do índice de refração

Em uma sala climatizada, à temperatura de 20 °C, foram realizadas as medidas da densidade média e do índice de refração do óleo essencial de alfavaca. Para a determinação da densidade foi realizada a pesagem de 1 mL do óleo essencial em uma balança analítica de precisão (± 1 mg). Já o índice de refração foi determinado em um refratômetro de Abbé.

2.2.4 Estimativa da concentração inibitória (CI₅₀ e CI₉₀)

Para a estimativa da concentração inibitória, inicialmente foi necessário determinar os limites de inibição de crescimento do fungo, tendo como a de menor limite (a concentração que causa a inibição a cerca de 50% dos fungos) e de maior limite (concentração que causa a inibição de cerca de 90% dos fungos), que foram estabelecidas por meio de ensaios preliminares. A partir dos dados obtidos, as concentrações foram espaçadas em escala logarítmica em Microsoft Excel, além das respectivas testemunhas, para a realização dos testes.

2.2.5 Preparo das emulsões do óleo essencial

A emulsão preparada foi do tipo óleo em água (O/A), em que a fase dispersa corresponde à fase oleosa, e a fase dispersante constitui-se de água. Utilizou-se 5% de óleo essencial, 1% de emulsificante (Tween®) e o volume foi completado com água destilada estéril. A emulsão foi homogeneizada por 50 minutos em cuba ultrassônica, que opera na frequência de 42 mHz.

2.2.6 Avaliação da ação antifúngica do óleo essencial *in vitro*

Inicialmente foi preparada uma solução estoque na forma de emulsão, composta de óleo essencial, água destilada e emulsificante Tween 80®, com concentração de 100 µL/mL⁻¹. Dessa solução estoque, foram preparadas soluções com diferentes concentrações diluídas em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). Após a solidificação do meio de cultura contendo as concentrações 0,094; 0,188; 0,500; 1,500; 3,000 µL/mL do óleo essencial em placas de Petri de 5,5 cm, foram colocados discos de 4 milímetros contendo o fungo, já crescido anteriormente por sete dias. Foram utilizados fungos isolados doados pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV Campus de Viçosa, já com suas cepas identificadas. Como controle negativo foi preparada uma solução de meio de cultura BDA, amoxicilina e Tween 80®. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e composto de cinco repetições em delineamento estatístico inteiramente ao acaso. Como controle positivo será utilizado o fungicida Cantus® 150g/100L. Após as placas foram acondicionadas em estufa do tipo BOD a 25 ± 1°C, sob fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com umidade relativa de 70 ± 10%, por 7 dias. Após 7 dias de início do experimento foram realizadas duas medições diametralmente opostas do halo fúngico, com paquímetro digital, para cada repetição. Os ensaios foram realizados duas vezes com a finalidade de assegurar a replicabilidade do teste.

2.2.7 Análise dos dados

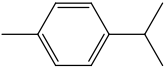
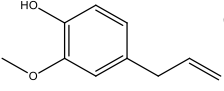
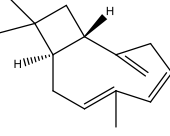
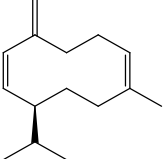
Para análise dos dados foi utilizado o pacote ExpDesp. Pt do programa R® de estatística, sendo a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1915): $mortcor = ((mort - média_controle) / (100 - média_controle)) * 100$. Posteriormente, os dados serão avaliados por análise de variância (ANOVA), em delineamento estatístico e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA et al., 2013).

2.3 RESULTADO E DISCURSSÃO

2.3.1 Caracterização dos compostos do óleo essencial de alfavaca

Os constituintes identificados no OE de alfavaca foram β -(cis)-cimeno, Eugenol, E-cariofileno e o Germacreno D (Tabela 1). Tendo como principal componente o eugenol, com cerca de 83% da composição do óleo. Outro composto que apresentou destaque foi o β -(cis)-cimeno, que é pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos, especificamente monoterpenos hidrogenados. Igualmente a outros terpenos, os compostos são insolúveis em água, e quando puros apresentam na forma oleosa, e são muito utilizados na perfumaria em razão ao seu aroma herbal adocicado, além de apresentam atividade na defesa das plantas e ação antifúngica (KARL *et al.*, 2002).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de alfavaca.

Pico	Índice calculado	Índice teórico	Nome da substância	Estrutura	% Área relativa (CG-DIC)	% Similaridade (CG-EM)
1	1038	1032	β -(cis)-cimeno		10,9145	96
2	1366	1356	Eugenol		83,3670	96
3	1415	1417	E-cariofileno		1,5642	94
4	1477	1484	Germacreno D		4,1543	95
Total	-	-	-	-	100,0000	-
Classes					Quantidade / área (%)	
Monoterpenos Hidrogenados					10,9145	
Monoterpenos Oxigenados					83,3670	
Sesquiterpenos Hidrogenados					5,7185	

 Sesquiterpenos Oxigenados

-

Compostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna SH-Rxi®-5HT. RT: Tempo de Retenção - minutos); IR_{Cal}: Índice de Retenção calculado através de dados obtidos por amostra de *n*-alcanos saturados (C7-C30); IR^{Tab}: Índice de Retenção tabelado; Dados utilizados das espectrootecas Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Oliveira *et al.* (2021) constatou em seu estudo a presença do eugenol em espécies do gênero *Ocimum spp.*, como a *Ocimum basilicum*, conhecida popularmente como manjerição, *Ocimum selloi* (manjerição anis), que indica a presença desse monoterpeno em plantas do gênero estudado. Neste trabalho, a análise da composição do óleo essencial de *O. gratissimum* indicou 83% de eugenol na composição, resultado próximo ao descrito por Vasconcelos *et al.* (2021), que apontou cerca de 89% de eugenol na composição do óleo da mesma planta. Já no trabalho de Araújo *et al.* (2021), o percentual de eugenol no óleo de *O. gratissimum* foi aproximadamente 48%.

Segundo Vanvuuren (2008), a diferença na composição de um óleo essencial pode ser explicada pela sazonalidade, fatores edafoclimáticos, e aspectos genéticos da planta, desse modo, a quantidade de um determinado componente, como o eugenol no OE de alfavaca, pode sofrer alterações consideráveis, com isso, diversos fatores podem estar associados a variabilidade da composição química do OE. Mesmo diante a uma variação de percentual, o eugenol permanece como composto majoritário no óleo essencial da alfavaca em diferentes estudos (SARTORATTO *et al.*, 2004; DAMBOLENA *et al.*, 2010).

2.3.2 Densidade e índice de refração do óleo essencial de alfavaca

A determinação da densidade se deu por meio de cálculos de média, após medida periódica de 10 alíquotas em uma seringa analítica de 10 µL. A densidade foi determinada por meio da equação 1:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad \text{Eq.1}$$

onde: ρ = densidade, m = a média das medidas das massas (g) e v = (mL)

Os valores referentes à densidade e ao teor de umidade das folhas e flores de alfavaca encontram-se na Tabela 2

Tabela 2. Determinação da umidade, da densidade e do índice de refração do óleo essencial de alfavaca.

Massa seca (g)	Teor de umidade (%)	Teor de umidade (%)	Densidade (g/mL)	Índice de refração
	Folhas	Flores		
60	76,62	78,51	0,895	1,521

Fonte: Próprio autor, 2022.

2.3.3 Ação antifúngica do óleo essencial de alfavaca sob condições *in vitro*

De forma geral, os resultados referentes à atividade de inibição micelial do OE de alfavaca e eugenol frente ao *B. cinerea* foram significativamente bons. Tendo em torno de 75 % (Tabela 3) de inibição na maior concentração avaliada para o OE de alfavaca avaliada (3,000 $\mu\text{L/mL}$) e aproximadamente 86% (Tabela 3) de inibição do crescimento do micélio do fungo o eugenol isolado. Observou-se, experimentalmente, que na concentração de 1,500 $\mu\text{L/mL}$, tanto para o OE de alfavaca quanto para o eugenol, o percentual de inibição de crescimento do micélio do *B. cinerea* foi considerável, cerca de 80%. Os resultados do ensaio para avaliar a atividade fungicida do OE de alfavaca e do eugenol estão dispostos na Tabela 3.

Vale destacar que a literatura descreve que o eugenol, presente no OE de alfavaca, devido às suas propriedades não mutagênicas e não cancerígenas, considerado seguro pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (RAJA *et al.*, 2015), tornando-se um composto interessante controle de doenças dentro do ramo da fruticultura.

Tabela 3. Avaliação da dose-dependência do OE essencial da alfavaca e do eugenol quanto ao percentual de inibição do crescimento micelial do *B. cinerea* sob condições controladas (*in vitro*).

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Inibição (%) ^a	
	Alfavaca	Eugenol
0,094 $\mu\text{L}/\text{mL}$	29 \pm 4 e	33 \pm 3 e
0,188 $\mu\text{L}/\text{mL}$	31 \pm 3 e	34 \pm 4 e
0,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	50 \pm 5 d	45 \pm 5 d
1,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	79 \pm 4 bc	79 \pm 1 bc
3,000 $\mu\text{L}/\text{mL}$	75 \pm 3 c	86 \pm 3 b
C(+)	100 \pm 0 a	100 \pm 0 a

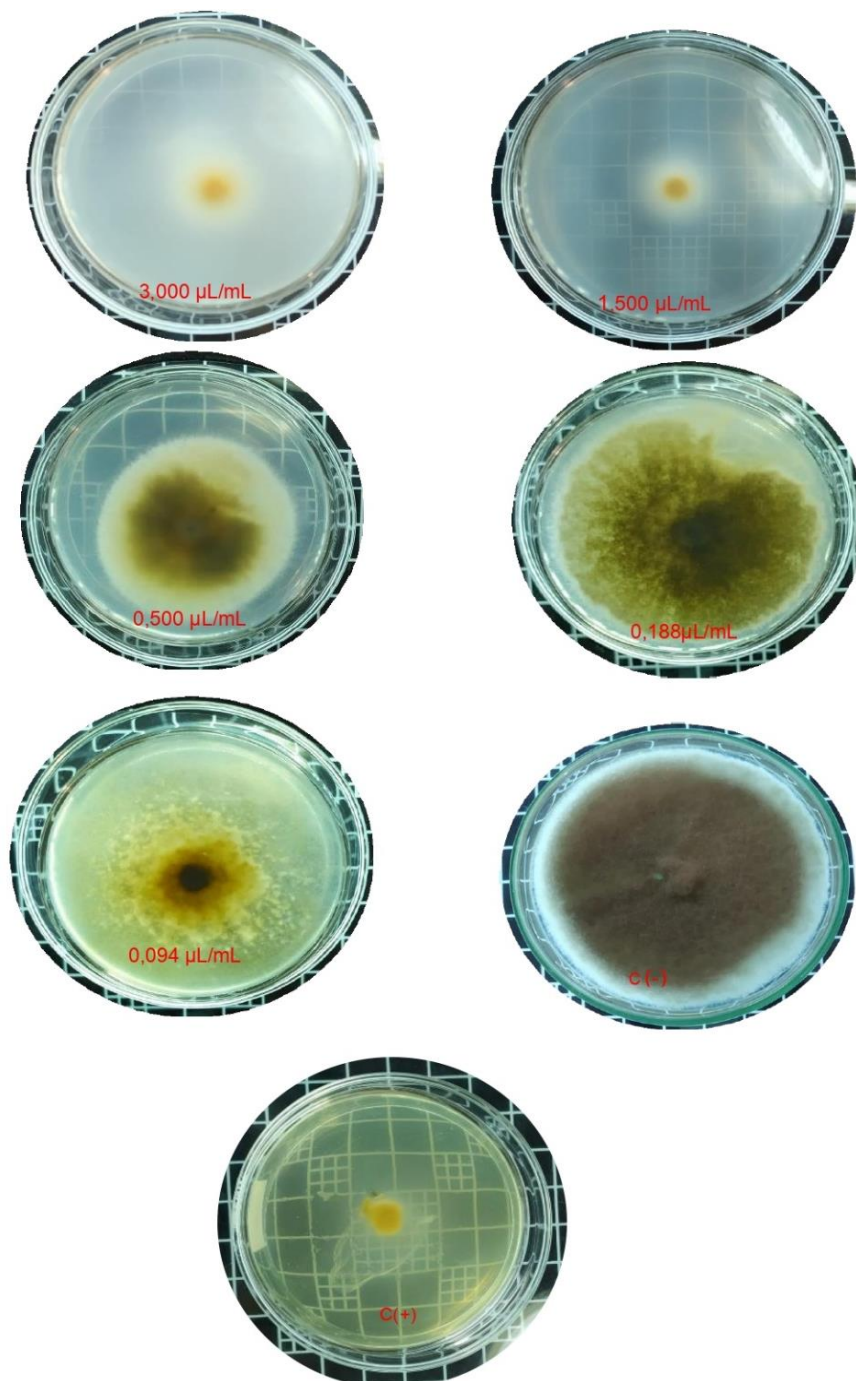
^aMédia de inibição \pm desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra, na coluna, não se diferenciam entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor, 2022.

Ao compararmos a efetividade do OE de alfavaca e do composto eugenol com o controle positivo (C+, Tabela 3), onde foi utilizado o fungicida comercial Cantus®, sendo observado que o fungicida comercial inibiu 100% do crescimento micelial do fungo (Figuras 3 e 4), como o esperado. Souza Júnior *et al.* (2009) constatou que o óleo essencial de alfavaca frente a inibição do crescimento micelial e germinação dos conídios do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* promoveu 100% de inibição, semelhante também ao trabalho de Amorim (2017), onde os resultados obtidos também foram de 100% de inibição a partir de uma concentração de 2000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, com a constituição do óleo essencial de alfavaca, possuindo aproximadamente 70% do composto fenólico eugenol nos fungos dos gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia*. No presente estudo, os dados obtidos indicam que a concentração de 1,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ inibiu cerca de 80% do crescimento micelial do *B. cinerea*, ocasionando uma relevância econômica em relação a quantidade de OE utilizada. Desta forma

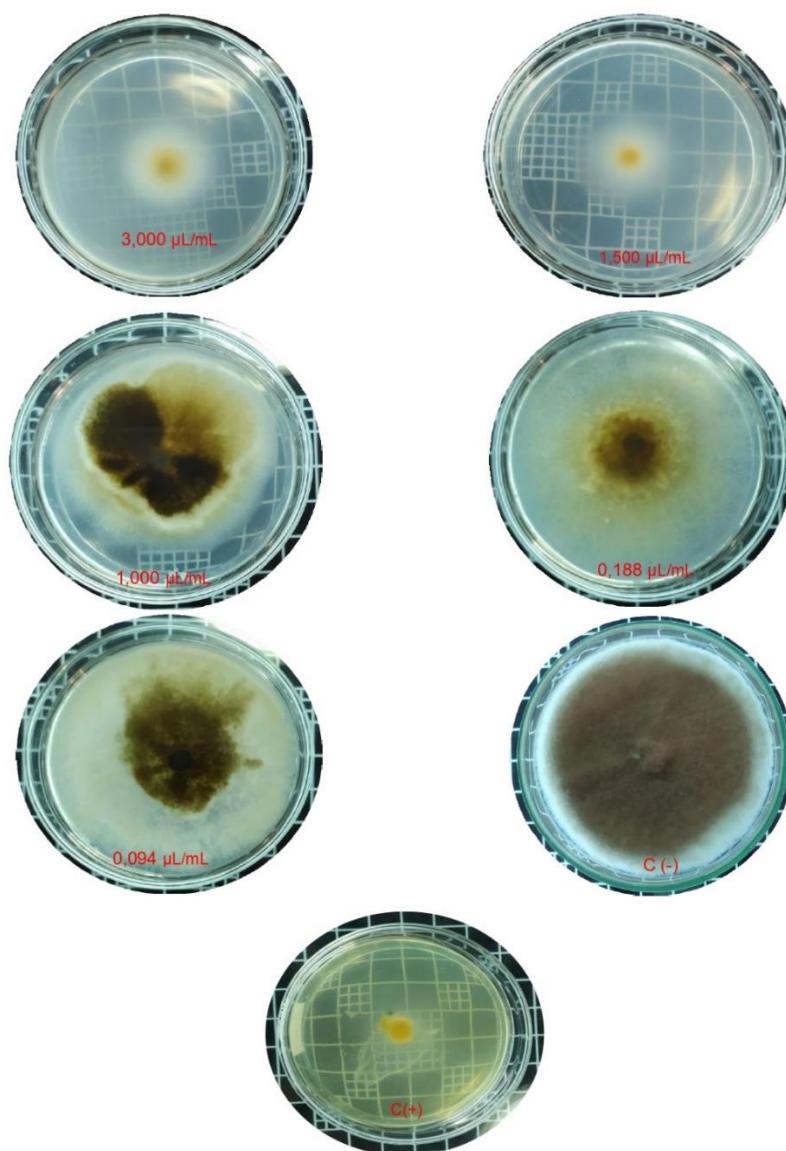
pode-se verificar a atividade de inibição no halo crescimento micelial do *B. cinerea*. As distintas concentrações usadas nos ensaios podem influenciar diretamente na coloração do patógenos (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Influência da concentração do eugenol na inibição do crescimento micelial do *B. cinerea*.



Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 4: Influência da concentração do OE de alfavaca na inibição do crescimento micelial do *B. cinerea*.

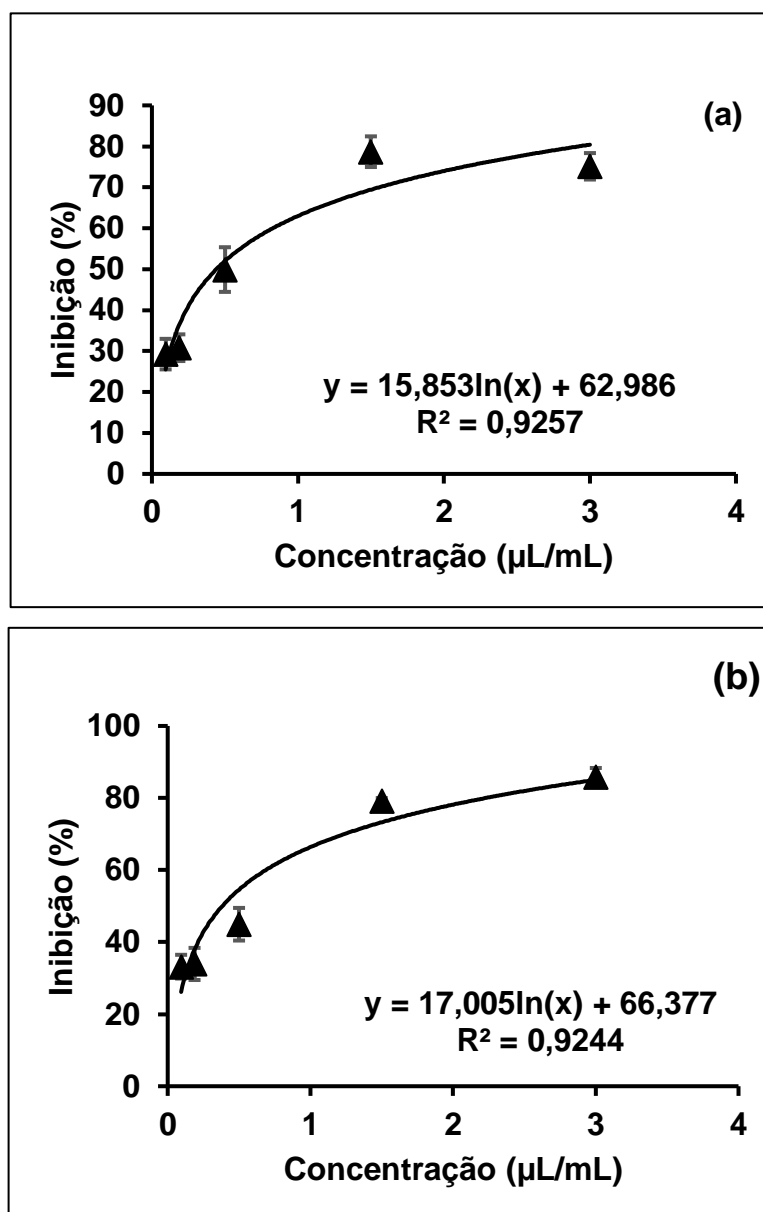


Fonte: Próprio autor, 2022.

2.3.4 Concentrações de inibição micelial (CI_{50} e CI_{90})

As concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento do micélio fúngico foram estimadas através das equações obtidas das Figuras 5(a) e 5(b), e encontram-se na Tabela 4.

Figura 5. Gráfico usado para estimativa da CI_{50} e CI_{90} frente ao crescimento micelial do *B. cinerea* usando o óleo essencial de alfavaca (a) e para o eugenol (b).



Fonte: Próprio autor, 2022.

Tabela 4. Estimativa da CI_{50} e CI_{90} frente ao crescimento micelial do *B. cinerea* usando o óleo essencial de alfavaca e o eugenol.

% de Inibição do micélio fúngico	Estimativa da Concentração ($\mu\text{L/mL}$) para o OE de alfavaca	Estimativa da Concentração ($\mu\text{L/mL}$) para o eugenol
CI_{50}	$0,4408 \pm 0,0418$	$0,3817 \pm 0,0836$
CI_{90}	$5,4960 \pm 1,7649$	$4,0115 \pm 0,7152$

Fonte: Próprio autor, 2022.

Quando se estima a CI_{50} e CI_{90} para o eugenol, através da curva obtida da Figura 5, nota-se que a concentração inibitória que inibe 50% do crescimento do micélio do *B. cinerea* foi um pouco menor comparado às CI estimadas para o OE de alfavaca, o que indica que o eugenol puro tende a ser mais tóxico ao fitopatógeno. De acordo com Diánez et al. (2021), o fungo *B. cinerea* apresenta pouca sensibilidade a um amplo espectro de óleos essenciais, exceto para aqueles cujo a composição contém eugenol, mostrando a efetividade do composto como um significativo fungicida, que apresenta atividade inibitória mesmo nas concentrações mais baixa.

Segundo Makhuvele *et al.* (2020), o mecanismo de ação do eugenol, composto majoritário do OE de alfavaca, sobre fungos toxigênicos tem sido relatado como relacionado à indução de apoptose precoce, por condensação nuclear, ou posteriormente, por dano à membrana plasmática nas hifas. Além disso, o composto eugenol causa regulação negativa de genes metabólicos secundários, como reguladores globais responsáveis pelo metabolismo de proteínas lipídicas e fúngicas, lipases, metaloproteases (MUÑOZ-SHUGULÍ *et al.*, 2021).

3. CONCLUSÃO

O óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*) mostrou-se eficiente frente a inibição micelial do *Botrytis cinerea*, sendo mais eficaz na concentração de 1,500 mL/mL concentração que inibiu cerca de 80% do fungo. O eugenol, composto majoritário do OE de alfavaca, também apresentou resposta promissora quanto à

inibição do crescimento micelial do *B. cinerea*. As concentrações inibitórias estimadas, CI_{50} e CI_{90} , tanto para o óleo essencial de alfavaca quanto para o eugenol indicaram que são necessárias pouquíssimas quantidades dos produtos para alcançar a inibição do crescimento micelial considerável, sendo estimada a CI_{50} de 0,44 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e a CI_{90} de 5,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o OE de alfavaca, enquanto para o eugenol as concentrações estimadas são menores, sendo de 0,38 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para CI_{50} e de 4,01 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para CI_{90} .

Com base nos resultados, pode-se concluir que o óleo essencial de alfavaca apresenta potencial para ser usado no manejo do *B. cinerea*, visto que sua ação na inibição do crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* apresentou resultado promisso. Entretanto, para afirmar que o OE de alfavaca possa ser usado no manejo agrícola, faz-se necessária a realização de mais estudos, como os testes *in vivo*.

4. REFERÊNCIAS

ADENEKAN, M. O.; JOHNSON, H. B. Changing Attitude in Agricultural Practices: Benefits and Hazards of Pesticides in Agriculture. **East African Scholars Journal of Agriculture and Life Sciences**, 2019.

AMORIM, A. R. S. **Caracterização de óleos essenciais e atividade antifúngica para patógenos de doenças na pós-colheita de mamão (*Carica papaya* L.)**. 2017. 67 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

ANDRADE, J.M. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.

ANTUNES, O. T. *et al.* Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 426-430, 2006.

ARAUJO, T. D. S. *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021.

AYE, M. M. *et al.* A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.

BALBINO, J. D. S. *et al.* O morango: na região de montanha Espírito Santo. **Boletim Informativo do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER**, 2013.

BALBINO, J. D. S; MARIN, A.J. Importância socioeconômica da cultura do morango para o estado do Espírito santo e o planejamento da produção comercial. **Tecnologias Para Produção Colheita e Pós- colheita de Morangueiro**, n.2, p.11-14, INCAPER,2006.

BALDIM, I. *et al.* Lippia sidoides essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-Candida agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73–81, 2019.

BANANI, H. *et al.* Tomilho e Óleo Essencial Salgado Eficácia e Indução de Resistência contra *Botrytis cinerea* através do Priming de Respostas de Defesa em Maçã. **Alimentos**, 2018.

BARROS GOMES, P.R. *et al.* Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.

BIZZO, R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

DA COSTA, A. F. Adaptabilidade, estabilidade e comportamento de cultivares de morangueiro em diferentes sistemas de manejo na Região Serrana do Espírito Santo. **INCAPER**. 2015.

DAMBOLENA, J.S. *et al.*, S.T.Essential oils composition of *Ocimum basilicum*L. and *Ocimum gratissimum*L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.

DA SILVA OLIVEIRA, S; HANADA, R. E; DE BRITO, R. S. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, 2019.

DE MATOS, S. P. *et al.* Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: a review. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 138, 2019.

DIÁNEZ, F. *et al.* Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 4, p. 400-410, 2018.

DRAWANZ, B. B. *et al.* Óleos essenciais e hidrolatos de orégano e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morangos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 4, p. 341-345, 2020.

DOS SANTOS, A.E. Importância química e biológica dos óleos voláteis de espécies do gênero *Eucalyptus*. **Scientia Naturalis**, v. 3, n. 1, 2021.

FARMAKOLOJIK, Ö; ÖZELLIKLERI, T. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 201-206, 2017.

FERRÃO, L.; GOMY, M. O morango enfeita o agroturismo das montanhas capixabas. Frutas para todos: estratégias, tecnologias e visão sustentável- **INCAPER: Sociedade Brasileira de Fruticultura**, 2014.

FERREIRA, E. B. *et al.* Experimental Designs package. **package version**, v. 1, p.12, 2013.

FIGUEIREDO, A. R; SILVA, L. R; DE MORAIS, L. A. S. Sensibilidade do *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro a óleos essenciais. **Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 8, n. 2, p. 19-30, 2021.

GALEANO, E. A. V. Valor bruto da produção agropecuária de 2016 e consolidação das estatísticas agropecuárias de 2017. **Boletim Informativo do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER**, 2017.

GARCIA, C. *et al.* Essential oils in the control of *Botrytis cinera*: influence on post harvest quality of Rubi grapes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

GOMES, H. O. *et al.* A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 197, p. 110627, 2020.

GÓES, D. F. *et al.* Toxic activity of essential oil of *piper duckei* (*piperaceae*) on microcrustacean artemia salina. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 96278-96284, 2020.

HASSANPOUR, Parviz; SHAMS-GHAHFAROKHI, Masoomeh; RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. Antifungal activity of eugenol on *Cryptococcus neoformans* biological activity and Cxt1p gene expression. **Current medical mycology**, v. 6, n. 1, p. 9, 2020.

HOSNI, K. *et al.* Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1098–1104, 2010.

HUIYU, H. *et al.* Efeitos do óleo essencial de *Origanum vulgare* e seus dois componentes principais, carvacrol e timol, sobre o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. **PeerJ**, v. 8, p. e9626, 2020.

INCAPER, 2019. Disponível em <https://incaper.es.gov.br/fruticultura>, acesso em: 11 de abril de 2022.

KAEL, I. *et al.* Agrotóxicos liberados nos anos de 2019-2020: uma discussão sobre uso e a classificação toxicológica. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n. 7, p. 49468-49479, 2020.

Karl, G. F. *et al.* **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2002.

KARYMATHIL, D.P. *et al.* Efficacy of trans-cinnamaldehyde and eugenol in reducing *Acinetobacter baumannii* adhesion to and invasion of human keratinocytes and controlling wound infection in vitro. **Phytotherapy Research**, v.30, p. 2053-2059, 2016.

KASPER, A. A. M. *et al.* Comparação da atividade antifúngica do óleo comercial e do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* Juss) frente a fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.6, p.54-62, 2018.

LEE, S.Y.; JIN, H.H. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p.315-321, 2008.

LINARD, C.F.B.M. **Estudo do efeito antinociceptivo do Eugenol**. Fortaleza, 90 f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, 2008.

LOPES, C. V. A; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

LORENZETTI, E. R. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinérea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 619–627, 2011.

MAIA, T. F; DONATO; A, FRAGA, M. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015

MBAVENG, A. T.; KUETE, V. *Syzygium aromaticum*. **Elsevier**, 2017.

MAK, K.K. *et al.* A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: a transformation from ethnomedicine to industry. **Pharmacognosy Reviews**, v. 13, n. 25, 2019.

MAKHUVELE, R. *et al.* The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins. 2020.

MEHER, G.; CHAKRABORTY, H. Influence of eugenol on the organization and dynamics of lipid membranes: a phase-dependet study. **Lagmuir**, v. 34, p. 2344-2351, 2018.

MELO, A. R. B. *et al.* Lippia sidoides and Lippia organoides essential oils affect the viability, motility and ultrastructure of Trypanosoma cruzi. **Micron**, v. 129, 2020.

MUÑOZ-SHUGULÍ, C. *et al.* Beta-Cyclodextrin: Eugenol Inclusion Complexes: Characterization and Antifungal Capacity. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM**, p. 463–477-463–477, 2021.

NASCIMENTO, H. Incaper faz experiência com cultivo orgânico de morango em Montanha. **INCAPER**, 2020. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/incaper-faz-experiencia-com-cultivo-organico-de-morango-em-montanha>, acesso em: 20 de abril de 2022.

NIKKHAH, M. *et al.* Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. International journal of food microbiology, **Elsevier**, v. 257, p. 285–294, 2017.

OLIVEIRA FILHO, J. G. *et al.* Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais e suas combinações contra *Botrytis cinerea* em morangos. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1815-1825, 2021.

OLIVEIRA BARBOSA, C. *et al.* Chemical composition and antioxidant potential of essential oils from different *Ocimum* species (Basil). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 24422-24442, 2021.

PALFI, M.; KONJEVODA, P.; VRANDEČIĆ, K. Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Bortytis cinerea*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 544-554, 2019.

PEREIRA, C. A. M; MAIA, F.J. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Sociedade**

Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 3, p.624-632, out. 2007.

RAJA, M.R.C. *et al.* Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 5, 2015.

RASTOGI, N. *et al.* Screening of natural phenolic compounds for potential to inhibit bacterial cell division protein FtsZ. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 783-787, 2008.

REICHERT, L. J; MADAIL, J.C.M. Aspectos socioeconômicos na produção do morango em clima temperado, **EMBRAPA- Frutas do Brasil**, p.12-15, 2003.

SARTORATTO, G.A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p.275-280, 2004.

SINGH, P. *et al.* Inhibitory effect of clove oil nanoemulsion of Fumosin isolated from maize kernels. **LWT - Food Science and Technology**, p. 110237, 2020.

SILVA, T. M. T. *et al.* Panorama da fruticultura no Espírito Santo – Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental – GVAA**, V. 8, n. 2, p. 1-8, 2014.

SILVA-TRUJILLO, L. *et al.* Essential Oils from Colombian Plants: Antiviral Potential against Dengue Virus Based on Chemical Composition, In Vitro and In Silico Analyses. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6844, 2022.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, n.22, v.3, 2009.

SOUZA, T. S. *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, V. 216, p. 38 - 44, 2017.

TANGERINO, L. M. B. **Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol**. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, 2006.

TERAO, D. *et al.* Identificação e manejo de doenças fúngicas da melancia. **Comunicado Técnico–Embrapa. Jaguariúna-SP**, 2019.

TRIPHATI, P., DUBEY, NK & SHUKLA, AK Uso de alguns óleos essenciais como fungicidas botânicos pós-colheita no manejo do mofo cinzento da uva causado por *Botrytis cinerea*. **World J Microbiol Biotechnol**. v 24, p. 39-46, 2008.

TONI, D. *et al.* Image Configuration of Organic Food and its Motivation for Consumption. **Ambiente & Sociedade**, v. 23, 2020.

VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**, v.119, n.3, 462-472, 2008.

VASCONCELOS, S. C. *et al.* Composição química, atividade bactericida e antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* (*Lamiaceae*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e51810817109-e51810817109, 2021.

VERAS, H. N. H. *et al.* Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790–S2795, 2017.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica. São Paulo: **Roca**, 2010.

