
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOYCE MARIA SCHUCH

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Azadirachta indica* CONTRA O FITOPATÓGENO**
Phyllosticta citricarpa



Rio Claro - SP
2023

JOYCE MARIA SCHUCH

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Azadirachta indica* CONTRA
O FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o Dr. Ederio Dino Bidoia

Coorientador: M. Sc. Carolina Rosai Mendes

Supervisor: Prof. Dr. Guilherme Dilarri

Rio Claro - SP
2023

S384a	<p>Schuch, Joyce Maria</p> <p>Avaliação do óleo essencial de Azadirachta indica contra o fitopatógeno <i>Phyllosticta citricarpa</i> / Joyce Maria Schuch. -- Rio Claro, 2023</p> <p>41 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Ederio Dino Bidoia</p> <p>Coorientadora: Carolina Rosai Mendes, Guilherme Dilarni</p> <p>1. Fungicida. 2. Análise de Toxicidade. 3. Mancha Preta dos Citros. I.</p> <p>Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

JOYCE MARIA SCHUCH

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Azadirachta indica* CONTRA
O FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia (orientador)

M. Sc. Carolina Rosai Mendes (coorientador)

Prof. Dr. Guilherme Dilarri (supervisor)

Aprovado em: 03 de Dezembro de 2023

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

Assinatura da coorientadora

Assinatura do supervisor

*Dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa
possa ajudar de alguma forma.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, mesmo com a distância física, me dando todo o suporte necessário para realizar esta jornada. Obrigada por terem acreditado que meus objetivos poderiam ser alcançados, o qual foi fundamental para que encontros incríveis e necessários acontecessem.

Ao Tavio, meu querido irmão, por compartilhar de sua força e por me fazer acreditar na minha. Muito obrigada pelo seu amor, carinho, incentivo e companhia nos dias tristes e felizes, chuvosos e ensolarados, mas principalmente nos dias que precisei não sabendo que precisava. Sempre serei grata por ser e estar com você nessa aventura juntos. Eu só sou eu porque você é você, e assim como eu, não cortou o fio que nos une. Espero que possamos ser irmãos “futuro”, “antigo” e “sempre”.

Aos meus amigos da faculdade, em especial aos quintonzinhos, que durante o curso tornaram a estadia em Rio Claro mais agradável e que sempre estiveram ao meu lado: Babi, Lu, Giseka, Lava, Paizana, Prof, Bev e Enzo. Agradeço por terem me mostrado novos horizontes e inspirações nesses cinco anos e acima de tudo, por terem transformado dias normais em dias infinitamente melhores. Desejo a vocês o melhor que a vida possa oferecer, como também muita força e coragem para enfrentar tudo que possa vir acontecer. Levo comigo um pedacinho de cada um pra sempre.

À Luana, minha amiga, companheira, roommate e irmã, por ter dividido sua força e me incentivado a cada passo que dei nesses anos, mas principalmente pela atenção que dedicou a mim. Não há detalhe mais bonito que a atenção. Obrigada por todas as noites de conversa e delírios, refeições, bagunças artísticas, filmes, risadas, presentes, videochamadas e rolês. Espero que o grito dos seus sonhos seja alto, mas que não te ensurdeça, não te cegue da realidade e não te imobilize na ação. Sempre serei grata por esse encontro, já que é no encontro que a gente se encontra.

Aos voluntários, monitores e funcionários dos programas de voluntariado das unidades de conservação PEIA e PESM que fiz parte durante minha graduação,

pelo companheirismo, mas principalmente por se mostrarem extremamente cuidadosos, companheiros, receptivos e prestativos durante todo o período. Agradeço imensamente pela experiência imersiva disponibilizada, a qual culminou com um sentimento de pertencimento, não apenas com o local mas com o mundo. Levarei comigo todas as memórias, vivências e perrengues que seguramente contribuíram e contribuirão com minha formação como profissional e como cidadã.

Ao meu orientador e coorientadora, Ederio Dino Bidoia e Carolina Rosai Mendes, que sempre estiveram presentes dando conselhos, correções, sendo pacientes e se mostrando dispostos a me auxiliar em qualquer coisa que eu precisasse. Obrigada pela confiança depositada em mim, bem como, pelo constante incentivo. Com toda certeza me fizeram aprender e crescer muito como profissional e pesquisadora. Levarei comigo uma grande admiração de vocês.

Aos grupos que fiz parte ao longo da graduação, Coletivo Negro Feminino, Centro Acadêmico da Biologia e Programa de Educação Tutorial (PET) da Biologia que me fizeram olhar através de outros olhos às necessidades da comunidade, como também pelo auxílio na interação e transformação da realidade que estou inserida. Agradeço imensamente aos ensinamentos.

À Coordenadoria de Permanência Estudantil (Cope) pela concessão do auxílio de permanência ao longo de toda minha graduação, a qual foi fundamental para manutenção e permanência em Rio Claro, sendo que durante a vigência da mesma pude iniciar as pesquisas que, posteriormente, resultaram em uma iniciação científica e no trabalho de conclusão de curso.

Por fim, agradeço a UNESP e todo seu corpo docente e funcionários pelas oportunidades que foram proporcionadas a mim como pessoa, estudante, pesquisadora e bióloga.

RESUMO

A citricultura possui grande relevância na agricultura e consumo mundial entre as culturas frutíferas, na qual o Brasil liderou em segundo lugar como o maior produtor mundial de frutas cítricas em 2019. No entanto, como qualquer cultura que compõe o mercado global, os *Citrus* estão sujeitos ao ataque de diversos agentes fitopatogênicos, como a Mancha Preta dos Citros (MPC) causado pelo fungo *Guignardia citricarpa*, a qual vem sendo associada como uma das principais doenças que limitam exportações, impactando na produção agrícola mundial. Para o controle do fungo *Guignardia citricarpa*, o principal método nacionalmente utilizado tem sido de aplicações intensivas de fungicidas sintéticos, os quais já se tem conhecimento do seu papel altamente prejudicial em organismos não-alvos como também ao Meio Ambiente. Uma outra possibilidade de controle seria a utilização de produtos vegetais naturais, visto que seus ativos sofrem degradação naturalmente além de apresentarem ação biocida contra patógenos e pragas. Neste sentido, a presente pesquisa teve como principal objetivo a investigação do potencial fungicida do Óleo Essencial de Neem (*Azadirachta indica*) contra o fitopatógeno *P. citricarpa* para propor alternativas acessíveis e sustentáveis ao mercado. Para tal, foi realizado análise de sensibilidade do *P. citricarpa* através do método de disco de micélio por perfuração em ágar, como também foi determinado a concentração inibitória do OEs de Neem através do tamanho do micélio em teste de crescimento em ágar, análise do halo por medição através do programa Image J IV, análise de fitotoxicidade do OEs de Neem; e caracterização do OEs de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS). Os resultados experimentais mostraram que o OEs de Neem possui capacidade de substituição ao fungicidas sintéticos por ter apresentado como mecanismo de ação o aumento da permeabilidade da membrana seguida de rompimento do citoplasma do fungo *Guignardia citricarpa*, contudo nenhuma das concentrações testadas inibiram totalmente o crescimento micelial da Mancha Preta dos Citros, como também apresentou toxicidade na fase inicial germinativa neste estudo, mesmo em baixas concentrações. Neste sentido, sugere-se que outros estudos sejam conduzidos, principalmente no que se refere ao teste de controle in vivo e outros métodos de controle de forma conjunta.

Palavras-chave: Fungicida; Análise de Toxicidade; Mancha Preta dos Citros.

ABSTRACT

Citrus farming has a great relevance in the worldwide agriculture and consumption among fruit crops, in which Brazil led in second place as the world's largest producer of citrus fruits in 2019. However, just like any crop that composes the global market, the citrus is susceptible to the attack of several phytopathogenic agents, such as Citrus Black Spot (CBM) caused by the fungus *Guignardia citricarpa*, which has been pointed out as one of the main diseases that hinders the exports volume, impacting on world agricultural production. In order to control the *Guignardia citricarpa* fungus, the main method used nationally has been the intensive applications of synthetic fungicides, which are already known to be highly harmful to non-target organisms and to the environment. Another possibility for control would be the use of non-synthetic plant-derived products, since their active ingredients are naturally degraded overtime, besides having a biocidal action against pathogens and pests. Thus, considering all of these factors, the main objective of this research was to investigate the fungicidal potential of Neem Essential Oil (*Azadirachta indica*) against the phytopathogen *P. citricarpa* in order to offer accessible and sustainable alternatives to the market. To do so, a sensitivity analysis of *P. citricarpa* was performed using the mycelium disc method by perforation in agar. Additionally, the inhibitory concentration of Neem OEs was determined through mycelial size in an agar growth test, halo analysis measured using the Image J IV software, Neem OEs phytotoxicity analysis, and characterization of Neem OEs via Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The experimental results showed that Neem OE has the potential to replace synthetic fungicides, as its mechanism of action involved increased membrane permeability followed by cytoplasmic rupture of the *Guignardia citricarpa* fungus. However, none of the concentrations tested completely inhibited the mycelial growth of Citrus Black Spot. Moreover, it exhibited toxicity during the initial germination phase in this study, even at low concentrations. In this regard, it is suggested that further studies should be carried out, especially concerning in vivo control tests and other integrated control methods.

Keywords: Fungicide; Toxicity Analysis; Citrus Black Spot.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	<i>Gerais.....</i>	16
2.2	<i>Específicos.....</i>	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	<i>Local de Estudo.....</i>	17
3.2	<i>Óleo Essencial de Neem (Azadirachta indica).....</i>	17
3.3	<i>Análise de Atividade Fungicida do OE de Neem.....</i>	18
3.4	<i>Análise de Toxicidade do OE de Neem.....</i>	19
3.5	<i>Ensaio de Microscopia de Fluorescência.....</i>	22
3.6	<i>Caracterização do Óleo Essencial de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS).....</i>	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	<i>Análise de Atividade Fungicida do OE de Neem.....</i>	23
4.2	<i>Análise de Toxicidade do OE de Neem.....</i>	26
4.3	<i>Ensaio de Microscopia de Fluorescência.....</i>	29
4.4	<i>Caracterização do Óleo Essencial de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS).....</i>	30
5	CONCLUSÃO.....	34
6	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Cultivadas em mais de 140 países do mundo, as frutas do gênero *Citrus*, tais como as laranjas, limões, limas e tangerinas, possuem grande relevância na agricultura e consumo mundial entre as culturas frutíferas. Com o crescente comércio internacional ao longo das últimas três décadas, além do rápido desenvolvimento tecnológico da indústria, as frutas cítricas têm sido reconhecidas como um alimento importante devido seu papel fundamental no fornecimento de energia e nutrientes para saúde humana, contribuindo tanto economicamente quanto nutricionalmente (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012)

De acordo com o Boletim Estatístico de Frutas Cítricas Frescas e Processadas publicado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), em 2019 registrou-se produção mundial de 143.755.6 milhões de toneladas de cítricos, destes, 76.292.6 milhões de toneladas sendo apenas laranjas. Para o mesmo ano, foram registrados no Brasil, a produção de 19.652.8 milhões de toneladas totais de citros, os quais mais de 70% da produção do país são destinados ao processamento da fruta para a produção de suco e subprodutos, tornando o Brasil o segundo maior produtor mundial de frutas cítricas, e tendo em primeiro lugar a China (FAO, 2020; 2021).

No Brasil, as citrinas se expandiram para todo o país, sendo o estado de São Paulo o principal produtor, principalmente de Tahiti e tangerinas (LOPES et al, 2011). E como qualquer cultura que compõe o mercado global, os *Citrus* estão sujeitos ao ataque de diversos agentes fitopatogênicos que agem, isoladamente ou em conjunto, nas suas diferentes fases de formação e desenvolvimento, causando sintomas severos que limitam suas exportações e impactam na produção agrícola mundial (SANTOS FILHO et al., 2005).

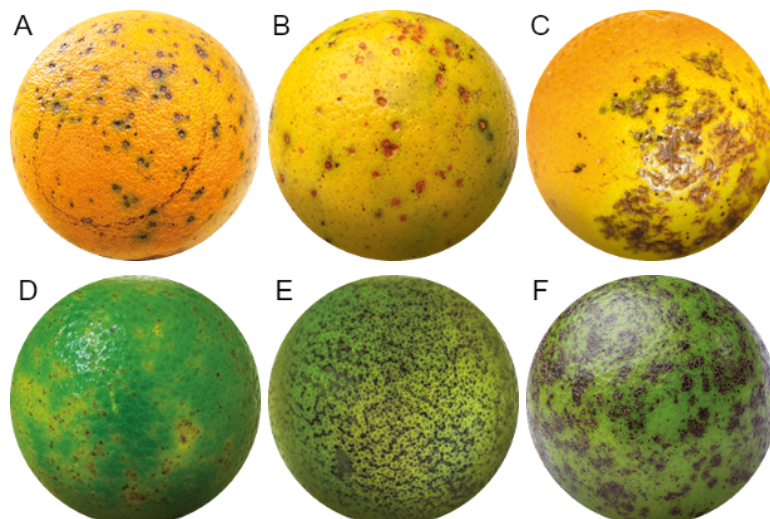
Descoberto por Kiely em 1948 em New South Wales na Austrália, a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada por *Guignardia citricarpa* (na fase anamorfica *Phyllosticta citricarpa*), é uma das principais doenças fúngicas dos *Citrus* em todo o mundo, prevalentemente em regiões que apresentam verões quentes e úmidos, com destaque o Brasil, Estados Unidos, México, China e África do Sul, visto que a radiação solar associada a altas temperaturas favorece a manifestação dos sintomas (TRAN et al., 2018). Nesse sentido, e com a previsão de aumento de temperatura global decorrente das mudanças climáticas, a temperatura média na

região sul do Estado de São Paulo aumentará, o que conseqüente favorece a intensidade da doença na principal região brasileira produtora de *citrus sp* (JESUS JÚNIOR et al, 2008).

Os esporos do fungo *G. citricarpa*, tanto os ascósporos quanto os conídios, possuem papel direto na multiplicação, disseminação e ataque aos diferentes tecidos das plantas pelo MPC, os quais os ascósporos se dispersão pelo vento e os conídios por meio de respingos de chuva (SPOSITO, 2003). Contudo, os ascósporos, considerado os mais importantes na epidemiologia da doença, são produzidos somente em folhas infectadas em decomposição, por sua vez, os conídios, fonte adicional de inóculo, são produzidos em lesões de ramos, espinhos, pedúnculos, frutos e folhas vivas da planta (CARSTENS et al . al. 2017). Ainda assim, lesões causadas pela doença MCP são vistas predominantemente em frutos, e de frequência relativamente rara em folhas e galhos (SANTOS FILHO et al., 2005).

É sabido na literatura diversos sintomas possíveis de serem vistos nos frutos, de forma que a MPC seja comumente categorizada em seis tipos: Mancha-marrom ou Mancha-dura; Mancha sardenta; Mancha-virulenta ou Mancha-negra; Pinta Preta ou falsa Melanose; Mancha-rendilhada; e Mancha-trincada (SILVA-JÚNIOR et al., 2016). No entanto, se destaca como principal sintoma, lesões afundadas na superfície da casca do fruto, principalmente nas faces mais expostas à luz solar, além de queda prematura dos frutos, principalmente em cultivares de maturação tardia (TRAN et al., 2018).

Figura 1 – (A) Mancha-dura, (B) Mancha sardenta, (C) Mancha virulenta, (D) Falsa melanose, (E) Mancha-rendilhada, (F) Mancha´trincada.



Fonte: Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus (2023)

À suscetibilidade de infecção nos frutos de quase todos os *Citrus spp.*, com exceção de *Citrus aurantium* e seus híbridos, ocorre desde a frutificação até 6 meses depois, onde a lesão fica restrita ao flavedo, nunca provocando apodrecimento pós colheita e perda de qualidade da polpa (KOTZE, 1981; BRENTU *et al.*, 2012). Apesar dos compostos fenólicos presentes no epicarpo poderem exibir ação antimicrobiana e antiviral, como os flavonóides, antocianinas e coumarinas, na presença de umidade e temperatura adequada, o patógeno consegue permanecer latente entre 4 a 6 meses após o amadurecimento dos frutos, antes que os vários tipos de sintomas pré e pós-colheita sejam apresentados (CARDOSO-FILHO, 2003).

Quando os frutos são infectados, mas assintomáticos durante a colheita, há a possibilidade de desenvolver os sintomas durante o transporte ou armazenamento. Ainda que não haja nenhum caso documentado de disseminação através de frutas infectadas sem folhas e pedúnculos para áreas precedentemente livres da doença, lesões causadas pelo *G. citricarpa* reduzem tanto o valor comercial no mercado in natura quanto às exportações para a União Européia (UE), além de induzirem perdas significativas de rendimento, devido às quedas prematuras dos frutos, os quais podem chegar a perdas de 40% da produção (GOTTWALD *et al.*, 2021; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016).

Em relação a requisitos fitossanitários específicos, a importação de frutas cítricas que apresentam sintomas da doença MPC para UE e outros países, não é permitida. Tais restrições impactam significativamente o Brasil, tanto no número de exportadores quanto no volume de frutas cítricas exportadas para a UE, já que ela é a maior importadora dos frutos cítricos brasileiros (SPOSITO, 2003).

No Brasil, a comercialização de frutas cítricas é autorizada para Unidades Produtivas que se encontram sob o Sistema para o Manejo de Risco - SMR da MPC, e com Certificação de Origem, visto que em nosso país a MPC se enquadra na categoria de praga quarentenária A2, conforme Instrução Normativa MAPA nº 45, de 22/08/2018, já que está presente no país, mas ainda não está amplamente distribuída (SAA, 2022). Em vista que, para a exportação à Comunidade Europeia é necessário a habilitação dos pomares e das Unidades de Consolidação, além do monitoramento permanente dos mesmos para pragas *Xanthomonas citri*, *G. citricarpa*, controle de moscas-das- frutas, verrugose, leprose e outras pragas (SAA, 2022), visto que em muitos países da UE a doença está ausente, os quais

estabelecem restrições fitossanitárias à importação de frutas cítricas frescas de países onde é conhecida a ocorrência de MPC, fato que, enquadra tal doença em quarentenária A1 na Europa (MARTÍNEZ-MINAYA *et al.*, 2015).

Em áreas endêmicas de MPC, muitas são as medidas de controle usadas no pré e pós-colheita, a fim de limitar o desenvolvimento, a sobrevivência e a viabilidade do inóculo da lesão. Sendo baseadas na pulverização de fungicida em locais ou épocas sujeitas à doença, as condições de temperatura de envio ou armazenamento; além de métodos químicos que aceleram a decomposição de folhas cítricas com presença de esporos, tratamentos de embalagens para limpeza e sanitização, e uso de irrigação por gotejamento, se mostram ótimas medidas eficazes (GOTTWALD *et al.*, 2021). Contudo, devido ao longo período de latência do *G. citricarpa*, o controle da doença é dificultado, visto que o aumento dos custos de produção e manejo de pomar, frente à necessidade de maiores aplicações de fungicidas, é decisivo (GOEZ, 1998).

Visto que a escolha do produto adequado para cada situação é fundamental no controle eficiente, já que erros podem comprometer a vida útil do fungicida e, em alguns casos, gerar resistência dos fungos a alguns princípios ativos utilizados, o Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas (FRAC), classifica os pesticidas que controlam doenças fúngicas, de acordo com: Modo de Ação Bioquímico (MOA), Local de Ação, Nome do Grupo, Família Química e Comportamento de Resistência cruzada (FRAC, 2022). A fim de auxiliar, citricultores, pesquisadores e profissionais do setor citrícola, outras classificações também podem ser usadas, como a sua mobilidade na planta (sistêmicos, mesostêmicos e não sistêmicos) e princípio geral de controle (protetores, curativos e erradicantes) (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016).

Apesar do alto custo, aplicações de fungicidas sintéticos, do tipo cúpricos e estrobilurinas (Qols), têm sido a estratégia mais utilizada e que tem propiciado os melhores resultados no manejo da Mancha Preta dos Citros no Brasil, principalmente nos pomares paulistas. Entre os cúpricos, estão os hidróxidos de cobre, oxicloreto de cobre e óxido cuproso; e entre as estrobilurinas, estão azoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina, as únicas registradas no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Devido à sistemicidade de fungicidas sistêmicos, como os benzimidazóis, tais são irrelevantes para o controle da MPC em frutos, apesar de seu uso já ter sido mostrado extremamente eficaz no

passado (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016). O uso sequencial excessivo de fungicidas, além de causar sintomas severos de fitotoxicidade nos frutos pode gerar resistência do *P. citricarpa* aos seus ingredientes ativos, como já foi visto na África do Sul pelo uso do benomil composto ativo benzimidazol (HERBERT & GRECH, 1985).

Produção de resistência ao fungo frente a fungicidas, não fica restrito a um país ou produto utilizado. No fim dos anos 90 no estado de São Paulo, apenas duas aplicações anuais de fungicidas já se mostravam eficientes no controle da MPC, contudo em poucos anos, quatro aplicações já eram necessárias em algumas áreas. Do ano de 2010 até os dias atuais, seis aplicações, sendo as duas primeiras com cúpricos e as demais com estrobilurinas ou benzimidazóis associados ou não com fungicidas não sistêmicos, passaram a ser realizadas (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016).

O risco de seleção de novas populações de fungos resistentes não se mostra o único fator preocupante quando é analisado o volume de calda adotado para o controle da MPC, o qual é considerado extremamente alto em diversos países. Possuindo grande potencial de atingir o solo e as águas, a utilização de fungicidas, sem intervalos de aplicações corretas e doses e produtos não recomendados, representam grande risco ao Meio Ambiente, principalmente para agentes polinizadores. Além disso, possui grande risco a saúde humana, visto que qualquer que seja o percurso do fungicida no meio ambiente, invariavelmente o homem é seu potencial receptor, podendo causar doenças como disfunção renal, neoplasia hepatocelular e anemia hemolítica (VAN-ZWIETEN, 2004; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016; BAYRAM *et al.*, 2016).

É importante destacar que os polinizadores estão entre os componentes essenciais para o funcionamento dos ecossistemas em geral. A abelha africana *A. mellifera* é o inseto mais frequente em flores de culturas de laranja, de forma que na sua ausência ou diminuição de sua visitação, a diminuição na porcentagem de fecundação pode vir a ser causada na planta, e conseqüentemente, podendo gerar impactos na produção desses frutos, tanto na quantidade quanto em sua qualidade (MALERBO-SOUZA, 2003).

Não somente, vários trabalhos vêm demonstrando o imenso impacto que os fungicidas causam em diversos organismos não-alvos, tanto terrestres quanto aquáticos. Efeitos dos fungicidas cúpricos com cobre met lico fixo, como oxicloreto de cobre e hidróxido de cobre, já foi relatado nas comunidades microbianas do solo

(DU-PLESSIS *et al.*, 2005), no crescimento e reprodução de *Eisenia fetida* (HELLING, REINECKE, REINECKE, 2000), na citotoxicidade e genotoxicidade em células da raiz de *Allium cepa* (LIMAN, *et al.*, 2021), nas alterações da glândula digestiva do caramujo *Helix aspersa* (SNYMAN, REINECKE, REINECKE, 2005), no impacto neurotóxico em ratos (EL-HAK & MOBARAK, 2019), efeitos na alimentação de lesmas e caramujos (CAPINERA & DICKENS, 2016), resistência a antibióticos em *Escherichia coli* (YU *et al.*, 2022) entre outros.

Partindo disso, nas últimas décadas, a quantidade máxima de cobre permitida na proteção das plantas foi constantemente restringida na UE, e atualmente é limitada pela legislação europeia a um máximo de 28 kg por ha durante um período de 7 anos (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Contudo, dependendo das condições climáticas, cultivares ou sistemas de produção, a quantidade máxima de cobre permitida e seu uso real possuem uma considerável variabilidade entre os produtores na agricultura europeia (KATSOULAS, 2020). Tal fato, não reflete somente a falta de conscientização entre os agricultores sobre a necessidade de reduzir o uso de cobre, mas também a disponibilidade e acessibilidade de produtos alternativos para os mesmos (TAMM *et al.*, 2022).

Novas estratégias ecologicamente corretas devem ser aplicadas para reduzir ou evitar os riscos provenientes do uso de fungicidas químicos sintéticos e aperfeiçoar medidas no controle alternativo o qual, apresentem a mesma eficiência de controle.

Mostrando um crescente interesse em métodos de controle mais sustentáveis e pressão imposta por alguns países, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos, principalmente de origem orgânica, como os produtos vegetais naturais, visto que seus ativos sofrem degradação após entrar em contato com luz, água e oxigênio (EL-KHETABI *et al.*, 2022). Sintetizados como metabólitos secundários pelas plantas, os óleos essenciais vegetais (OEs) possuem ação biocida contra patógenos e pragas, os quais contêm diferentes classes de compostos fenólicos, a depender do genótipo da planta e de sua composição química (KNAAK & FIUZA, 2010). O incentivo do uso potencial dos OEs como tratamento natural, tanto pré-colheita ou pós-colheita, se deve as suas várias características vantajosas, como por possuírem efeitos mínimos nos organismos não-alvos e retardarem a ocorrência de resistência em pragas, além

de serem biodegradáveis (EL-KHETABI *et al.*, 2022).

Em particular, diferentes OEs, como os extraídos de *Chenopodium ambrosioides* e *Conyza bonaerensis*, demonstraram inibição completa no crescimento e reprodução do fungo *G. citricarpa* em frutos de limão (*Citrus limon*) e laranja Valência (*Citrus sinensis*), além de demonstrarem inibição de outros fungos, como *Colletotrichum gloeosporoides* e *Fusarium sp.* (LOMBARDO *et al.*, 2016).

Sendo a planta inseticida mais estudada da Terra, a planta Neem (*Azadirachta indica*), vem sendo utilizada como potencial para produtos alternativos aos agrotóxicos, devido à presença de um grupo variado de substâncias bioativas com elevado efeito biológico em seu óleo essencial; entre estas substâncias estão azadiractina, meliantrol e salanina (NARAGNAN, 1980).

Apesar de não ser natural do Brasil e ter sido introduzida recentemente em nosso território, a planta *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como Neem ou Margosa, pertencente à família Meliaceae, e originária da Índia e Mianmar, possui um forte apelo comercial em nosso país, devido a obtenção de madeira e extratos aquosos e alcoólicos para agricultura, além de ser abundante na natureza, se adaptar bem ao clima quente do Brasil e possuir baixa toxicidade (NEVES & CARPANEZZI, 2009) (LIMA, 2022).

Portanto, esse estudo visa avaliar o potencial fungicida do óleo essencial de Neem (*A. indica*) contra o fitopatógeno *P. citricarpa* para propor alternativas acessíveis e sustentáveis ao mercado, de forma a garantir o equilíbrio dos ecossistemas, visto que avaliar o potencial fungicida, como também analisar a toxicidade de compostos alternativos é essencial, principalmente aqueles que apresentem níveis altos de degradação.

2 OBJETIVO

2.1 Gerais

Avaliar o potencial fungicida e a toxicidade do OEs de Neem (*A. indica*) contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, causador da MPC.

2.2 Específicos

- I. Analisar a sensibilidade do *P. citricarpa* através do método de disco de micélio por perfuração em ágar;
- II. Determinar a concentração inibitória do OEs de Neem através do tamanho do micélio em teste de crescimento em agar;
- III. Analisar o halo por medição através do programa Image J IV;
- IV. Analisar a fitotoxicidade do óleo essencial de Neem;
- V. Caracterizar o OEs de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido na UNESP (Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho), Campus de Rio Claro, no Departamento de Biologia Geral e Aplicada, no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente. Todos os materiais utilizados foram descartados de acordo com as Normas Técnicas de proteção ao meio ambiente (ABNT NBR 10.004: Resíduos Sólidos - Classificação, 2004).

3.2 Óleo Essencial de Neem (*Azadirachta indica*)

Os OEs são compostos naturais de baixo custo com potencial uso em processos de sanitização. Nesse estudo foi utilizado o OEs de Neem (*A. Indica*) da marca Laszlo com 97% de grau de pureza e extração por processos de prensagem a frio. Esse processo de extração reduz a degradação e volatilização dos compostos do óleo essencial e garante a integridade das propriedades do vegetal. Além disso, o grau de pureza elevada garante avaliar a ação fungicida com o mínimo de impurezas residuais que podem interferir no desempenho do estudo.

Figura 2 – Óleo Essencial utilizado



Fonte: Marca LASZLO (2023)

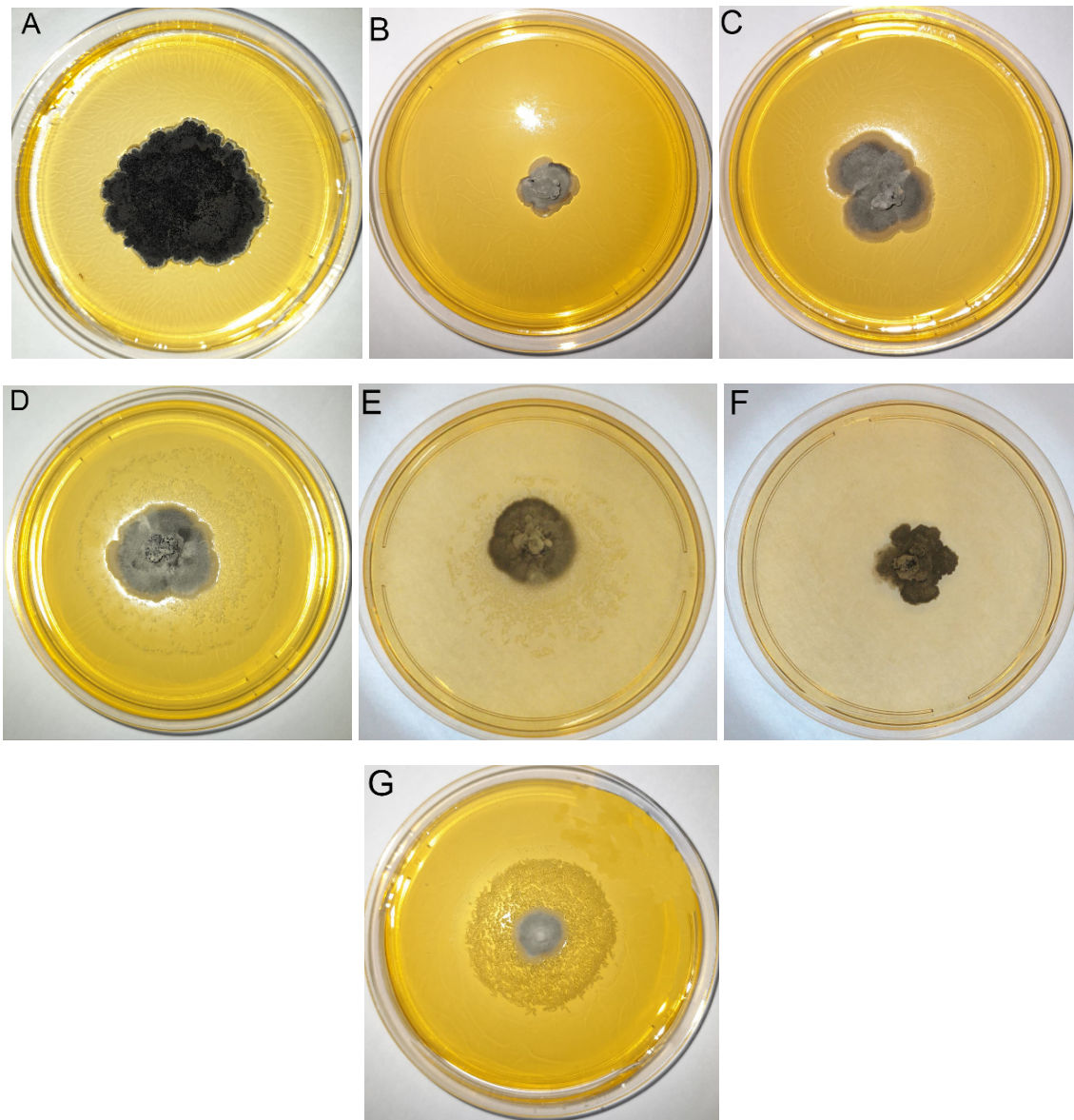
3.3 Análise de Atividade Fungicida do OE de Neem

O isolado de coloração preta e característica aveludada *P. citricarpa* foi obtido do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, no laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente. O repique ocorreu em meio de cultura YEPD da marca HiMedia e o acondicionamento em câmara climatizada tipo B.O.D., a $\pm 27^{\circ}\text{C}$, por sete dias. Para análise da atividade fungicida, foi adicionado ao centro das placas Petri contendo meio YEPD, 400UI de diferentes concentrações do OEs de Neem, espalhados com alça de Drigalski, individualmente. As concentrações avaliadas foram: 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 26; 50; 76; 100 uL/mL, obtidas a partir de uma diluição em álcool (P.A.). Após 2 horas, foi adicionado ao centro das placas Petri, discos de micélio do fungo *P. citricarpa*, com aproximadamente 6 mm de diâmetros, retirados de culturas já crescidas. Para o tratamento controle negativo, foi adicionado, apenas, o disco do micélio em meio YEPD, e para os tratamentos controles positivos foram adicionados um disco de micélio em placas Petri com meio YEPD, contendo difere (Oxicloreto de Cobre), individualmente, espalhados com auxílio da alça de Drigalski. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 27°C em B.O.D por 7 dias. Após o período de incubação, os halos foram medidos e analisados a fim de determinar a inibição de crescimento do fungo a partir da média de duplicatas com os respectivos desvios padrões (DS). A partir dos resultados obtidos determinou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) por meio da fórmula apresentada abaixo, com o auxílio do programa Image J a fim de mensurar o perímetro do crescimento do halo.

Equação Inibição do Crescimento Micelial (PICM)

$$PICM = \left(\frac{\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}}{\text{Diâmetro da testemunha}} \right) \cdot 100$$

Figura 3 – Efeito das concentrações (μl) de *Azadirachta indica* sobre o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* (mm) após 7 dias incubados. (A) controle negativo, (B) controle positivo, (C) 0,4 μl , (D) 0,6 μl , (E) 50 μl , (F) 76 μl , (G) 100 μl .



Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

3.4 Análise de Toxicidade do OE de Neem

Com o objetivo de analisar o grau de toxicidade do OEs de Neem, foram realizados ensaios de toxicidade com sementes de *Cucumis sativus*. Ensaios de controle foram feitos utilizando água deionizada por osmose reversa e estéril, e ensaios com as concentrações de melhores resultados obtidos nos estudos anteriores. O teste toxicológico caracteriza o grau de toxicidade de um contaminante. A germinação de plantas é um fenômeno biológico onde o embrião,

em condições ambientais adequadas, entra em atividade metabólica. O desenvolvimento do tecido vegetal pode ser afetado quando em contato com substâncias tóxicas. Para o teste foram utilizadas sementes de *Cucumis sativus* da marca ISLA PARK sem defensivos agrícolas, índice de 98% de desempenho germinativo e 100% de pureza. As sementes não possuem melhoramento genético ou fatores transgênicos. As placas de Petri foram preparadas com papel filtro embebido através da adição de 5 mL de diferentes concentrações do OEs de Neem utilizados neste estudo, sendo em seguida alocadas 20 sementes de *L. sativa* em triplicatas. Cada placa recebeu uma camada de papel alumínio para simular um ambiente escuro para sua germinação, seguida de uma alocação em B.O.D. por 5 dias a 21°C. Após o período de crescimento foram realizadas mensurações das radículas em centímetros e contabilização do número de sementes germinadas (MONTEIRO & DELLAMATRICE, 2006). Como controle positivo foi utilizado sulfato de zinco 0,05 molar e controle negativo, água deionizada por osmose reversa estéril. O procedimento segue de acordo com o teste descrito por Sobrero e Ronco (2008) e Monteiro e Dellamatrice (2006) com modificações e visa a toxicidade através dos cálculos de Germinação Relativa (Equação 1) e Elongação Radicular Relativa (Equação 2). O fator entre a Elongação Radicular e a Germinação Relativa das sementes é avaliado pelo Índice de Germinação (Equação 3) por Araujo (2010).

Equação 1.

$$\text{Germinação Relativa (\%)} = \frac{\text{Número de Sementes Germinação na Amostra}}{\text{Número de Sementes Germinação no Controle}} \cdot 100$$

Equação 2.

$$\text{Elongação Radicular Relativa (\%)} = \frac{\text{Elongamento Médio na Amostra}}{\text{Elongação Médio no Controle}} \cdot 100$$

Equação 3.

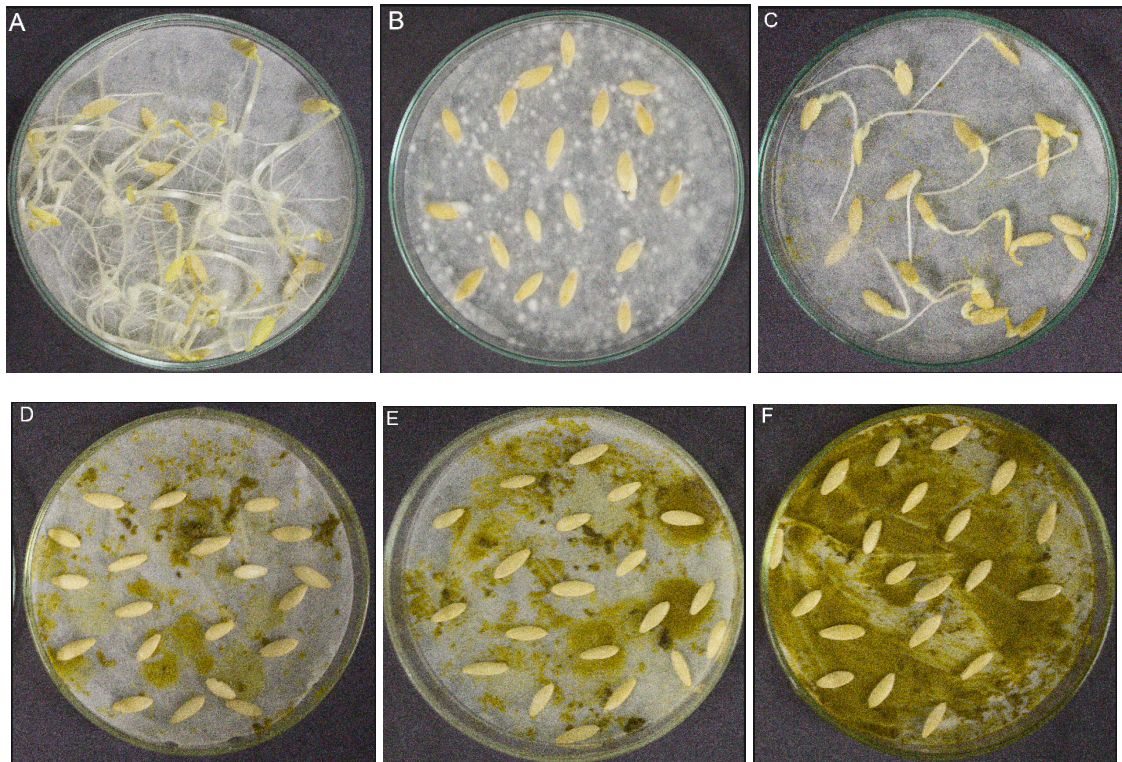
$$\text{Índice de Germinação (\%)} = \frac{\text{Germinação Relativa (\%)} \cdot \text{Elongação Radicular Relativa (\%)}}{100}$$

Figura 4 – Sementes utilizadas



Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

Figura 5 – Sementes de *Cucumis sativus* após 5 dias na câmara de germinação. (A) controle negativo, (B) controle positivo, (C) 0,4 (D) 20 (E) 40 (F) 60



Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

3.5 Ensaio de Microscopia de Fluorescência

A integridade da membrana de *P. citricarpa* foi avaliada pelo Live/Dead - Yeast Viability Kit da Thermo Fisher (Waltham, EUA). O micélio fúngico foi previamente cultivado em caldo YPD a 28 °C sob agitação a 150 rpm por 10 dias. Em seguida, o micélio foi separado por centrifugação a 4000 × gForce e permaneceu em contato por 30 min com óleo de neem para inibição de *P. citricarpa*. Os corantes SYTO-9 e iodeto de propídio (PI), na concentração de 50 µM, foram adicionados para corar o micélio fúngico e avaliar por ensaio de microscopia de fluorescência a viabilidade da célula. Os micélios fúngicos foram imobilizados em agarose 1% (Sigma-Aldrich, Alemanha) até cobrir as lâminas e visualizados em aparelho Olympus BX-61 (Tóquio, Japão), equipado com câmera monocromática OrcaFlash 2.8 (Hamamatsu, Japão). As imagens foram processadas pelo software CellSens versão 11 (Olympus).

3.6 Caracterização do Óleo Essencial de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS)

A análise GC-MS foi realizada com o modelo GC-MS QP-2010 Shimadzu (Kyoto, Japão) e acoplado a um detector de massa, que se encontra no departamento de bioquímica e microbiologia da Unesp, Rio Claro/SP. A coluna de sílica fundida DB-5 (300 mm × 0,25 mm × 1 µm df) foi utilizada com gás de arraste He (1 mL min⁻¹) a uma pressão de 89 KPa. A aceleração eletrônica foi de 70 eV para ionização e taxa de varredura de 0,5 varredura/seg. O óleo de neem foi extraído em acetato de etila e injetado no modo de proporção 10:1 Split. A temperatura inicial do injetor foi mantida em 210 °C por 2 min, após o que foi aumentada para 280 °C a uma taxa de 5 °C/min. Os parâmetros de processamento do espectro de nível MS1 com o Wavelet (ADAP) foram realizados seguindo o método de Ni et al. (2016). Todos os arquivos do GC-MS (mzData) foram processados no software MZmine 2.53 seguindo os parâmetros descritos por Elie et al. (2019).

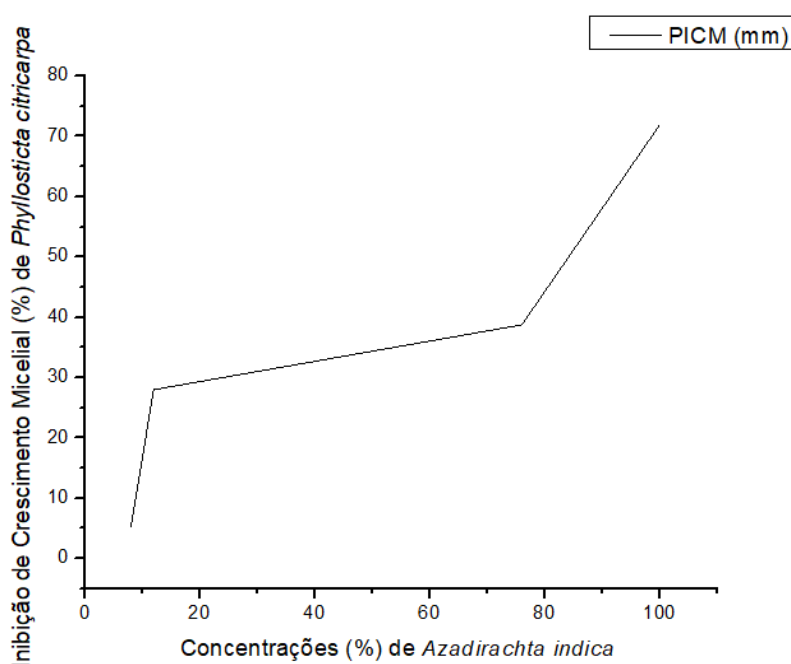
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de Atividade Fungicida do OEs de Neem

Devido aos resultados obtidos no decorrer do experimento, as concentrações de óleo essencial de Neem utilizadas foram sendo modificadas com o intuito de detectar a porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PICM) de *Phyllosticta citricarpa*, de forma a apoiar na análise da atividade fungicida.

Apesar de mínimo, a redução do crescimento micelial foi visto a partir da concentração 0,4%, contudo não significativo até a concentração 8% visto que as concentrações 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1%; 2%; 4%; e 6% não apresentaram entre si um Inibição de Crescimento Micelial (PICM) progressivo significativo (dados não apresentados) de forma que os experimentos posteriores se concentraram a partir da concentração 8%. Tais resultados foram de grande importância para a continuidade da pesquisa, visto que efeito mínimo antifúngico foi detectado previamente.

Figura 6 – Efeito das concentrações (μ l) de *Azadirachta indica* sobre a Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial de *Phyllosticta citricarpa* (mm).



Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

O aumento da concentração do óleo de Neem (8%, 12%, 76% e 100%) no meio de cultura resultou em redução no número de esporos de *Phyllosticta citricarpa*, chegando ao máximo de 71,87% (concentração de 100% de Neem) de inibição em comparação com o controle positivo, indicando que o fungo apresenta sensibilidade ao produto testado frente às propriedades antifúngicas presentes (Figura 6). Os ensaios com concentrações entres estes apresentados não foram estatisticamente significativos (dados não apresentados).

Apesar da não inibição total do crescimento micelial (100%<PICM), tal fato não descarta o potencial do OE de *Neem* como controle químico, visto que tal apresenta compostos que agem contra *Phyllosticta citricarpa* os quais podem ser usados concomitantemente com outro óleo essencial a fim de mostrar possíveis resultados mais significativos no controle. BASWA *et al.*, (2001) relatou que o óleo de Karanja (*Pongamia glabra*) apresenta efeito sinérgico quando associado ao óleo de Neem, podendo aumentar sua eficiência bactericida na maioria dos patógenos estudados por ele. O mesmo foi visto entre Karanja e Neem contra *Sclerotinia sclerotiorum*, o causador do mofo branco, sendo a concentração de 100 µg mL⁻¹ de Neem 1/3 de Karanja a mais eficiente (GARCIA *et al.*, 2012). Esses dados comprovam que a mistura de óleos essenciais podem ser utilizados concomitantemente, porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados no controle do *P. citricarpa*.

Outros óleos essenciais, e também extratos, já foram estudados frente a ação contra *Phyllosticta citricarpa*. TAKESHITA *et al.*, (2014) demonstrou que extratos aquosos obtidos a partir de alho e cebola inibiu o crescimento micelial em até a 67,6%. LOMBARDO *et al.*, (2016) por sua vez em sua pesquisa elucidou que dos 15 óleos essenciais do Uruguai estudados, cerca de 4 óleos apresentaram inibição intermediária (*Conyza bonariensis*; *Schinus molle*; *Baccharis dracunculifolia*; *Schinus molle H*), apresentando valores superiores a 50% de inibição do *Phyllosticta citricarpa*.

Tabela 1. Efeito das concentrações (μL) do OE de óleo de *Azadirachta indica*, em comparação aos tratamentos adicionais (Controle Negativo e Oxidoreto de Cobre), na porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PICM) de *Phyllosticta citricarpa*.

Tratamentos	PICM
Controle Negativo	0,0
Oxidoreto de Cobre	72,96
8 μL de <i>Azadirachta indica</i>	5,15
12 μL de <i>Azadirachta indica</i>	27,96
76 μL de <i>Azadirachta indica</i>	38,75
100 μL de <i>Azadirachta indica</i>	71,87

Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

Observando a tabela 1, valores apoiados por três repetições realizadas, demonstra que as concentrações de 8%, 12% e 76% apresentaram menos de 50% de PICM, sendo a menor delas de 5,15% em comparação com o controle negativo, enquanto que para o controle positivo (Oxidoreto de Cobre) e a concentração de 100% do OE de Neem apresentaram os maiores valores como também grande semelhança entre si, 72,96% e 71,87% respectivamente.

A eficácia da ação antimicrobiana de um OE segundo ao um determinado organismo a combater é atribuída a um composto principal presente e/ou pelo conjunto dos compostos de ação sinérgica do mesmo, visto que a inibição de patógenos pelo composto puro pode vir a ser semelhante, inferior ou superior ao do óleo (COMBRINCK *et al.*, 2011).

Apesar de relatado que a ação sinérgica entre os principais compostos de um OE como mais importante do que os compostos individuais no controle de patógenos, devido principalmente às variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal, como também fatores climáticos, geográficos e sazonais, as composições químicas de OE com ações sinérgicas são mais difíceis de controlar (VAN VUUREN, 2008), e desta forma a utilização de compostos individuais são alternativas de controle.

KONOHA & BUDIDA (2011) em seu estudo demonstrou que o extrato clorofórmico presente nas folhas de *Neem* demonstrou moderada atividade antibacteriana enquanto que para o extrato hexânico apresentou baixa. (GUEDES *et al.*, 2022) em sua revisão, destaca a Azadiractina, um composto presente na semente da planta *Neem*, com capacidade de controle relevante frente a fungos,

vírus e principalmente bactérias, como também contra pragas. Desta forma elucidada que apesar do resultado negativo de não inibição total do *Phyllosticta citricarpa* pelo o OE de Neem, persiste a importância da utilização de tal, ou mais especificamente, de seus compostos individuais como Fenol e Siringol que foi visto nesta pesquisa e que será mais bem elucidado ao fim dos resultados.

4.2 Análise de Toxicidade do OEs de Neem

Devido aos resultados obtidos no decorrer dos experimentos envolvendo a atividade fungicida (4.1), a escolha das concentrações de óleo essencial de Neem utilizadas para análise de sua toxicidade foram 0,4%, 20%, 40% e 60%, visto que resultados anteriores demonstraram que a partir da concentração 0,4% efeitos antimicrobianos foram observados (dados não apresentados) como também que nas maiores concentrações (12%, 76% e 100%) resultados foram muito mais significativos na inibição de crescimento micelial (Tabela 1).

Tabela 2. Efeito das concentrações (μL) do OE de óleo de *Azadirachta indica*, em comparação aos tratamentos adicionais (Controle Negativo e Sulfato de Zinco), no Índice de Germinação (%) de *Cucumis sativus*.

Tratamentos	Índice de Germinação (%)	Média do Comprimento Radicular
Controle Negativo	100	7,15
Sulfato de zinco	0,0	0,0
0,4 uL de <i>Azadirachta indica</i>	47,95	3,43
20 uL de <i>Azadirachta indica</i>	0,0	0,0
40 uL de <i>Azadirachta indica</i>	0,0	0,0
60 uL de <i>Azadirachta indica</i>	0,0	0,0

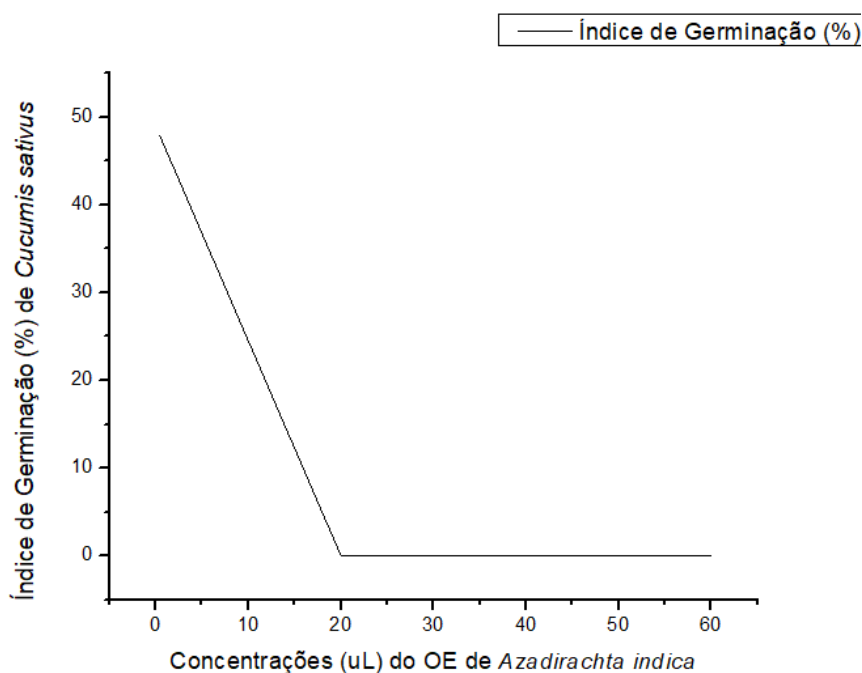
Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

Através do Índice de Germinação (%) é possível analisar o fator entre a Elongação Radicular e a Germinação Relativa. Observando os resultados (Tabela 2) nota-se que o óleo essencial de Neem na concentração de 0,4% proporcionou Índice de Germinação de 47,95% das sementes de *Cucumis sativus*, enquanto que para o controle negativo apresentou germinação máxima (100%) e para o restante do

tratamento nem houveram germinação. Verificou-se também que a Média do Comprimento Radicular para o controle negativo e para concentração 0,4% foram respectivamente 7,15% e 3,43%, elucidando que da mesma forma que a concentração 0,4% mostrou efeitos na redução micelial de *P. citricarpa* (dados não apresentados) a mesma concentração foi responsável por diminuir em 3,72% o comprimento radicular em comparação com o controle negativo de forma a elucidar que até a menor concentração utilizada apresenta toxicidade (Tabela 2).

Deve-se atentar para o fato de que por ser tratar de um composto oleoso diluído na água, nem sempre a água utilizada para embeber o papel filtro das sementes estava com a máxima concentração do OE para aquele tratamento, o que pode influenciar no resultado encontrado nas germinações para o tratamento de 0,4%, podendo o resultado observado aqui se mostrar menos, pior ou semelhante em outros experimentos. Apesar disso, é interessante constatar que mesmo diluído em água a menor concentração testada apresenta capacidade de prejudicar a germinação.

Figura 7 – Efeito das concentrações (μ l) de *Azadirachta indica* sobre o Índice de Germinação de *Cucumis sativus*



Fonte: Elaborado pela Autora (2023)

Ainda em relação ao Índice de germinação, nos tratamentos de 20%, 40% e 60%, houve diferença significativa entre o controle negativo, controle positivo e o tratamento 0,4% (Tabela 2) de forma que os valores obtidos constatarem que o Óleo Essencial de Neem, apesar de apresentar como mecanismo de ação à inibição do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, possui um efeito prejudicial na germinação das sementes devido a sua composição química.

Como alternativa e com objetivo de alcançar maiores chances de eficácia de controle sustentável da CBS, outros métodos utilizados de forma concomitantemente, como biocontrole, podem vir a serem empregados visto que é uma metodologia utilizada para fins de redução de possíveis níveis de toxicidades apresentados pelo controle químico, o qual foi visto neste experimento (4.2). Para isso, estudos envolvendo a aplicação conjunta do OE de Neem com os agentes de biocontrole contra a Mancha Preta dos Citros devem ser mais bem explorados, já que é sabido que compostos químicos podem se comportar tanto como supressivo quanto como condutora a doenças das plantas (PEREIRA *et al.*, 1996)

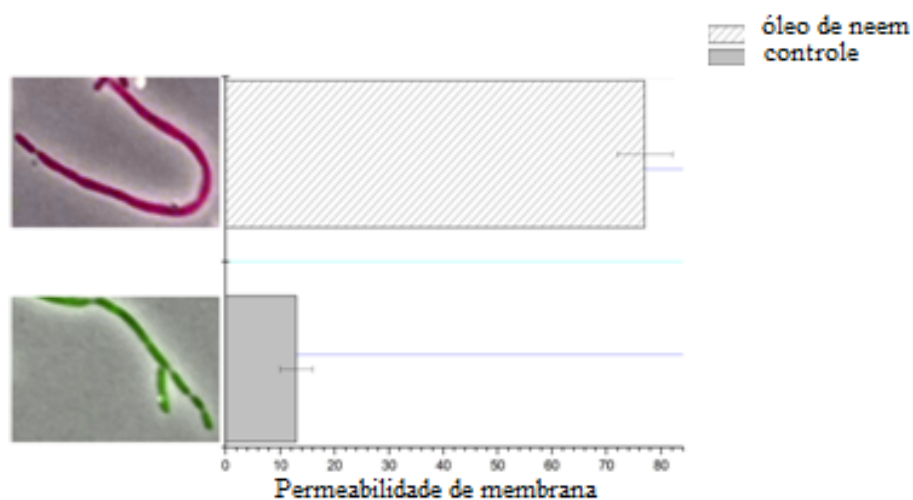
MATTO (2010) verificou através de controle *in vivo* que os antagonistas *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens* e *Pichia sp* reduziram o número de lesões causados pela Mancha Preta dos Citros em até 30%, que apesar de um controle não significativo, analisando o efeito de alguns óleos essenciais fixos e essenciais, tal como o OE de Neem, este especificamente em concentração de 100.000 ppm não inibiu tais antagonistas. Sendo este resultado promissor para a aplicação conjunta do óleo essencial com os agentes de biocontrole em experimentos *in vivo* em espécies cítricas.

Outros agentes de controle biológicos já foram estudados contra *Phyllosticta citricarpa*. GUIMARÃES (2012) demonstrou que a utilização de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma spp.* pode ser uma medida auxiliar no manejo de controle da mancha preta dos citros. O mesmo foi visto em uma avaliação da microbiota endofítica de citros realizada por CORREA (2008), o qual destacou *Bac2*, *Bac8* e *Trichoderma sp* como potenciais agentes biocontroladores da MPC. Portanto, é indispensável realizar estudos com a mistura de óleos e antagonistas.

4.3 Ensaio de Microscopia de Fluorescência

Para avaliar os mecanismos de ação do óleo de Neem, foram realizados ensaios de microscopia de fluorescência com o kit Live/Dead. Onde, se a membrana citoplasmática vier a ser danificada, levando a célula à morte, o PI entrará na célula corada de vermelho (MINDUBAEV *et al.*, 2020). Os resultados mostraram que as hifas do fungo foram diretamente afetadas pelo rompimento da membrana citoplasmática após o contato com o óleo de neem (Figura 8).

Figura 8 – Hifas do fungo *Phyllosticta citricarpa* após ensaios de microscopia de fluorescência



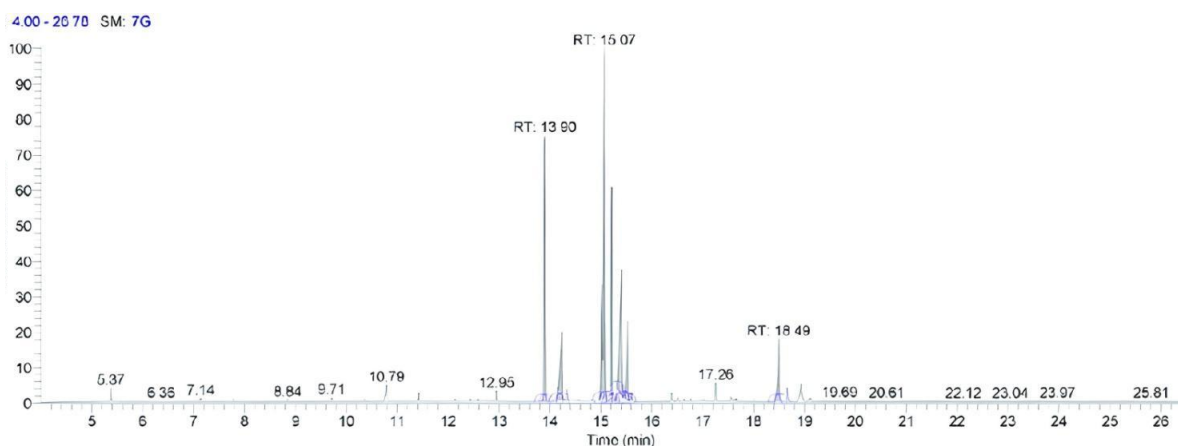
Fonte: Elaborado pela Autora (2022)

A ramificação do micélio do fungo após a exposição ao óleo de Neem apresentou uma hifa de coloração vermelha, isso comprovou que o efeito do óleo de Neem é sobre a membrana citoplasmática de *P. citricarpa*. O controle apresentou integridade completa da membrana citoplasmática celular (hifas verdes). Silva *et al.*, (2019) correlacionaram os mecanismos de ação do óleo essencial de Neem contra os fungos como *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum* com o rompimento da membrana citoplasmática. Os resultados do presente estudo corroboram com Silva *et al.*, (2019), e comprovam o efeito do óleo de Neem na membrana citoplasmática. Os óleos essenciais em geral afetam a membrana citoplasmática dos fungos, levando conseqüentemente à lise do citoplasma celular (DAS *et al.*, 2020; GUO *et*

al., 2023). Esse mesmo efeito de ação já foi observado em bactérias como *Klebsiella pneumoniae* (YANG *et al.*, 2020). No entanto, esta é a primeira vez que este mecanismo de ação do óleo essencial de Neem foi observado em *P. citricarpa*. É muito importante identificar o mecanismo de ação dos compostos antimicrobianos, para poder analisar possíveis mecanismos de resistência gerados pelos microrganismos e assim, garantir a segurança do uso do óleo essencial contra microrganismos. Portanto, é possível afirmar com os resultados obtidos, que o óleo essencial de Neem não seleciona ou induz resistência em *P. citricarpa*, pois para haver resistência seria necessário que as hifas de *P. citricarpa* passassem por vários eventos de mutações genéticas para alterar todos os componentes e estrutura da membrana citoplasmática (HUANG & CHARRON, 2017).

4.4 Caracterização do OEs de Neem por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS)

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados de estudos *in vitro* deste tipo, é necessária uma análise química precisa dos óleos usados, e para isso a caracterização do óleo de neem foi feita por GC-MS. Assim, foi possível investigar e compreender a atividade antifúngica química. Os padrões de fragmentação espectral de massa foram comparados com o banco de dados do National Institute of Standards and Technology Mass Spectral (NIST-MS). O espectral de GC-MS mostrou bandas marcadas de acordo com o tempo de retenção (RT) de diferentes compostos identificados pelo peso molecular (Figura 4). Para determinar os principais compostos, uma tabela foi criada para melhor elucidá-los (Tabela 3).

Figura 9 - Espectral de Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS)

Fonte: Elaborado pela Autora (2022)

Tabela 3. Compostos identificados pelo espectro de GC-MS.

Nome dos compostos	Óleo Neem RT
9-Octadecenoic acido, methyl Ester	15.07
6-Octadecanoic acido	15.41
Syringol, 2,6-Dimethoxyphenol	13.90
Methyl stearate	15.21
L-Ascorbic acido 2,6-dihexadecanoate	14.23
Oleic acido, (2,2-dimethyl-1,3-dioxolanyl) methyl Ester	5.01
Phenol, 2,4-bis-1,1-dimethylethyl	18.49
2,6-Dimethyl-1,4-benzoquinone	10.79

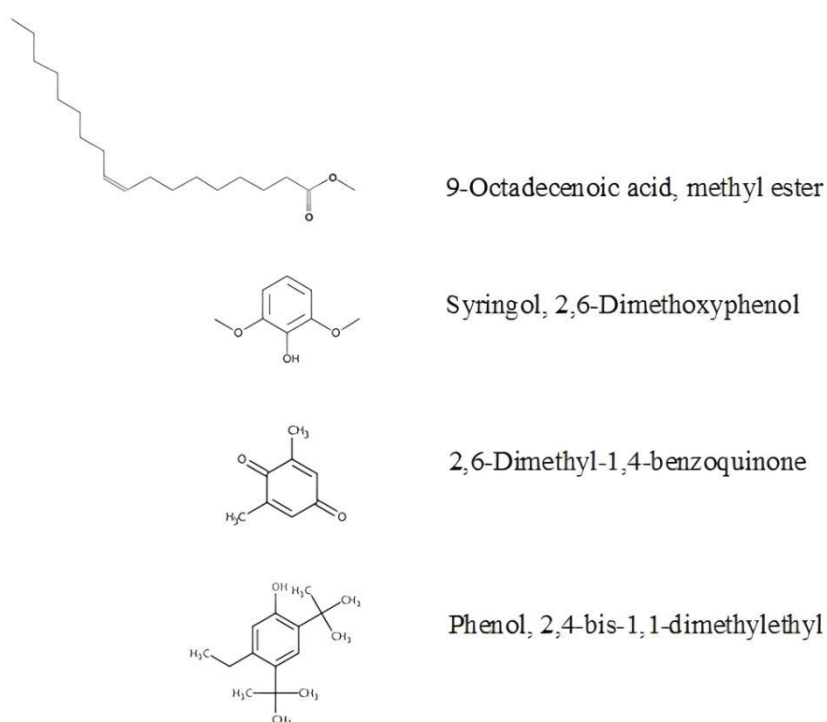
Fonte: Elaborado pela Autora (2022)

Dentre as principais moléculas do óleo essencial de Neem, quatro se destacaram (Figura 4), que estão relacionadas à atividade antifúngica. Dentre as moléculas orgânicas observadas em GC-MS, a principal importância é para o Éster Metílico do Ácido 9-Octadecenóico, sendo o composto majoritário no óleo essencial de Neem. O éster metílico do ácido 9-octadecenóico já é descrito como um agente eficiente contra bactérias por REIS *et al.*, (2019). No entanto, o mecanismo de ação do Éster metílico do ácido 9-Octadecenóico não foi completamente elucidado, não sendo possível associar com a inibição de *P. citricarpa* ou rompimento da membrana citoplasmática. Através da análise GC-MS, também foi possível identificar algumas moléculas fenólicas no óleo essencial de neem, sendo elas o Siringol, 2,6-Dimetoxifenol e o Fenol, 2,4-bis-1,1-dimetiletil, que estão presentes em grandes

quantidades.

Substâncias com fenol como princípio ativo são amplamente conhecidas como biocidas (OULAHAL & DEGRAEVE, 2022; LOBIUC *et al.*, 2023). O siringol, 2,6-dimetoxifenol e o fenol, 2,4-bis-1,1-dimetiletilo já foram relacionados como agentes antimicrobianos, especialmente contra fungos (ARAÚJO *et al.*, 2018; MATTOS *et al.*, 2019). Mesmo sendo o Éster metílico do ácido 9-octadecenoico o principal composto químico encontrado no óleo essencial de neem, provavelmente o principal agente responsável por atingir a membrana celular de *P. citricarpa* seja o Fenol, 2,4-bis-1,1-dimetiletilo e Siringol, 2,6-dimetoxifenol. Ambas as moléculas fenólicas aumentam a permeabilidade da membrana seguida de rompimento do citoplasma e, conseqüentemente, levam à morte das células (LAN *et al.*, 2022).

Figura 10 - Fórmula estrutural dos quatro principais compostos encontrados no OE de Neem.



Fonte: Elaborado pela Autora (2022)

Devido a dificuldade de separação e obtenção de quantidades suficientes para conduzir bioensaios, estudos na literatura sobre a atividade dos componentes

no Neem são escassos (GOVINDACHARI *et al.*, 1995; 1998). Contudo não se descarta a importância da utilização de seus compostos individuais no controle de patógenos, principalmente para *P. citricarpa*, visto que sua ação pode vir a ser semelhante, inferior ou superior ao do óleo (COMBRINCK *et al.*, 2011), além de poder vir a ser compatível com outras formas de manejo, não apresentar ação fitotóxica e ser praticamente atóxica ao homem, como foi visto para o composto Azadiractina pelo NEVES *et al.*, 2003.

Apesar de não ter sido o foco desta pesquisa, experimentos envolvendo a análise dos mecanismos de ação dos quatro compostos verificados aqui são de suma importância visto a possibilidade de diferenças significativas da eficácia de controle entre o composto individual e o óleo, como verificado pelas BEVILACQUA; SUFFREDINI; BERNARDI, 2008 em seus experimentos envolvendo os efeitos tóxicos entre azadiractina e o óleo puro de Neem s. em *Artemia sp*, o qual verificou-se que o composto apresentava ser o mais tóxico.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de Neem apresenta como mecanismo de ação o aumento da permeabilidade da membrana seguida de rompimento do citoplasma, provavelmente decorrentes pela ação dos compostos Fenol, 2,4-bis-1,1-dimetiletilo e Siringol, 2,6-dimetoxifenol. Conclui-se que para análise da Atividade Fungicida do Óleo Essencial de Neem contra *Phyllosticta citricarpa*, apesar de testados, nenhuma das concentrações testadas inibiram totalmente o crescimento micelial da Mancha Preta dos Citros. Além disso, o OE de Neem mesmo em baixas concentrações, apresentou toxicidade na fase inicial germinativa nesse estudo.

Os resultados obtidos na Análise da Atividade Fungicida destacam a possível aplicação do Óleo Essencial de Neem na substituição de compostos baseados em Cobre Metálico Fixo, como o Oxidocloreto de Cobre amplamente utilizada no controle da Mancha Preta dos Citros, sendo este uma substância altamente tóxica para variados organismos não alvos como também para o meio ambiente por possuir tempo de durabilidade alta (DU-PLESSIS *et al.*, 2005); (HELLING, REINECKE, REINECKE, 2000); (LIMAN, *et al.*, 2021); (SNYMAN, REINECKE, REINECKE, 2005); (EL-HAK & MOBARAK, 2019); (CAPINERA & DICKENS, 2016); (YU *et al.*, 2022). Porém é necessário mencionar a necessidade de testes para avaliação do controle in vivo da mancha preta na cultura do citrus utilizando o óleo essencial de Neem, visto que óleos essenciais que exibem efeitos antimicrobianos in vitro nem sempre são eficazes quando aplicados in vivo em frutas e vegetais (COMBRINCK, 2011; DU PLOOY, 2009).

Apesar dos testes de fitotoxicidade através de sementes de *Cucumis sativus* demonstrarem alto grau de toxicidade do óleo essencial de Neem nos tratamentos utilizados, para se afirmar que se trata de produto perigoso ao ambiente, bioensaios toxicológicos com outros organismos devem ser realizados. Da mesma forma que estudos envolvendo outras metodologias de controle de forma conjunta também podem ser sugeridos, visando estabelecer resultados mais satisfatórios ao mesmo tempo que diminui os riscos ambientais para compostos de extratos de derivados de plantas.

REFERÊNCIAS

- BARBIERI, Hellen Bertoletti et al. An overview of the most threatening diseases that affect worldwide citriculture: Main features, diagnose, and current control strategies. **Frontiers in Natural Products**, v. 2, p. 1045364, 2023.
- BASWA, Manjula et al. Antibacterial activity of Karanj (*Pongamia pinnata*) and Neem (*Azadirachta indica*) seed oil: a preliminary report. **Microbios**, v. 105, n. 412, p. 183-189, 2001.
- BAYRAM, S. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of copper oxychloride in cultured human lymphocytes using cytogenetic and molecular tests. **Cytotechnology**, v. 68, p. 2027-2036, 2016.
- BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Neem *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae) toxicity in *Artemia* sp: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2008.
- BRENTU, F. C. et al. Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 657-670, 2012.
- CAPINERA, J. L.; DICKENS, C. Some effects of copper-based fungicides on plant-feeding terrestrial molluscs: a role for repellents in mollusc management. **Crop Protection**, v. 83, p.76-82, 2016.
- CARDOSO-FILHO, J. A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). 2003. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**.
- CARSTENS, E. et al. A global perspective on the population structure and reproductive system of *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 758-768, 2017.
- COMBRINCK, Sandra; REGNIER, T.; KAMATOU, Guy PP. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2011.
- CORREA, Alex da Silva. Avaliação da microbióta endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*. 2008.
- DAS NEVES, Belmiro Pereira; DE OLIVEIRA, Itamar Pereira; NOGUEIRA, J. C. M. Cultivo e utilização do nim indiano. 2003.
- DAS, Somenath et al. Assessment of chemically characterised *Myristica fragrans* essential oil against fungi contaminating stored scented rice and its mode of action as novel aflatoxin inhibitor. **Natural product research**, v. 34, n. 11, p. 1611-1615, 2020.
- DE CASTRO E SILVA, Priscila et al. Production and efficacy of neem nanoemulsion in the control of *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in soybean seeds. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1105-1116, 2019.

DE SOUZA ARAÚJO, E. et al. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 85-96, 2018.

REIS, Caroline Medeiros et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. **Journal of biotechnology**, v. 294, p. 30-37, 2019.

DU-PLESSIS, KR et al. Response of the microbial community to copper oxychloride in acidic sandy loam soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 901- 909, 2005.

EL-HAK, H. N. G; MOBARAK, Y. M. The neurotoxic impact of subchronic exposure of male rats to copper oxychloride. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 52, p.186-191, 2019.

ELIE, Nicolas; SANTERRE, Cyrille; TOUBOUL, David. Generation of a molecular network from electron ionization mass spectrometry data by combining MZmine2 and MetGem software. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 18, p. 11489-11492, 2019.

EL-KHETABI, A. et al. Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.120, p.402-417, 2022.

EUROPEAN COMMISSION. Regulamento de implementação. **Official Journal of the European Union**, v. 317, p. 16-20, 2018. Disponível em:<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1981/oj>. Acesso em 28/12/2022

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2021.Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. Rome. Disponível em:<<https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>> Acesso em 02/12/2022

FRAC Code List 2022. Fungal Control Agents Sorted by Cross Resistance Pattern and Mode of Action. **Fungicide Resistance Action Committee**, p.1-17. 2022.

GARCIA, R. A. et al. Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v. 19, n. 2, p. 305-320, 1998.

GOTTWALD, T. R. et al. Probabilistic risk-based model for the assessment of *Phyllosticta citricarpa*-infected citrus fruit and illicit plant material as pathways for pathogen introduction and establishment. **Crop Protection**, v. 142, p. 1-14, 2021.

GOVINDACHARI, T. R. et al. Structure-related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 1585-1600, 1995.

GOVINDACHARI, T. R. et al. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 2, p. 109-116, 1998.

GUEDES, Elon Melo et al. Atividade antimicrobiana da planta *Azadirachta indica* (nim indiano)—uma revisão integrativa. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022.

GUIMARÃES, Christiano Grégio. Manejo da mancha preta dos citros através da utilização de agentes de controle biológico. 2012.

GUO, Yuxi et al. Advances in the role and mechanisms of essential oils and plant extracts as natural preservatives to extend the postharvest shelf life of edible mushrooms. **Foods**, v. 12, n. 4, p. 801, 2023.

HELLING, B.; REINECKE, SA; REINECKE, AJ. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 46, n. 1, p. 108-116. 2000.

HERBERT, J. A.; GRECH, N. M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to Benomyl in South Africa. **Plant Disease**, v. 69, n. 11, 1985.

HUANG, Kuan-Ming; GUAN, Zhengfei; HAMMAMI, AbdelMalek. The US fresh fruit and vegetable industry: An overview of production and trade. **Agriculture**, v. 12, n. 10, p. 1719, 2022.

JESUS JÚNIOR, W. C. et al. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as principais doenças de citros no estado de São Paulo. **Mudanças Climáticas: Impactos sobre Doenças de Plantas no Brasil. Brasília, Brazil: Embrapa**, p. 235-56, 2008.

KATSOULAS, N. et al. Current use of copper, mineral oils and sulphur for plant protection in organic horticultural crops across 10 European countries. **Organic Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 159-171, 2020.

KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v. 5, n. 2, 2010.

KOLTZE, J. M. et al. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945-950, 1981.

LAN, Weiqing et al. Chitosan-grafted-phenolic acid copolymers against *Shewanella putrefaciens* by disrupting the permeability of cell membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 73, 2022.

LIMA, Ricardo Rodrigues de. **Nim (*Azadirachta indica*): uma revisão bibliográfica sobre a fitoquímica e seu uso como inseticida natural**. 2022.

LIMAN, R et al. Cytotoxic and genotoxic evaluation of copper oxychloride through *Allium* test and molecular docking studies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 33, p. 1-11. 2021.

LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Comprehensive reviews in Food Science and Food safety**, v.11, n. 6, p. 530-545, 2012.

LOBIUC, Andrei et al. Future antimicrobials: Natural and functionalized phenolics. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1114, 2023.

LOMBARDO, P. et al. Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 121, p.1-8. 2016.

LOPES, Jan Marcel S. et al. Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 20, n. 1, 2011.

MALERBO-SOUZA, Darcler Teresinha; NOGUEIRA-COUTO, Regina Helena; COUTO, Leomam Almeida. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 237-242, 2003.

MARTÍNEZ-MINAYA, J. et al. Climatic distribution of citrus black spot caused by *Phyllosticta citricarpa*. A historical analysis of disease spread in South Africa. **European journal of plant pathology**, v. 143, p. 69-83, 2015.

MATTOS, Liliana Patrícia Vital de. Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole. 2010.

MATTOS, C. et al. Biocidal applications trends of bio-oils from pyrolysis: Characterization of several conditions and biomass, a review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 139, p. 1-12, 2019.

MINDUBAEV, A. Z. et al. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 56, p. 194-201, 2020.

NARAGNAN, C.R.; SING, R.P.; SAWAINAP, D.D. Phagodeterency of various fractions of neem oil against *Schistocerca gregaria* Forsk. **Indian Journal of Entomology**, v.42, n.3, p.469-472, 1980.

NEVES, Edinelson José Maciel; CARPANEZZI, Antonio Aparecido. **Prospecção sobre o cultivo do nim (*Azadirachta indica*) no Brasil**. 2009

NI, Yan et al. ADAP-GC 3.0: improved peak detection and deconvolution of co-eluting metabolites from GC/TOF-MS data for metabolomics studies. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 17, p. 8802-8811, 2016.

OULAHAL, Nadia; DEGRAEVE, Pascal. Phenolic-rich plant extracts with antimicrobial activity: an alternative to food preservatives and biocides?. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 753518, 2022.

PEREIRA, J. C. R. et al. Compostos orgânicos no controle de doenças de plantas. 1996

SANTOS FILHO, H. P.; MAGALHÃES, A. F. de J.; COELHO, Y. da S. Citros: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**, n.1, p.122-125. 2005.

SARADHAJYOTHI, Koona et al. Antibacterial potential of the extracts of the leaves of *Azadirachta indica* Linn. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 3, n. 1, p. 65-69, 2011.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (SAA). Sistema de Mitigação de Risco (SMR) para Pinta Preta do Citros. Defesa Agropecuária do

Estado de São Paulo.2022. Disponível em:<<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/informativo/defesa-agrosp-no-013-agosto2022/sistema-de-mitigacao-de-risco-smr/>>. Acesso em 28/12/2022.

SILVA-JUNIOR, G.J. et al. Pinta preta dos citros: a doença e seu manejo. **Fundecitros**, p.208. 2016

SNYMAN, RG; REINECKE, AJ; REINECKE, SA. A. Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 1, p. 47-52. 2005.

SOBRERO, M. C. & RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología**, p. 55-67,2008.

SPOSITO, M. B. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. 2003. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**.

TAKESHITA, Vanessa et al. Efeito inibitório de extratos vegetais da família Alliioideae sobre *Guignardia citricarpa*-Agente causal da mancha preta em citrus. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.

TAMM, L. et al. Use of copper-based fungicides in organic agriculture in twelve European countries. **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 673, 2022.

TRAN, N. T. et al. Pathogenicity of *Phyllosticta citricarpa* Ascospores on Citrus spp. **Plant disease**, v. 102, n. 7, p. 1386-1393, 2018.

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

VAN-ZWIETEN, L.; MERRINGTON, G.; VAN-ZWIETEN, M. Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application. **SuperSoil**, v. 2004, p. 3rd, 2004.

YANG, Shun-Kai et al. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 819, 2020.

YU, S. et al. Copper-based fungicide copper hydroxide accelerates the evolution of antibiotic resistance via gene mutations in *Escherichia coli*. **Science of The Total Environment**, v. 815, p. 152885, 2022.