

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE AGRONOMIA

DOUGLAS DE ROCCO

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE EXTRATOS DE *Cordia verbenacea*
SOBRE *Botrytis cinerea***

São Miguel do Oeste – SC (2025)

Douglas de Rocco

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE EXTRATOS DE *Cordia verbenacea*
SOBRE *Botrytis cinerea***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Agronomia do Campus São Miguel do Oeste do Instituto Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de **Engenheiro Agrônomo**.

Orientadora:

Profa. Dra. Francieli Lima Cardoso

Coorientadora:

Profa. Dra. Aquidauana Miqueloto Zanardi

São Miguel do Oeste - SC, 2025.

Douglas De Rocco

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE EXTRATOS DE *Cordia verbenacea*
SOBRE *Botrytis cinerea***

Este trabalho foi aprovado pela Banca examinadora composta por (Francieli Lima Cardoso, Luciana Senter e Odimar Zanuzo Zanardi) na data (30/06/2025), cujas notas e assinaturas constam em Ata de Defesa. Por fim, as considerações propostas pela Banca foram incorporadas no trabalho, estando este apto para arquivamento.



Profa. Dra. Francieli Lima Cardoso

Instituto Federal Santa Catarina - Câmpus São Miguel do Oeste

RESUMO

O fungo *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento, é um dos mais conhecidos fitopatógenos no mundo devido aos danos que causa em frutas e hortaliças, principalmente na pós-colheita. Para reduzir os danos desse patógeno vem-se utilizando produtos alternativos à base de óleos essenciais e extratos botânicos. A *Varronia curassavica* (*Cordia verbenacea*) é uma planta nativa do Brasil e encontrada na Floresta Tropical Atlântica que tem sido tradicionalmente usada na medicina popular para o tratamento de enfermidades devido às suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar a atividade fungistática de extratos de *C. verbenacea* no crescimento e desenvolvimento de *B. cinerea*. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Santa Catarina – Câmpus São Miguel do Oeste. O fungo *B. cinerea* foi isolado a partir de receptáculos de morangueiro (popularmente conhecidos como frutos) contaminados com o patógeno. Após o isolamento em placas de Petri com meio de cultura à base de batata-dextrose-ágar (BDA) e armazenados em BOD sob temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 12 horas, para o crescimento micelial até cobrirem toda a placa e, posteriormente, serem utilizados nos tratamentos. Os tratamentos consistiram em seis formas de obtenção do extrato de *C. verbenacea*: T1 - Extrato vegetal aquoso quente – Infusão; T2) Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado; T3) Extrato vegetal aquoso quente – Mistura; T4) Extrato vegetal aquoso frio; T5) Extrato hidroalcoólico 30; T6) Extrato hidroalcoólico 105, além de um tratamento controle (somente meio de cultura BDA). Foram analisados a percentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), a taxa de crescimento micelial (TCM) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *B. cinerea* sob os diferentes métodos de extração dos compostos de *C. verbenacea*. Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os extratos vegetais testados, para todas as variáveis analisadas. A obtenção do extrato por infusão (T1) reduziu significativamente o índice velocidade de crescimento micelial do fungo, tendo um IVCM de 0,07 cm dia⁻¹, enquanto o tratamento controle obteve IVCM de 0,71 cm dia⁻¹. Com relação a Percentagem de Inibição do crescimento micelial (PICM), a infusão (T1) se destacou novamente com uma inibição de 70,4% do fungo *B. cinerea*. Já os extratos aquosos quentes T2 e T3 apresentaram uma PICM de 68,8% e 54,6%, respectivamente. Com a utilização do extrato aquoso frio a PICM foi de 45,5%. As menores inibições foram obtidas com os extratos hidroalcoólicos, com inibição variando de 36,6% a 40,3%. As maiores supressões na taxa de crescimento micelial (TCM) de *B. cinerea* foram observados nos tratamentos usando extratos aquosos quentes. O extrato obtido pela técnica de

infusão por 30 minutos foi que apresentou a maior efetividade de supressão do crescimento micelial do fungo. Os tratamentos com a utilização do extrato aquoso frio e alcoólico demonstraram baixo efeito fungistático.

Palavras-chaves: Erva baleeira. Mofo cinzento. Inibição micelial. Esporogênese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Extratos vegetais	8
3.2. Origem, botânica e usos de <i>Cordia verbenacea</i>	9
3.3. <i>Botrytis cinerea</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Isolamento e cultivo de <i>Botrytis cinerea</i>	15
4.2. Obtenção e preparo do material vegetal para a obtenção dos extratos de <i>Cordia verbenacea</i>	17
4.3. Obtenção dos extratos vegetais de <i>Cordia verbenacea</i>	17
4.3.1. Preparação dos extratos vegetais aquosos quentes	18
4.3.2. Preparação do extrato vegetal aquoso frio	19
4.3.3. Preparação dos extratos hidroalcoólicos.....	19
4.4. Avaliação da supressão do crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i>	19
4.5. Delineamento experimental e análise de dados.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

O controle químico continua sendo a principal medida para reduzir a incidência de doenças em cultivos hortícolas. Além disso, os produtos químicos antimicrobianos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, hidrocarbonetos aromáticos e inibidores da biossíntese de esteróis são frequentemente usados como tratamentos pós-colheita, o que ocasiona um problema contra o uso efetivo desses produtos químicos, como a seleção de cepas de fungos resistentes aos fungicidas (Alves *et al.*, 2014).

A aplicação de maiores concentrações de produtos químicos na tentativa de contornar esse problema aumenta o risco de resíduos tóxicos nos produtos, o que é relativamente grave porque frutas e hortaliças são consumidas em um tempo relativamente curto após a colheita (Olher *et al.*, 2021). A exploração de substâncias naturais como os óleos essenciais e extratos vegetais para o controle de doenças pós-colheita, apresenta-se como alternativa mais seguras para os consumidores e para o meio ambiente, além da sua efetividade contra tipos selvagens e cepas resistentes aos pesticidas (Alves *et al.*, 2014).

Vismara (2019), afirma que a demanda pela redução no uso de agrotóxicos na agricultura aumenta o interesse pela possibilidade de aplicação de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de fitopatógenos, visto a eficácia dos óleos essenciais contra patógenos graves de plantas. Conforme Alves *et al.* (2014), a doença do mofo cinzento causada por *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel (Helotiales: Sclerotiniaceae) é uma das doenças mais graves de uma ampla gama de culturas de importância mundial. As perdas pós-colheita devido ao desenvolvimento de mofo cinzento durante o armazenamento e distribuição de frutas e vegetais colhidos são muito altas. Esse patógeno é disseminado por esporos presentes nas folhas e frutos de plantas infectadas, além de sobreviver no solo ou em restos culturais na forma de estruturas de resistência denominadas escleródios. Assim, este estudo tem como propósito investigar a ação de extratos vegetais da erva baleeira (*Cordia verbenacea*) sobre o crescimento e o desenvolvimento de *B. cinerea*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade fungistática de extratos da *C. verbenacea* na supressão do crescimento e desenvolvimento de *B. cinerea*.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a atividade de extrato de *C. verbenacea* no crescimento e desenvolvimento de *B. cinerea*.
- Avaliar o efeito fungistático de extratos aquosos e hidroalcoólico de *C. verbenacea* sobre *B. cinerea*.
- Identificar o extrato que apresenta maior efetividade na supressão do crescimento e desenvolvimento de *B. cinerea*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Extratos vegetais

Extratos vegetais são substâncias obtidas de plantas que apresentam propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, entre outras. Esses extratos são obtidos por técnicas de extração que visam concentrar e isolar os princípios ativos presentes nas plantas (Revista Food Ingredients Brasil, 2010). A utilização de plantas medicinais para o preparo de extratos é complexa, uma vez que, as condições nas quais as plantas são cultivadas, comercializadas e armazenadas comprometem e alteram a quantidade e a qualidade dos compostos (Ming, 1994). Os princípios ativos das plantas apresentam alterações conforme o estágio de desenvolvimento, habitat, horário de colheita e método de extração. Além disso, de acordo com a forma que foram preparados, com material seco ou fresco e nas concentrações utilizadas influenciam na eficiência dos resultados.

Na medicina natural, é cada vez mais comum a utilização de plantas medicinais no controle de doenças, que pode ser administrada na forma de extratos, na qual exige uma complexa preparação farmacêutica (Capasso *et al.*, 2003). Na agricultura, com o intuito de buscar alternativas ao emprego de produtos químicos e de métodos menos agressivos/poluidores vem-se estudado a eficiência de extratos e óleos essenciais para o controle de doenças (Montes *et al.*, 2000).

Segundo Schwan *et al.* (2000), produtos à base de compostos botânicos são importantes alternativas para o controle de doenças em plantas, pois podem auxiliar na redução do processo de seleção de populações de fitopatógenos resistentes aos agroquímicos sintéticos presentes no mercado. O controle de doenças em plantas tem sido realizado com aplicações de produtos químicos sintéticos (Kimati *et al.*, 1997). Porém, com o processo de seleção de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas, há necessidade de buscar novas ferramentas efetivas para o manejo de doenças nas culturas (Zadoks, *et al.*, 1997)

Montes *et al.* (2000) enfatizaram a importância do uso de extratos brutos no controle de fitopatógenos, demonstrando que alguns extratos possuem propriedades antimicrobianas comprovadas, que afetam o desenvolvimento de fungos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ark e Thompson (1959), realizaram os primeiros experimentos com a utilização de extratos de plantas para moderar e/ou controlar patógenos de frutos em pós-colheita. Esses mesmos autores também observaram a ação do extrato de alho (*Allium sativum* L.) na inibição do fungo *Monilinia fructicola* em pêssegos. Souza *et al.* (2007) relataram que extratos de *A. sativum* e

Cymbopogon citratus obtidos por meio da técnica de maceração com etanol absoluto, inibiram a germinação do fungo *Fusarium proliferatum*. Bianchi *et al.* (1997) reportaram que o extrato aquoso de alho produzido a partir do pó, proporcionou o aumento de vacúolos e engrossamento da parede celular de *Rhizoctonia solani*, modificações na membrana citoplasmática de *Pythium ultimum* e diminuição no diâmetro das hifas de *Fusarium solani*.

Na mesma linha de pesquisa, Brand *et al.* (2010) verificaram que o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* foi afetado após o uso de extratos de alecrim autoclavado. Resultados semelhantes foram obtidos por Rozwalka *et al.* (2008), ao utilizar extrato aquoso de alecrim autoclavado na inibição do crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Esses produtos alternativos quando aplicados em plantas ou frutos na pós-colheita são denominados eliciadores, pois podem induzir a resistência contra determinados patógenos. Esses produtos também estimulam a ativação de mecanismos de defesa das plantas que estavam latentes. Desta forma, as plantas após a exposição ao agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados, não somente no local da infecção, mas também distante deste, conferindo assim a resistência sistêmica adquirida (Pascholati, 1995).

São inúmeras as formas de conseguir extrair os compostos secundários de plantas. Dentre as mais utilizadas incluem a extração aquosa, com água quente ou fria, hidroalcoólica, etanólica e destilação. Nas extrações aquosas, a água é utilizada como solvente para a extração, no entanto, algumas substâncias são insolúveis em água, como alcaloides, óleos essenciais, óleos perfumados e resina, sendo estes mais solúveis em álcool. Dentre os compostos que são facilmente liberados em água estão os glicosídeos, sais alcaloides, substâncias amargas, taninos e açúcares. Isso pode ser uma das razões pelas quais os extratos aquosos são menos eficazes no controle de microrganismos quando comparados aos extratos alcoólicos (Andreo; Jorge, 2006; Fonsêca, 2005).

3.2. Origem, botânica e usos de *Cordia verbenacea*

Conhecida popularmente como erva baleeira, salicina, cariaquito negro e sálvia negra, a *C. verbenacea* é um arbusto de origem brasileira (Gasparino; Barros, 2009), pertencente à família Boraginaceae. Essa família é dividida em quatro subfamílias: Ehretioideae, Cordioideae, Helitropioideae e Boraginaceae (Nowicke; Miller, 1990; Miller, 2003). A família Boraginaceae possui aproximadamente 350 espécies (Judd *et al.*, 1999; Miller, 2001) e aproximadamente 65 espécies distribuídas no território brasileiro (Taroda; Gibbs, 1986).

A planta de erva baleeira caracteriza-se por ser um arbusto ereto, perene, bastante ramificado, aromático, composto por pontas de ramos e hastes pendentes e recoberta por uma bainha fibrosa, com altura variando de 1,5 a 2,5 m. As folhas (FIGURA 1A) são simples, alternas, coriáceas, perfumadas, com cerca de 10 cm de comprimento, com cheiro forte e duradouro. As inflorescências aparecem nas pontas dos galhos, constituídas de pequenas flores brancas (FIGURA 1B). Os frutos são do tipo cariopse esférica, vermelho quando maduro, com cerca de 0,4 cm de diâmetro (Lorenzi; Matos, 2002; Ramos *et al.*, 2005).



FIGURA 1. Inflorescências (A) e folhas (B) de *Cordia verbenacea*. Fonte: Gomes *et al.* (2009).

A erva baleeira trata-se de uma planta de grande importância na indústria medicinal e farmacêutica e encontra-se distribuída em todo o território brasileiro (Bayeux *et al.*, 2002). Essa planta é muito utilizada na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes, sendo empregada no tratamento de artrite, reumatismo, tendinite, dores musculares e contusões (Kloesch *et al.*, 2013). O uso dessa espécie iniciou-se com os indígenas, os quais extraíam o extrato bruto das partes aéreas e utilizavam como anti-inflamatório. Em 1952, Pio Corrêa denominou essa espécie como *Cordia* devido ao seu uso medicinal. A partir dessa descoberta, iniciou-se o estudo e a produção industrial de medicamentos a partir da extração dos compostos vegetais da erva baleeira, como o medicamento Acheflan do Laboratório Aché (Nizio *et al.*, 2015). Estudos revelam a grande capacidade anti-inflamatória da erva baleeira, possuindo uma excelente eficácia com efeitos colaterais reduzidos (Carvalho *et al.*, 2004, Sertié *et al.* 2005). Outros estudos indicam que são vários os compostos na parte aérea da planta, destacando-se os taninos, flavonoides e os óleos essenciais (Fernandes *et al.*, 2007).

Em 2009, Caetano *et al.*, (2020), descrevem que a *C. verbenacea* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), a qual conta com uma lista de 71 espécies vegetais. O RENISUS está ligado ao Ministério da Saúde do Brasil e os seus estudos servem para definir espécies utilizadas na prestação de serviços de

saúde municipais e estaduais. As pesquisas realizadas pela RENISUS são de cunho farmacológico e químico para o desenvolvimento e produção de produtos medicinais para o Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, a *C. verbenacea* foi incluída no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira como item medicinal anti-inflamatório com composição de folhas secas, água e extrato hidroetanólico (Caetano *et al.*, 2020).

Além disso, várias são as propriedades biológicas contra microrganismos, incluindo a inibição da germinação de conídios de *Pseudocercospora griseola* (Hoyos *et al.*, 2012), inibição de bactérias gram positivas (Carvalho Jr. *et al.*, 2004; Meccia *et al.*, 2009), *Candida albicans* (Carvalho Jr. *et al.*, 2004) e toxicidade sobre hifas e conídios de *Oidium eucalypti* (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014), além de atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Feijó *et al.*, 2006).

O óleo essencial de *C. verbenacea* é composto principalmente por mono e sesquiterpenos. Os compostos mais comumente detectados e descobertos que envolvem óleos essenciais são α -pineno (11,72 - 29,70%), E-cariofileno (9,99 - 25,30%), biciclogermacreno (2,70 - 13,80%) e aloaromadendreno (10%) (Carvalho Jr. *et al.*, 2004).

3.3. *Botrytis cinerea*

O gênero *Botrytis* pertence à família Sclerotiniaceae, que compreende espécies fúngicas com presença mundial, causando grandes prejuízos nas culturas agrícolas. Em particular, o gênero *Botrytis* contém aproximadamente 30 espécies reconhecidas com diversos estilos de vida tróficos e é considerado entre os 10 patógenos fúngicos mais importantes na agricultura (Vismara, 2019).

Em termos econômicos, Ampese e Almança (2021) reportaram que as perdas em lavouras causadas por *B. cinerea* podem ser difíceis de estimar devido a sua ampla variedade de plantas hospedeiras. No entanto, podem ser estimados em milhões de dólares anualmente, dependendo do setor agrícola. Estima-se que as perdas podem chegar a 1 bilhão de dólares por ano se forem incluídos aspectos como medidas culturais de controle de pragas, fungicidas de amplo espectro e biocontrole (Ampese; Almança, 2021). Da mesma forma, as infecções causadas pelo patógeno podem variar, mas estima-se que as perdas na pré e na pós-colheita prejuízos variam de 10 a 70%.

Uma das condições favoráveis que serve de porta de entrada para o mofo cinzento, é sua ocorrência em lesões causadas por diferentes agentes, como injúrias causadas por ferramentas utilizadas no manejo de plantas, intempéries e insetos (Peynaud *et al.*, 1971). Um experimento verificou a incidência significativa de *B. cinerea* em bagas de videira com ferimentos causados

por mosca-das-frutas e ferimentos artificiais. Machota Jr *et al.* (2016), observou que o controle (sem ferimentos) apresentou menor incidência de *B. cinerea* quando comparada com as bagas lesionadas.

Além disso, *B. cinerea* possui umidade e temperatura ótima para seu crescimento e infecção, particularmente em condições de casa de vegetação. No entanto, mesmo quando o pré-tratamento com fungicidas é realizado, a resistência em certas cepas pode continuar causando alguns desafios para os produtores (Vismara, 2019).

De modo geral, *B. cinerea* tem sido de difícil controle porque possui diversas formas de infecção, hospedeiros como fontes de inóculo e pode sobreviver como micélios e/ou conídios em restos culturais por longos períodos como escleródios no solo. Por essas razões, é improvável que o uso de qualquer medida de controle seja bem-sucedida e, uma compreensão mais detalhada da interação hospedeiro-patógeno, do microambiente em que o fungo opera e seus concorrentes microbianos no hospedeiro é essencial. O custo atual de trazer um novo fungicida ou agente de controle biológico para o mercado é tão alto que apenas as principais culturas atraem o interesse suficiente do agronegócio (Vismara, 2019).

O fitopatógeno *B. cinerea* também tem sido responsável por uma ampla gama de sintomas e estes não podem ser facilmente generalizados em órgãos e tecidos vegetais. O apodrecimento, acompanhado do colapso e encharcamento dos tecidos do parênquima, seguida por um rápido aparecimento de massas cinzentas de conídios são talvez os sintomas mais comuns observados em folhas e frutos moles (Vismara, 2019). De acordo com este autor, frutas de casca grossa, como kiwis, o sintoma de encharcamento de água escura é evidente somente após o corte. Em muitas frutas e vegetais, a infecção geralmente começa em flores senescentes anexadas, que evolui para o apodrecimento e disseminação para outras estruturas adjacentes. Esses sintomas são observados em abobrinhas, pepinos, vagens, morangos e maçãs.

Nas pétalas de flores, os sintomas variam de pequenas manchas em grande escala dependendo das condições ambientais. No tomate cultivado em estufa, o maior dano ocorre nas hastes com ferimento por ferramentas utilizadas no manejo das plantas, onde o fungo pode apodrecer toda a haste. O apodrecimento dos tomates maduros ocorre principalmente na pós colheita; um sintoma incomum de 'mancha fantasma' em tomate verde está associado a uma defesa bem-sucedida do hospedeiro, mas o sintoma torna os frutos não comercializáveis (Ampese; Almança, 2021).

Conforme Olher *et al.*, (2021), a infecção por *B. cinerea* pode ocorrer por várias vias, que variam de acordo com a espécie da planta, tipo de tecido e condições externas. O desenvolvimento da doença ocorre em multicamadas e é regulado por múltiplos fatores, com

contribuições sutis de cada fator de virulência. A secreção maciça de enzimas que degradam a parede celular da planta e toxinas não seletivas (Olher *et al.*, 2021). O quadro emergente é de um processo de infecção multicamadas governadas pela troca de fatores que contribuem coletivamente para o desenvolvimento da doença (Vismara, 2019).

O gênero *Botrytis* é um dos táxons fúngicos mais antigos e bem estudados. De acordo com análises taxonômicas, existem mais de 35 espécies de *Botrytis*, das quais *B. cinerea* é a mais conhecida e bem estudada (Vismara, 2019). Este patógeno é considerado um fungo hemibiotrófico, pois durante alguns curtos estágios de seu ciclo de vida, pode atuar como um fungo biotrófico e colonizar tecidos vegetais vivos e obter os nutrientes destas células (Olher *et al.*, 2021). Em contraste, também se considera o fungo como necrotrófico, uma vez que também infecta e mata tecidos vegetais e subsequentemente extrai nutrientes de células vegetais mortas. O *B. cinerea* é um patógeno generalista capaz de infectar uma ampla gama de espécies de plantas. A este respeito, *B. cinerea* se assemelha a *Sclerotinia sclerotiorum*, um patógeno agressivo que causa a doença do mofo branco em centenas de espécies de plantas (Olher *et al.*, 2021). Porém, Olher *et al.*, (2021) afirmam que o *B. cinerea* é menos agressivo que *S. sclerotiorum* e, embora possa infectar folhas e caules intactos em condições ideais, ataca com mais frequência tecidos moles, como frutas e flores.

Esse patógeno afeta várias culturas comerciais, como plantas ornamentais, hortaliças e árvores frutíferas. Causa prejuízos econômicos em diferentes espécies vegetais, incluindo alcachofras, berinjelas, abóboras, feijões, alface, pepino, pimentão, tomate, cenoura, mirtilo, morango, maçã, laranja, pera, banana, uva, wallflower, begônia, ciclâmen, cravo, crisântemo, dália, gérbera, gladiola, íris, lírio, rosa, tulipa e violetas (Drawanz *et al.*, 2020).

A infecção por *B. cinerea* é predominantemente iniciada por conídios (Figura 2) ovais de 50–75 µm que se fixam e germinam na superfície da planta (Olher *et al.*, 2021). Os tubos germinativos ou hifas mais alongadas diferenciam apressórios simples e almofadas de infecção. Ambas são estruturas especializadas que auxiliam na penetração do hospedeiro, mas o fungo também demonstra entrar no hospedeiro através dos estômatos ou penetrar diretamente na cutícula através de tubos germinativos conidiais curtos. A maioria das infecções ocorrem quando os esporos do fungo entram em contato com pétalas de flores envelhecidas. Além disso, o clima frio com forte orvalho ou nevoeiro favorece a infecção.

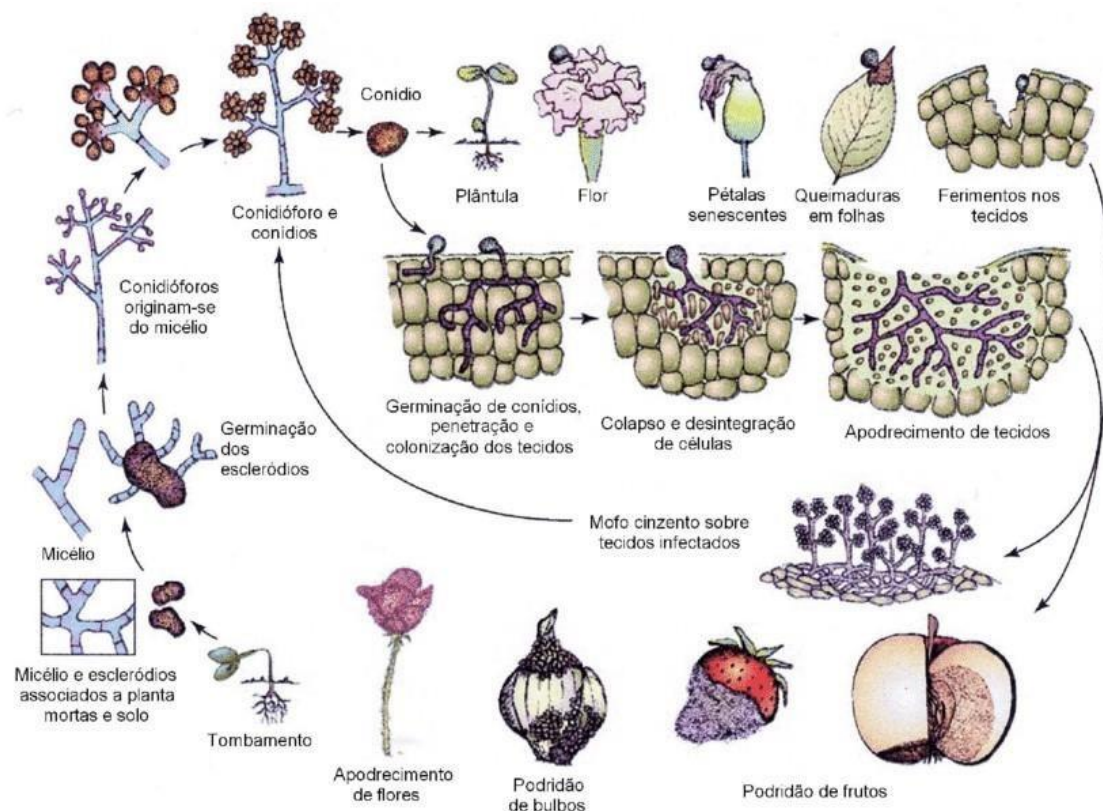


FIGURA 2 - Ciclo reprodutivo de *Botrytis* sp. em plantas hortícolas. Fonte: Adaptado de Agrios, (2005).

Conforme Vismara, (2019), a importância do *Botrytis* se estende além do campo agrícola. Este fitopatógeno é amplamente utilizado como um microrganismo modelo para a compreensão das interações planta-patógeno, evolução do fungo hemibiotrófico, da especificidade hospedeira e da flexibilidade dos estilos de vida do patógeno vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina – Câmpus São Miguel do Oeste (IFSC-SMO), localizado no município de São Miguel do Oeste, Santa Catarina. O experimento foi iniciado no ano de 2023, sendo finalizado no primeiro semestre de 2025. Foram analisados a Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PICM), a Taxa de Crescimento Micelial (TCM) e o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *B. cinerea* sob diferentes métodos de extração dos compostos do metabolismo secundário de *C. verbenacea*.

4.1. Isolamento e cultivo de *Botrytis cinerea*

Foram realizadas várias inspeções em cultivos de morangueiros com o intuito de encontrar morangos contaminados com o fungo *B. cinerea*. Porém, as condições de temperatura e umidade estavam dificultando o aparecimento do patógeno. Desta forma, os frutos foram adquiridos em um supermercado no município de São Miguel do Oeste. Os morangos aparentemente saudáveis foram isolados em copos de café de 50 mL (Figura 3A), recobertos com filme plástico e mantidos em uma BOD sob temperatura de 25 °C, umidade relativa do ar de 60% por cerca de 14 dias. Os frutos contaminados com o fungo *B. cinerea* (Figura 3B) foram colocados em placas de Petri com meio de cultura à base de batata-dextrose-ágar (BDA), contendo 200 g L⁻¹ de infusão de batatas (kasvi), 20 g L⁻¹ de dextrose (marca Vetec) e 15 g L⁻¹ de ágar (Marca Alphatec). Em seguida, foram incubados sob condições controladas em câmara tipo BOD, sob temperatura de 25 °C e 60% de umidade relativa de acordo com Garsuch e Breikreutz (2010), sem fotoperíodo. Nestas condições ocorreu o crescimento micelial do fungo e a formação de estruturas de resistência denominadas escleródios. As placas foram mantidas nestas condições até a instalação do experimento. Placas contaminadas por outras espécies de patógenos foram descartadas ao longo deste processo.

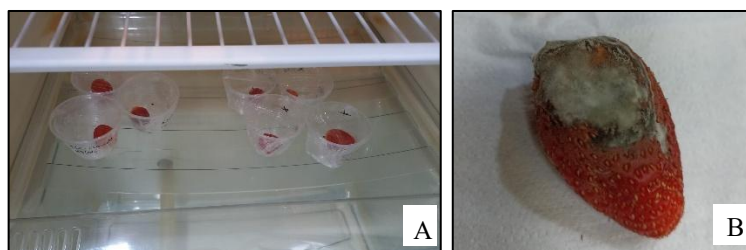


FIGURA 3 – Frutos de morango isolados em copos de café (A) e fruto de morango contaminado com o fungo *B. cinerea* (B). Fonte: Rocco, 2025.

Para o experimento, os escleródios (Figura 4A) foram colocados em placas contendo meio de cultura à base de BDA, armazenados em BOD sob temperatura de 25 °C e 60% de umidade relativa de acordo com Garsuch e Breikreutz (2010) e fotoperíodo de 12 horas, para fins de germinação, esporulação e crescimento micelial até cobrirem toda a placa (Figura 4B). Para manutenção da cultura, após a formação do micélio, foi realizada a transferência de discos de 0,5 cm (Figura 4C) com micélio para novas placas por aproximadamente 10 dias. Com o intuito de formar novas culturas de fungos foram realizadas repicagens, para posterior utilização no experimento.

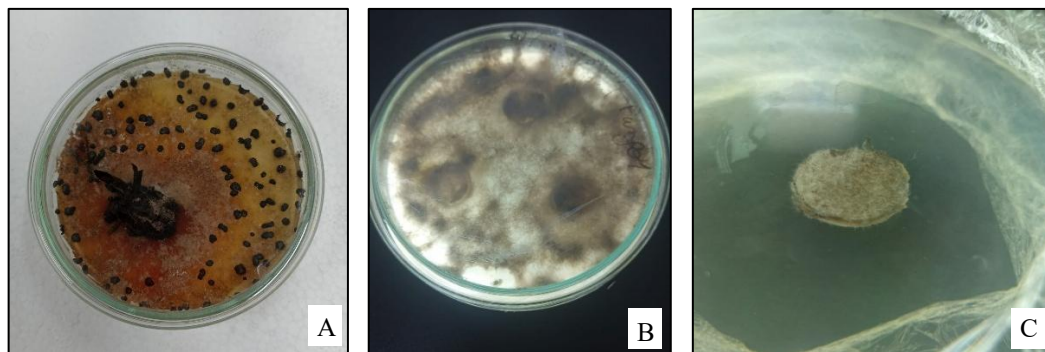


FIGURA 4 - Placa de Petri com escleródios (A), placa de Petri recoberta pelo micélio do fungo *B. cinerea* (B) e disco de 0,5 cm de *B. cinerea* (C). Fonte: Rocco, 2025.

Para a implantação do experimento, foi preparado o meio de cultura à base de BDA (Figura 5A). Em seguida, adicionou-se ao meio de cultura, 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol, para evitar o desenvolvimento de bactérias. Após isso, foram vertidos 10 mL do meio nas placas de Petri (Figura 5B).

Após a solidificação do ágar, foi acrescentado 50 µL dos extratos na placa de Petri (Figura 5C) e homogeneamente distribuídos sobre o meio de cultura com uma alça de Drigalski esterilizada, em capela de fluxo laminar (Figura 5D). Em seguida, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélios de *B. cinerea*, foram alocados sobre o meio contendo os extratos. As placas foram vedadas com filme de PVC (Parafilme[®]), identificadas e armazenadas em câmaras do tipo BOD, a 22 ± 1°C, umidade relativa do ar de 60% e fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias.



FIGURA 5 – Etapas de preparo do meio de cultura nas placas: A) Preparo do meio de cultura BDA; B) Vertendo o meio de cultura em placas de petri; C) Adição dos extratos em placas de petri; D) Distribuição do extrato de *C. verbenacea* com alça de Drigalski. Fonte: Rocco, 2025.

4.2. Obtenção e preparo do material vegetal para a obtenção dos extratos de *Cordia verbenacea*

A produção dos extratos de *C. verbenacea* (erva baleeira), foi realizada a partir das folhas maduras colhidas sempre nas primeiras horas da manhã, de plantas que não apresentavam floração, em uma propriedade localizada no bairro São Gotardo, município de São Miguel do Oeste, Santa Catarina. Trata-se de uma horta caseira, onde não ocorre a aplicação de defensivos agrícolas.

Com a finalidade de evitar a variação no teor de água inicial, a retirada das folhas não foi realizada depois de precipitações pluviométricas ou de irrigação. As folhas colhidas foram homogeneizadas para evitar qualquer tipo de interferência nos resultados, bem como eliminar àquelas que apresentam algum tipo de dano físico ou sintoma de doença aparente.

Para o preparo do material vegetal foi utilizado o método proposto por Weber (2016), onde folhas de *C. verbenacea* foram selecionadas, lavadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 15 minutos, para desinfecção. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de hipoclorito (Figura 6A). Para o preparo do extrato hidroalcoólico, folhas foram secadas em estufa de circulação de ar a 40 °C até atingirem peso constante. Após as folhas foram trituradas em moinho de faca, até a obtenção de um pó. Este material foi armazenado em sacos plásticos (Figura 6B) em um freezer para posterior utilização dos testes.



FIGURA 6 – Folhas de *Cordia verbenacea* higienizadas (A) e folhas trituradas e armazenadas em sacos plásticos (B). Fonte: Rocco, 2025.

4.3. Obtenção dos extratos vegetais de *Cordia verbenacea*

Para o preparo dos extratos foram utilizadas folhas secas para o preparo dos extratos. Foram preparados quatro extratos vegetais aquosos, sendo três utilizando água quente e um utilizando água fria. Além disso, foram preparados dois extratos vegetais hidroalcoólicos. No tratamento controle foi utilizado apenas água destilada (Tabela 2).

TABELA 2 – Discriminação dos tratamentos utilizados para avaliar a atividade fungistática dos extratos de *Cordia verbenacea* sobre *Botrytis cinerea*. Fonte: Rocco, 2025.

Tratamentos	Componentes para o preparo
T0 Controle	Somente meio de cultura BDA
T1 Extrato vegetal aquoso quente - Infusão	30g de massa seca +130 mL H ₂ O quente
T2 Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado	30g de massa seca + 130 mL H ₂ O quente
T3 Extrato vegetal aquoso quente – Mistura	30g de massa seca + 130 mL H ₂ O quente
T4 Extrato vegetal aquoso frio	30g de massa seca em 130 mL H ₂ O fria
T5 Extrato hidroalcoólico 30	30g de massa seca em 100 mL de álcool
T6 Extrato hidroalcoólico 105	105g de massa seca em 300 mL de álcool

4.3.1. Preparação dos extratos vegetais aquosos quentes

A produção dos extratos de *C. verbenacea* foi realizada a partir das folhas secas e trituradas. No extrato vegetal aquoso quente – infusão (T1) foi utilizado 30g de folhas trituradas em 100 mL de água destilada a 100 °C, mantido em repouso por 30 min. Posteriormente, foi realizada a dupla filtração em papel de filtro e armazenado em frasco âmbar estéril até o uso.

Para a produção do extrato vegetal aquoso quente – filtrado (T2) foi utilizado 30g de folhas trituradas secas e 100 mL de água destilada a 100 °C. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro e transferido para um frasco âmbar estéril.

Para a obtenção do extrato vegetal aquoso – mistura (T3) foi utilizado 130g de massa seca de *C. verbenacea* em 130 mL de água destilada a 100 °C. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito para os outros extratos, sendo filtrado em papel filtro e, quando pronto, transferido para um frasco âmbar estéril, hermeticamente fechado, até seu uso nos experimentos.

4.3.2. Preparação do extrato vegetal aquoso frio

Para o preparo do extrato vegetal aquoso frio (T4), foi utilizado o método de Baseggio (2016) utilizando 130g de material vegetal seco triturado em 130 mL de água fria. Em seguida, o extrato foi mantido em repouso por 24 horas e, posteriormente, filtrado em gaze e papel de filtro, ambos esterilizados e em membrana de seringa. Após, foi realizada a filtração em membrana Millipore (0,45µm). Porém, o extrato de erva baleeira é muito fibroso, o que acabou dificultando o processo de filtração. Desta forma, foi utilizado papel de filtro, repetindo a filtração duas vezes na capela de fluxo laminar e armazenado em frasco âmbar estéril até o uso.

4.3.3. Preparação dos extratos hidroalcoólicos

Para obtenção do extrato hidroalcoólico 30 (T5), foi adicionada 30g de folhas secas de *C. verbenacea* em 100 mL de álcool 70%. O preparado foi armazenado em frasco âmbar ao abrigo da luz por 7 dias, agitando-se a cada 8 h. Após o extrato foi diluído em água estéril até a proporção de 10% de teor alcoólico, em seguida, filtrado em membrana Millipore (0,45µm) e em papel de filtro. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do extrato hidroalcoólico 105, onde foram adicionados 105g do material seco triturado da erva baleeira em 30 mL de álcool 70%, mantendo-o em repouso por 24 horas. Após o extrato foi filtrado em membrana Millipore (0,45µm) e papel de filtro.

4.4. Avaliação da supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Para avaliar o crescimento e o desenvolvimento micelial de *B. cinerea*, os diferentes extratos filtrados foram adicionados sobre o meio de cultura BDA autoclavado e solidificado, em capela de fluxo laminar. Após a autoclavagem, um disco de micélio fúngico (*B. cinerea*) de 0,5 cm de diâmetro foi adicionado na região central das placas contendo os extratos de *C. verbenacea* (Figura 7A). Posteriormente, todas as placas foram fechadas e vedadas com filme de PVC (Parafilme®) e incubadas em uma câmara do tipo BOD sob temperatura de 25 °C, umidade relativa do ar de 60% e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias (Figura 7B). Como tratamento controle, foi utilizado placas com meio cultura BDA sem adição dos extratos vegetais.

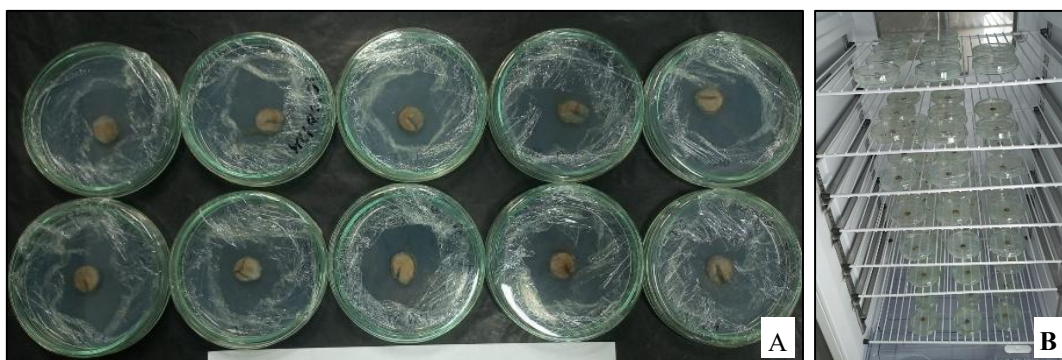


FIGURA 7 – Placas de Petri com meio de cultura e disco micelial de *B. cinerea* (A) acondicionadas em uma câmara BOD (B). Fonte: Rocco, 2025.

As avaliações foram realizadas diariamente no mesmo horário, a fim de verificar o crescimento radial do fungo (em mm). Para isso, foi utilizado um paquímetro para tomada de duas medidas perpendiculares (uma no maior e outra no menor diâmetro de crescimento micelial do fungo) sem abertura da placa (Figura 8).



FIGURA 8 – Representação das tomadas das medidas do crescimento micelial do fungo nas placas de Petri. Fonte: Freepik, 2017.

Seguindo o método de Fontana *et al.* (2017), a última medição de todos os tratamentos foi realizada no sétimo dia, quando o crescimento micelial do fungo no tratamento controle atingiu o diâmetro total da placa. Com base nos dados diários de crescimento radial de *B. cinerea*, foi calculado a taxa de crescimento micelial (TCM) do fungo, utilizando a fórmula $TCM = \left(\frac{\text{Diâmetro final da colônia}}{\text{Número de dias de incubação}} \right) \times 100$ proposta por Fontana *et al.* (2017).

A ação fungistática dos extratos foi obtida por meio da média ponderada da percentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) do fungo nos extratos em relação ao controle, utilizando a fórmula $PICM = \left(\frac{\text{Diâmetro do controle} - \text{Diâmetro no tratamento}}{\text{Diâmetro no controle}} \right) \times 100$ proposta por Fontana *et al.* (2027).

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) nos diferentes tratamentos foi calculado usando a fórmula $IVCM = \Sigma \left(\frac{D-Da}{N} \right)$ proposta por Fontana *et al.* (2017), onde: D = diâmetro médio da colônia obtida no dia da avaliação; Da = diâmetro médio da colônia obtida no dia anterior; N = tempo (em dias) transcorridos entre a instalação do experimento e a avaliação final para cada extrato utilizado, a fim de conhecer qual extrato vegetal foi capaz de inibir o crescimento do fungo.

4.5. Delineamento experimental e análise de dados

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos e oito repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. Os dados qualitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito fungistático dos extratos de *C. verbenacea* sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *B. cinerea*. Logo nos primeiros dias de avaliação constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos. Os dados examinados mostraram diferenças significativas entre os extratos vegetais em estudo. A Figura 9 mostra um crescimento linear maior, no tempo, no tratamento controle comparados aos demais tratamentos. As menores taxas de crescimentos miceliais de *B. cinerea* foram observadas com a utilização dos extratos aquosos quentes de *C. verbenacea*.

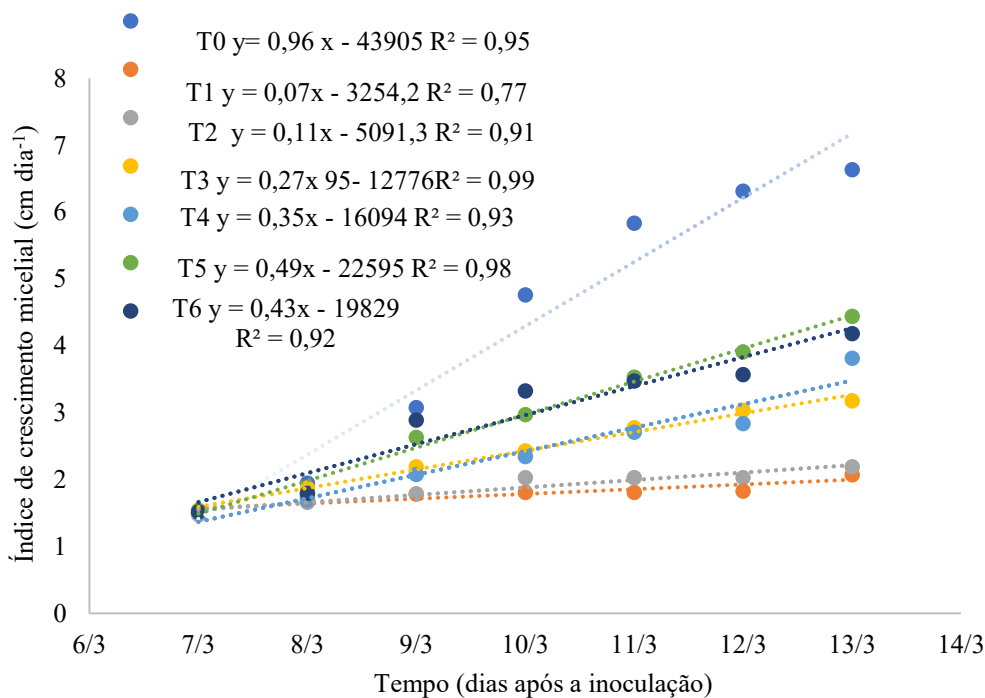


FIGURA 9 - Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (cm dia^{-1}) do fungo *B. cinerea* tratado com diferentes extratos de *Cordia verbenacea*.

T0 – Controle (somente meio de cultura BDA); T1- Extrato vegetal aquoso quente - Infusão (30g de massa seca +130 mL H_2O quente); T2 – Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado (30g de massa seca + 130 mL H_2O quente); T3 – Extrato vegetal aquoso quente – Mistura (30g de massa seca + 130 mL H_2O quente); T4 – Extrato vegetal aquoso frio (30g de massa seca em 130 mL H_2O fria); T5 – Extrato hidroalcoólico 30 (30g de massa seca em 100 mL de álcool); T6 – Extrato hidroalcoólico 105 (105g de massa seca em 300 mL de álcool). Fonte: Rocco, 2025. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação ao processo de inibição do crescimento micelial do fungo *B. cinerea* todos os extratos vegetais utilizados apresentaram efeito fungistático quando comparados ao controle. O tratamento mais eficaz na inibição do fungo *B. cinerea* foi o extrato aquoso extraído por infusão (T1), com $0,07 \text{ cm dia}^{-1}$, enquanto o tratamento controle apresentou um crescimento mais acentuado de $0,96 \text{ cm dia}^{-1}$. A utilização dos extratos hidroalcoólicos (T5 e T6), apresentaram menor inibição, sendo de $0,49 \text{ cm dia}^{-1}$ e $0,43 \text{ cm dia}^{-1}$, os quais foram responsáveis pela menor inibição micelial do fungo *B. cinerea*. Esses resultados sugerem que a água quente é mais eficaz na extração dos compostos antifúngicos ativos do que o álcool.

Caetano (2020), obteve resultados semelhantes utilizando quatro (Vcur-101, Vcur-104, Vcur-105 e Vcur-403) óleos essenciais de *Varronia curassavica* (erva baleeira). O acesso Vcur-104 mostrou uma redução de aproximadamente 50% no crescimento micelial de *B. cinerea* ao usar uma dose de 100 mg L^{-1} . Já os óleos essenciais Vcur-101 e Vcur-403 conseguiram diminuir

em 50% o crescimento do fungo mesmo nas doses menores de 1 e 10 mg L⁻¹. Por fim, o acesso Vcur-105 foi capaz de reduzir até 40% o crescimento do fungo em concentrações mais altas, de 50 e 100 mg L⁻¹, mas essa redução só foi observada após cinco dias de avaliação.

Carvalho Jr. *et al.* (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das partes aéreas e folhas de *C. verbenacea* frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas pelo método de difusão em ágar. Os autores observaram atividades positivas contra as bactérias gram-positivas (duas espécies de *Staphylococcus*, uma delas *S. aureus*; duas de *Bacillus*) e contra fungos (oito espécies de *Candida*, uma delas *C. albicans*, várias cepas, e uma de *Cryptococcus*). Porém, apenas um gênero de gram-negativas (*Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*), enquanto os demais gram-negativas (duas espécies de *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e duas espécies de *Salmonella*) foram resistentes.

Ao analisarmos o Índice de Velocidade de crescimento micelial (Figura 10), foi observado que os tratamentos apresentaram as menores taxas de crescimento de 0,09 cm dia⁻¹ e 0,011 cm dia⁻¹.

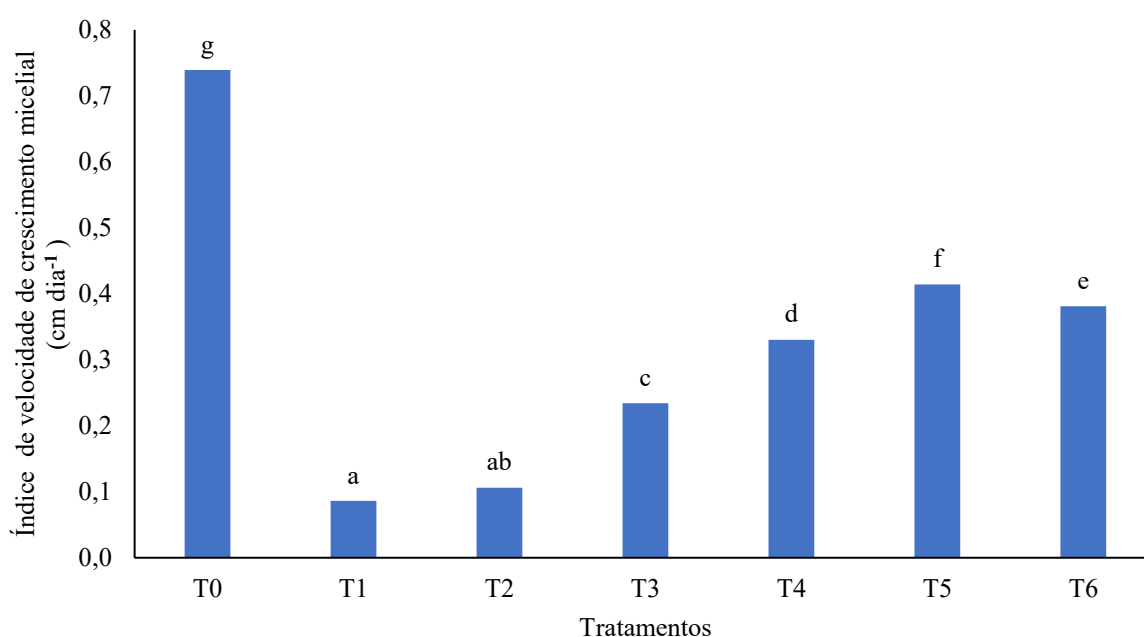


FIGURA 10 - Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do fungo *B. cinerea* tratado com diferentes extratos de *Cordia verbenacea*.

T0 – Controle (somente meio de cultura BDA); T1- Extrato vegetal aquoso quente - Infusão (30g de massa seca +130 mL H₂O quente); T2 – Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T3 – Extrato vegetal aquoso quente – Mistura (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T4 – Extrato vegetal aquoso frio (30g de massa seca em 130 mL H₂O fria); T5 – Extrato hidroalcoólico 30 (30g de massa seca em 100 mL de álcool); T6 – Extrato hidroalcoólico 105 (105g de massa seca em 300 mL de álcool). Fonte: Rocco, 2025.

Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A aplicação dos extratos de *C. verbenacea* resultou na redução significativa do crescimento micelial do fungo *B. cinerea*, com destaque para o extrato obtido por infusão, que apresentou o menor IVCM. Já o extrato aquoso frio (T3), apresentou o terceiro menor IVCM, crescendo 0,23 cm dia⁻¹. Os tratamentos (T5 e T6) apresentaram os maiores IVCM sendo de 0,41 cm dia⁻¹ e 0,38 cm dia⁻¹, indicando a menor eficácia no crescimento do fungo *B. cinerea*. Possivelmente, a polaridade do solvente pode ter influenciado na extração dos metabólitos secundários da *C. verbenacea* e na eficácia do extrato contra o mofo cinzento.

De acordo com Silva *et al.* (2014), o extrato aquoso de *C. verbenacea*, utilizado na concentração de 20%, apresentou eficácia moderada na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos do cafeeiro. Os índices de inibição observados foram de ~32,0% para *Fusarium oxysporum*, 56,7% para *Phoma tarda*, 50,3% para *Colletotrichum gloeosporioides*, 71,8% para *Cercospora coffeicola* e 72,2% para *Rhizoctonia solani*. No entanto, quando avaliada a inibição da germinação de esporos, os resultados foram menos expressivos, com 35,0% de germinação para *Hemileia vastatrix*, 70,5% para *C. gloeosporioides*, 88,8% para *F. oxysporum*, 77,8% para *C. coffeicola* e 47,9% para *P. tarda*. Esses dados indicam que, embora o extrato demonstre potencial para redução do crescimento micelial de alguns patógenos, sua ação é limitada na inibição da germinação conidial.

Esse efeito fungistático Rodrigues *et al.* (2012), também observaram utilizando o óleo essencial extraído das folhas de *C. verbenacea* que demonstrou atividade fungistática significativa contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*, além de apresentar ação antibacteriana frente a cepas gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e também contra bactérias gram-negativas multirresistentes, como *Escherichia coli* (cepa 27). Em todos os ensaios realizados, a concentração inibitória mínima (CIM) observada foi de 64 µg mL⁻¹. Além disso, quando o óleo essencial foi combinado com aminoglicosídeos em concentrações subinibitórias (CIM dividida por 8), verificou-se tanto efeitos sinérgicos quanto antagônicos, a depender da combinação. O efeito sinérgico mais expressivo ocorreu na associação com a amicacina, reduzindo a CIM de 256 µg mL⁻¹ para 64 µg mL⁻¹ em todas as cepas bacterianas testadas, o que sugere um potencial promissor para uso combinado em terapias antimicrobianas (Rodrigues *et al.*, 2012).

Na taxa de crescimento (Figura 11), foi verificado maior crescimento e desenvolvimento do micélio do fungo no tratamento controle. A *C. verbenacea* apresentou um efeito fungistático

em todos os demais tratamentos, onde o fungo *B. cinerea* teve um crescimento e desenvolvimento mais lento comparado com o tratamento controle. A menor taxa de crescimento foi verificada no tratamento T1 com uma taxa de crescimento micelial (TCM) de 23,0%, seguida pelo tratamento T2 com 24,3%, mas não diferindo do tratamento por infusão. Já nos tratamentos T3 e T4, *B. cinerea* apresentou uma TCM de 35,3% e 42,4% respectivamente.

Nos tratamentos com a utilização de extratos hidroalcoólicos, a menor TCM foi de 46,5% com a utilização do extrato hidroalcoólico 105 e uma TCM de 49,3% com o extrato hidroalcoólico 30, apresentando assim baixa eficácia no controle do fungo.

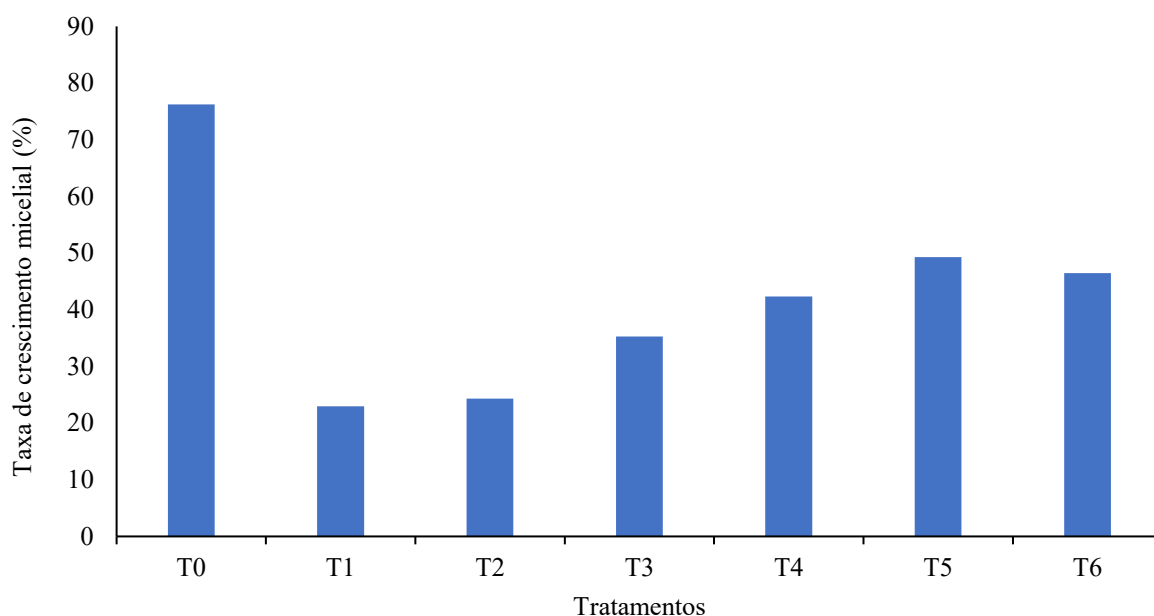


FIGURA 11 - Taxa de crescimento micelial (TCM, em %) do fungo *B. cinerea* tratado com diferentes extratos de *Cordia verbenacea*.

T0 – Controle (somente meio de cultura BDA); T1- Extrato vegetal aquoso quente - Infusão (30g de massa seca +130 mL H₂O quente); T2 – Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T3 – Extrato vegetal aquoso quente – Mistura (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T4 – Extrato vegetal aquoso frio (30g de massa seca em 130 mL H₂O fria); T5 – Extrato hidroalcoólico 30 (30g de massa seca em 100 mL de álcool); T6 – Extrato hidroalcoólico 105 (105g de massa seca em 300 mL de álcool). Fonte: Rocco, 2025. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Ao analisarmos os extratos sobre o percentual de inibição de crescimento micelial (PICM) na Figura 12, o extrato vegetal aquoso quente por infusão (T1) novamente se destacou

em relação aos demais, apresentando 70,4% de inibição, seguido pelo tratamento T2 com 68,4% de inibição, mas não diferindo do tratamento T1.

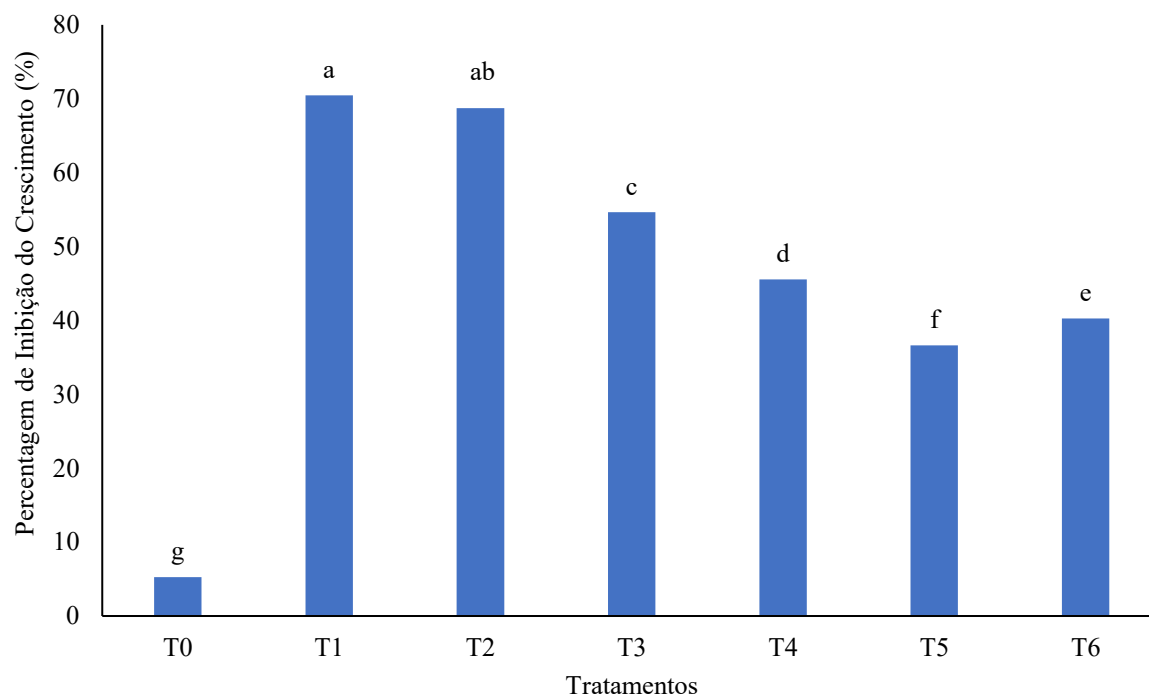


FIGURA 12 - Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PICM, em %) do fungo *B. cinerea* tratado com diferentes extratos de *Cordia verbenacea*.

T0 – Controle (somente meio de cultura BDA); T1- Extrato vegetal aquoso quente - Infusão (30g de massa seca +130 mL H₂O quente); T2 – Extrato vegetal aquoso quente – Filtrado (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T3 – Extrato vegetal aquoso quente – Mistura (30g de massa seca + 130 mL H₂O quente); T4 – Extrato vegetal aquoso frio (30g de massa seca em 130 mL H₂O fria); T5 – Extrato hidroalcoólico 30 (30g de massa seca em 100 mL de álcool); T6 – Extrato hidroalcoólico 105 (105g de massa seca em 300 mL de álcool). Fonte: Rocco, 2025. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O tratamento T3 apresentou inibição de crescimento micelial de 54,6%, seguido pelo tratamento usando extrato vegetal aquoso a frio, com um pequeno decréscimo apresentando no percentual de inibição do crescimento micelial (45,5%) do fungo. Já o T6 apresentou uma inibição de 40,3%. As menores inibições foram obtidas nos tratamentos usando extratos hidroalcoólicos apresentando uma inibição de 40,3% e 36,6%, respectivamente.

Essa diferença foi mais fácil de ser visualizada no sétimo dia de experimento (Figura 13). No tratamento controle o fungo *B. cinerea* forma um micélio cobrindo toda a placa de Petri, enquanto os demais tratamentos foi possível verificar o efeito fungistático da *C. verbenacea*.

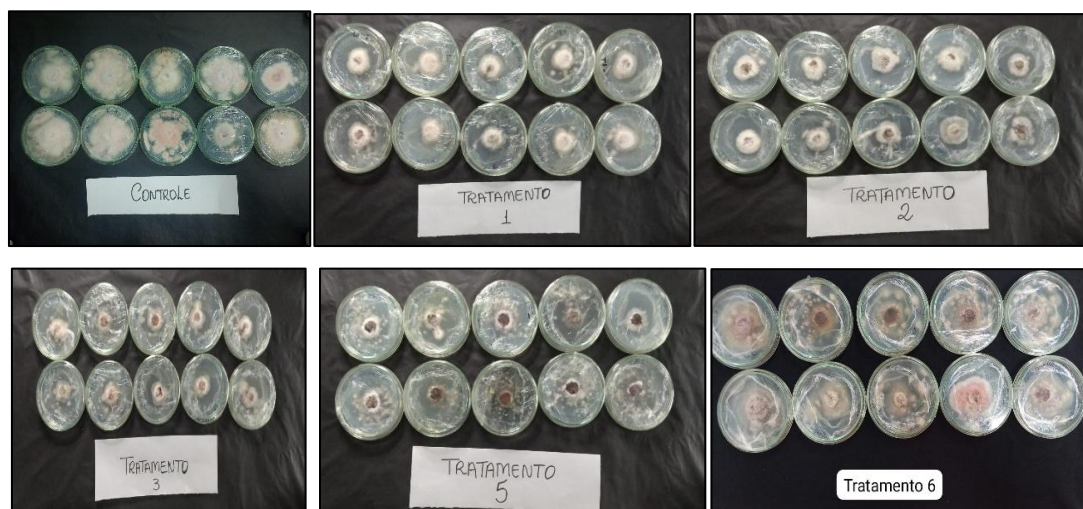


FIGURA 13 – Placas de Petri com o fungo *B. cinerea* tratadas com diferentes extratos de *Cordia verbenacea*, sete dias após a inoculação do fungo. Fonte: Rocco, 2025.

Assim como nos resultados deste trabalho, Venturoso (2011) não encontrou controle significativo sobre o crescimento do fungo *Penicillium* spp. nos tratamentos com extratos aquosos a frio e alcoólicos de cavalinha, nos primeiros 12 dias. Da mesma forma, observou-se que os extratos aquosos a frio e alcoólicos demonstraram pouco efeito fungistático significativo sobre o fungo *B. cinerea*. No entanto, os aquosos utilizando água quente em infusão demonstraram respostas satisfatórias sobre o fungo.

Diversos estudos demonstram que os efeitos antifúngicos da *C. verbenacea* estão associados a seus compostos bioativos, especialmente os presentes no óleo essencial e no extrato hidroetanólico. O óleo essencial das folhas contém majoritariamente β -cariofileno (25,4%), α -pineno (9,5%), bicyclogermacreno (11,3%) e δ -cadineno (9%). Esses terpenos demonstraram atividade fungistática contra *C. albicans* e *C. krusei*, com concentração inibitória mínima (CIM) de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, foi observada atividade sinérgica com a amicacina, reduzindo a CIM do antibiótico de $256 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rodrigues *et al.*, 2012). Já os extratos hidroetanólicos e suas frações, segundo Scardelato *et al.* (2016), apresentam flavonoides, taninos e outros terpenos com ação antifúngica, especialmente contra *Candida glabrata*, com CIMs variando de 9,8 a $36,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os flavonoides e taninos atuam na desestabilização da parede celular e na inibição dos processos germinativos dos fungos, enquanto os terpenos apresentam ação direta sobre a membrana, promovendo a lise celular (Scardelato *et al.*, 2016).

Dentre os sete tratamentos testados, o extrato obtido pela técnica de infusão por 30 minutos demonstrou resultados satisfatórios sobre o fungo *B. cinerea*. Vale ressaltar que, estudos que avaliam o tempo de extração dos compostos com propriedades antifúngicas da *C. verbenacea* devem ser realizados para verificar a bioatividade desses fitoquímicos para o manejo do mofo cinzento. Os resultados obtidos neste estudo apresentam significativa relevância prática, pois *C. verbenacea* demonstra potencial para o manejo de *B. cinerea* em culturas agrícolas. As diferenças observadas nos resultados com os extratos vegetais podem ser atribuídas à padronização da metodologia de extração, às concentrações utilizadas e à época de coleta das plantas. A separação dos metabólitos secundários e a análise da atividade antifúngica dessas moléculas podem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de novas ferramentas de manejo de *B. cinerea* e de outros patógenos que causam doenças em plantas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o presente estudo foi realizado, pode-se concluir que todos os extratos vegetais testados demonstram efeito fungistático sobre *B. cinerea*, *in vitro*.

Dentre os sete tratamentos testados, o extrato obtido pela técnica de infusão por 30 minutos foi o que apresentou a maior efetividade para suprimir o crescimento micelial do fungo. Os tratamentos com a utilização do extrato aquoso frio e alcoólico apresentaram baixo efeito inibitório sobre o crescimento do *B. cinerea*.

Contudo, a *C. verbenacea* demonstra potencial para o manejo de *B. cinerea* em culturas agrícolas e pode ser testada no controle fungistático de outros patógenos, *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V. P. **Antagonismo in vitro de isolados de *Pisolithus* spp.** sobre fungos fitopatogênicos. 2012, 37 f. TCC. (Graduação em Agroecologia). Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2012.
- ALVES, E.F.; SANTOS, B. S.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória da fração hexânica do extrato hexânico de *Cordia verbenacea* D.C. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 5, p. 2-5, 2014.
- AMPESE, M.; ALMANÇA, M. A. K. Efeito de fungicidas no controle de *Botrytis cinerea* in vitro e em bagas de uva com fermento. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, n. 11, p. 28-36, 2019.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ARK, P. A.; THOMPSON, J. P. Control of certain diseases of plants with antibiotics from garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Disease Reporter**, v. 43, p. 276–282, 1959.
- BARTLETT, M.S. Propriedades de suficiência e testes estatísticos. **Anais da Royal Society of London. Série A-Ciências Matemáticas e Físicas**, v. 160, n. 901, p. 268-282, 1937.
- BAYEUX, M.C. *et al.* Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* D.C. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1229-1232, 2002.
- BIANCHI, A. *et al.* Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopatogenic fungi in vitro. **Plant Disease**, v. 81, p. 1241-1246, 1997.
- BOX, G.E.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, p. 211-243, 1964.
- BOLKHAN, H. A.; RIBEIRO, W. L.; Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. subglutinans e *Rhizoctonia solani*, **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 565-566, 1981.
- BRAND, S.C. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, 2010.
- CAETANO, A.O. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea*.** 2020. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.
- GOMES, M.V. S. *et al.* Development and validation of a quantification method for ohumulene and trans-caryophyllene in *Cordia verbenacea* by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 2, p. 182-190, 2019.

- DAL-BELLO, G. *et al.* Postharvest control of *Botrytis* gray mold in tomato by antagonists and biorational compounds. **Integrated Protection of Stored Products**. La Plata: IOBC-WPRS Bulletin, v. 111, p. 417-425, 2015.
- DE CARVALHO JR., P.M., RODRIGUES, R.F.O., SAWAYA, A.C.H.F., MARQUES, M.O.M., SHIMIZU, M. T., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.
- 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.
- FEIJÓ, E.V.R.S.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L.C.B. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 24, p. 516-523, 2014.
- FERNANDES, E.S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal Pharmacology**, v. 569, p. 228-236, 2007.
- FLORES, M. F. **Extratos vegetais no controle de podridão parda (*Monilinia fructicola*) em pêsego**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Pato Branco, 2013.
- GASPARINO, E.C.; BARROS, M.A.V.C. Palinotaxonomia das espécies de *Cordiaceae* (Boraginales) ocorrentes no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 1, p. 33-55, 2009.
- GOMES, P.A. **Óleo essencial da erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) de áreas nativas**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Norte Fluminense, Campo dos Goitacazes, Rio de Janeiro, 2010.
- GOTTSCHLING, M. *et al.* Congruence of a phylogeny of *Cordiaceae* (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, p. 425-437, 2005.
- SILVA J.M.A. *et al.* Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 270-284, 2012.
- JUDD, W. S. *et al.* Plant systematics: a phylogenetic approach. **Revue Internationale d'Ecologie Méditerranéenne**, v. 25, n. 2, p. 210-215, 1999.
- KIMATI, H. *et al.* **Guia de Fungicidas Agrícolas - Recomendações por Cultura**, Jaboticabal. v. 2 p. 25, 1997.
- KLOESCH, B. *et al.* Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 400-405, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 2, p. 544, 2008.

MACHOTA, R. *et al.* Assessment of injuries caused by *Anastrepha fraterculus* (Wild.) (Diptera: Tephritidae) on the incidence of bunch rot diseases in table grape. **Neotropical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 361-368, 2016.

MECCIA, G. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communication**, v. 4, n. 8, p. 1119–1122, 2009.

MILLER, J.S. Classificação da subfamília Boraginaceae Ehretioideae: Ressurreição do gênero *Hilsenbergia* Tausch ex Meisn. **Adansonia**, n. 3, v. 25, p. 151-189, 2003.

MING, L.C. **Horticultura Brasileira: Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia**. v. 12, n. 1, p. 3-9, 1994.

MOCCELLIN, Renata. **Espécies de brássicas no controle de fitopatógenos habitantes do solo**. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

MONTES, B.R. *et al.* Propriedades antifúngicas em plantas superiores: análises retrospectivo de investigaciones. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 18, n. 2, p. 125-131, 2000.

NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

NIZIO, D. A.C. **Estudo fitoquímico e atividades antifúngica e antiprotozoária do óleo essencial de genótipos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)**. 2015. 109 f. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2015.

NOWICKE, J.W.; MILLER, J.S. **Morfologia, desenvolvimento e relevância sistemática do pólen e esporos: Morfologia do pólen de *Cordioideae* (Boraginaceae): *Auxemma*, *Cordia* e *Patagonula***. Áustria. Springer Viena, v.5, p. 103-121, 1990.

OLHER, M.L.A.R. *et al.* Controle *in vitro* do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* por metabólitos e extratos de *Pisolithus microcarpus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 15008-15025, 2021.

ORELLANA, A.S.B. **Influência de la temperatura del aire de secado en la cantidad y composición de aceite esencial de *Cordia verbenacea***. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

PASCHOLATI, S.F. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 417-45, 1995.

PEREIRA, M. *et al.* Levantamento das espécies de insetos pragas associados à viticultura no município de São Roque (SP). **Scientia**, v. 7, n. 24, 2019.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Tratado de Ampelologia: ciências y técnicas de la viña**: Cultura, Patología, Defensa Sanitaria de la Viña. Paris: Editorial Hemisfério Sur SA, Tomo II, p. 660-650, 1971.

RODRIGUES, F. F. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, p. 161–165, 2012.

ROZWALKA, L. C. *et al.* Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, 2006.

SANTOS, A.V. *et al.* *In vitro* propagation, histochemistry, and analysis of essential oil from conventionally propagated and in vitro-propagated plants of *Varronia curassavica* Jacq. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 405-413, 2013.

SCARDELATO, J. A. S. *et al.* *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae): quality control parameters, phytochemical screening and evaluation of anti-Candida activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 837–843, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; J.R.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 346, 2016.

SERTIÉ, J. A. A. *et al.* Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topic antiinflammatory and gastrotoxicity of 183 a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 239-247, 1991.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965.

SILVA A.C. *et al.* Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. **Trop. Plant Pathology**, v. 37, p. 305-313, 2012.

SILVA A.C. *et al.* Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. **For Path**, v. 44, p. 145–153, 2014.

SILVA, J. L. *et al.* Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 539–544, 2014.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade Antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 17, n. 2, p. 124-128, 2013.

STANGARLIN J. R. *et al.* Plantas Mediciniais: Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 16-21, 1999.

TARODA, N.; GIBBS, P.E. Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. A new infrageneric classification and conspectus. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 31-42, 1986.

VEGETAIS, EXTRATOS. **Food Ingredients Brasil**. São Paulo, n. 11, p. 16-20, 2010.

VENTUROSO, L. R. *et al.* Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 89-95, 2011.

VISMARA, L.S. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea in vitro* e ação toxicológica**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

WEBBER, S. **Extratos vegetais no controle alternativo de podridão parda em pessegueiro**. 2013. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, 2016.

ZADOKS, J.C. The costs of change in plant protection. Journal of Plant Protection. **Journal of Plant Protection**, v. 9, p. 151-159, 1992.

ZADOKS, J.C. *et al.* Modern plant protection. Developments and perspectives. Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, p.16-26, 1997.