

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE
AGRONOMIA

Larissa Suelen Dietrich Degani
Marceli Schabarum

**POTENCIAL DOS EXTRATOS VEGETAIS DE *Baccharis dracunculifolia*
E *Piper aduncum* NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* e
*Monilinia fructicola***

São Miguel do Oeste – SC (2025)

Larissa Suelen Dietrich Degani
Marcieli Schabarum

**POTENCIAL DOS EXTRATOS VEGETAIS DE *Baccharis dracunculifolia*
E *Piper aduncum* NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* e
*Monilinia fructicola***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Bacharelado em Agronomia do
Câmpus São Miguel do Oeste do Instituto
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial à obtenção do título de **Engenheiro(a)**
agrônomo(a)

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Keli Cristina Fabiane

Coorientadora

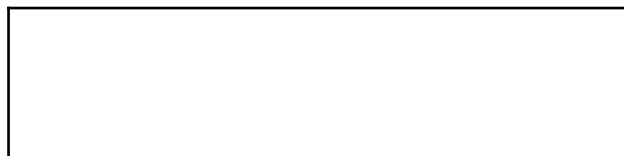
Prof^a. Dr^a. Francieli Lima Cardoso

São Miguel do Oeste

Larissa Suelen Dietrich Degani
Marcieli Schabarum

**POTENCIAL DOS EXTRATOS VEGETAIS DE *Baccharis dracunculifolia*
E *Piper aduncum* NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea* e
*Monilinia fructicola***

Este trabalho foi aprovado pela banca examinadora composta por Keli Cristina Fabiane, Stefany Grutzmann Arcari e Caliandra Bernardi na data 13/02/2025, 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.



Prof^a. Dr^a. Keli Cristina Fabiane

Instituto Federal Santa Catarina - campus São Miguel Do Oeste

RESUMO

Os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento, e *Monilinia fructicola*, da podridão parda, implicam em prejuízos na produção de frutas. O *B. cinerea* atinge mais de 200 espécies de plantas, incluindo as com importância econômica, como o morangueiro. O *M. fructicola* afeta as fruteiras de caroço, como o pessegueiro. Estes patógenos ocasionam danos desde a florada até a pós-colheita. Assim, muitas aplicações de fungicidas são necessárias para minimizar os impactos causados por estas doenças, o que eleva o custo de produção, além dos danos ao meio ambiente. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas das plantas *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* no controle *in vitro* dos fungos *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*. O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Bromatologia, de Biotecnologia, de Vegetais e de Microbiologia do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus São Miguel do Oeste-SC. Primeiramente, foi realizado o isolamento direto do *B. cinerea* e do *M. fructicola*, onde a confirmação dos isolados deram-se por meio de análise molecular. Também, foram coletadas e desidratadas as folhas de *Piper aduncum* e de *Baccharis dracunculifolia*. Com o material vegetal moído, foram elaborados extratos aquosos de *P. aduncum* (EAPa) e *B. dracunculifolia* (EABd), com concentração final de 200 mg.mL⁻¹ e, extratos hidroalcoólicos de *P. aduncum* (EHPa) e *B. dracunculifolia* (EHBd), com uma concentração final de 200 mg.mL⁻¹. Para a realização dos testes, o inóculo foi padronizado conforme a escala Mc Farland para fungos. Para avaliar a potencialidade dos extratos, foram realizados testes da concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) por meio do Spot Test, avaliação da atividade antifúngica com a metodologia de disco-difusão e teste de inibição por compostos voláteis. Os EAPa, EABd, EHPa e EHBd em *B. cinerea* e o EHPa em *M. fructicola* não interferiram no desenvolvimento. O EAPa, EABd e EHBd apresentaram CIM de 200 mg.mL⁻¹, 100 mg.mL⁻¹ e 100 mg.mL⁻¹, respectivamente, sendo que o EHBd também apresentou CFM de 200 mg.mL⁻¹. Nos demais testes não observou-se diferença do controle nos demais testes. Os EAPa, EABd, EHPa e EHBd em *B. cinerea* e o EHPa em *M. fructicola* não apresentaram potencial de controle. O EHBd apresentou capacidade fungicida na concentração de 200 mg.mL⁻¹ para o *M. fructicola*. No entanto, vale testar novas formas de extração e concentrações. Os EAPa e EABd testados no *M. fructicola*, tiveram efeito fungistático no teste CIM, mostrando que as plantas podem ser estudadas, mas considerando novas formas de obtenção dos compostos.

Palavras-chave: Alecrim-do-campo; Pimenta-de-macaco; Mofo cinzento; Podridão parda; Fungistático.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 Obtenção e confirmação dos patógenos.....	9
2.2 Obtenção do extrato.....	9
2.3 Preparação da solução-padrão do inóculo.....	10
2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	11
2.5 Concentração fungicida mínima (CFM).....	12
2.6 Avaliação da atividade antifúngica.....	13
2.7 Teste de inibição por compostos voláteis dos extratos.....	13
3. RESULTADO E DISCUSSÕES.....	14
4. CONCLUSÃO.....	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Botrytis cinerea* é a fase assexuada do agente etiológico do mofo cinzento (Morandi; Maffia, 2005), este age como fungo necrotrófico, afeta pré e pós-colheita em mais de 200 espécies, dentre elas, vegetais, frutíferas, floríferas e cereais, além de atingir diversas partes da planta, como caule, frutos e folhas (Nakajima; Akutsu, 2014).

Este fungo é considerado o segundo fitopatógeno de maior importância agrônômica, por provocar perdas na qualidade de frutos cultivados em estufas, campos abertos ou mesmo após a colheita em armazenamento refrigerado (Dean *et al.*, 2012). Dentre as culturas alimentares de importância econômica estão o morango, o tomate, o pêssego, o brócolis, a cenoura, a batata, entre outras.

Segundo dados do Censo Agropecuário de 2017, 78,1% das propriedades rurais de Santa Catarina são classificadas como familiares e estão voltadas para a produção de alimentos (Fossá, 2022). Neste contexto, a alta pluviometria do estado, com média anual (1975-2014) de 1748 mm.ano⁻¹ (Gotardo *et al.*, 2018), favorece a degradação de alimentos devido uma maior incidência e severidade das infecções fúngicas. Estudos confirmam que temperaturas amenas (15°C a 24°C) combinadas com alta umidade relativa do ar auxiliam na maior agressividade deste patógeno (Oliveira *et al.*, 2011).

Contudo, as condições de temperatura moderada e umidade saturada presentes em Santa Catarina, facilitam o desenvolvimento de lesões e esporulação do *B. cinerea* (Mahmoud *et al.*, 2023). Devido ao fato de haver diversos hospedeiros, ciclo de vida curto, alta variabilidade genética (Shao; Zhao; Ma, 2021) e apresentar-se de forma agressiva, tem-se como necessidade muitas aplicações de fungicida para reduzir os danos causados por este fitopatógeno (Chen; Chen; Chou, 2018).

Outro patógeno causador de perdas importantes é o fungo *Monilinia fructicola*, agente etiológico da podridão parda, principal doença do pessegueiro, que ocasiona perdas na produção tanto em pré como pós colheita. Sua ocorrência frequente e alta severidade resultam em danos significativos à produção e mesmo com a aplicação de produtos químicos, as perdas ocasionadas por essa doença podem ultrapassar 50% do produto final (Hong; Michailides, 1998). Sintomas típicos de podridão parda do pêssego são os frutos cobertos pelas frutificações do fungo, que são de coloração acinzentada (Garrido; Sônego, 2003), além de queima das flores e seca dos ramos (De Souza, 2006). As fases mais suscetíveis ao ataque do

patógeno são floração e pré-colheita (Nascimento, 2013), podendo infectar 50% das flores do pomar (De Mio *et al.*, 2008).

As condições favoráveis ao patógeno causador da podridão parda são a alta pluviosidade e temperaturas entre 10°C e 25°C. Estas condições estão presentes nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo estes, os principais produtores da fruta e potenciais alvos para surtos desta doença (Back, 2021). Tendo isso em vista, o uso de fungicidas sistêmicos é o método mais comum para o controle da podridão parda no campo, sendo feito o tratamento com três aplicações no florescimento (início do florescimento, florescimento e queda das pétalas) e mais duas ou três aplicações na pré-colheita (Raseira *et al.*, 1993).

Estes patógenos apresentam em comum a alta severidade e a necessidade de uso frequente de agroquímicos para reduzir as perdas de produção. No entanto, devido aos repetidos tratamentos com fungicidas durante o ciclo produtivo das plantas hospedeiras, provoca o aumento da pressão de seleção sobre os isolados dos fungos, aumentando também a resistência destes microrganismos a determinados compostos (Zhao *et al.*, 2024).

Além do problema supracitado, o uso de fungicidas químicos causam impactos sociais e ambientais negativos a curto e a longo prazo, trazendo riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Schwan-Estrada; Stangarlin; Cruz, 2000; Oliveira *et al.*, 2015). As contaminações ambiental e humana se agravam devido ao descumprimento das medidas de segurança, falta de conhecimento sobre os riscos envolvidos na aplicação, uso ou dosagem excessiva dos produtos e desafios sociais presentes no meio rural (Miranda *et al.*, 2007).

Visando diminuir ou até inibir o uso de fungicidas, é crescente o número de pesquisas utilizando extratos brutos ou óleos essenciais de plantas bioativas como alternativa ao uso de agroquímicos, as quais, têm apresentado resultados positivos no controle de fitopatógenos e demonstrado potenciais ações fungitóxicas (Rozwalka *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários encontrados no extrato bruto de plantas apresentam-se como uma forma promissora de controle alternativo de doenças em cultivos agrícolas (Fontana *et al.*, 2017). Esses compostos químicos produzidos pelas plantas desempenham papéis importantes na proteção contra patógenos e insetos-praga e, têm sido explorados como fontes naturais de agentes bioativos para o manejo de doenças de plantas. O uso de metabólitos secundários como uma abordagem de controle de doenças oferece uma alternativa sustentável em relação aos produtos químicos sintéticos, contribuindo para a redução do impacto ambiental (Rozwalka *et al.*, 2008).

Embora o desenvolvimento de pesquisas com controle alternativo esteja mais recorrente, ainda há muito a ser feito, pois, pouco se sabe sobre a composição da maioria das plantas presentes no Brasil e quais suas possíveis utilizações (Schwan-Estrada; Stangarlin; Cruz, 2000). Uma extensa gama de compostos são encontrados nas mais diversas plantas e devem ser melhor explorados, evidenciando as melhores formas de extração, os compostos que atuam no controle do patógeno, bem como, realizar testes *in vitro* e *in vivo* para determinar a efetividade de tal extrato.

A *Baccharis dracunculifolia*, chamada popularmente de alecrim-do-campo, é uma espécie de arbusto lenhoso nativo das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (Bernardes, 2014). É amplamente utilizada na medicina tradicional como um agente anti-inflamatório, analgésico, empregada no tratamento de doenças gastrointestinais e úlceras (Timbe, 2019), além de apresentar atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida (Bonett *et al.*, 2010). A ação antifúngica da *B. dracunculifolia* já é relatada em diversos trabalhos científicos, onde tem se estudado e observado potencial no uso do óleo essencial e de extratos da planta em *Septoria lycopersici* (Welter, 2022), *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* (Dilkin *et al.*, 2022) e em *Colletotrichum gloeosporioides* (Bonett *et al.*, 2010; Bonett; Cerri, 2011).

A *Piper aduncum*, também conhecida como pimenta-de-macaco, é uma planta arbustiva, podendo ser encontrada em todas as regiões do Brasil. Pertence à família Piperaceae e possui importância científica e cultural. O gênero *Piper* tem um metabolismo secundário interessante, pela ocorrência de terpenos, flavonoides e outras classes de produtos naturais (Fazolin *et al.*, 2006). O extrato e óleo de *Piper aduncum* tem mostrado ser eficaz no combate a diversos microrganismos responsáveis por doenças fúngicas em vegetais que muitas vezes afetam plantas de grande importância econômica (Fazolin *et al.*, 2006), como é o caso dos fungos *Rhizopus stolonifer* (Morais, 2023), *Colletotrichum musae* (Bastos; Albuquerque, 2004), *Sclerotinia sclerotiorum* (Valadares *et al.*, 2018) e em bactérias, como *Xanthomonas campestris* (Fazolin *et al.*, 2006).

Tendo em vista os aspectos sociais e econômicos que *B. cinerea* e *M. fructicola*, assim como as propriedades antifúngicas já demonstradas das plantas alecrim-do-campo e pimenta-de-macaco em outros fitopatógenos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas das plantas *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* no controle *in vitro* dos fungos *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Bromatologia, de Biotecnologia, de Vegetais e de Microbiologia do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus São Miguel do Oeste-SC. Foram avaliados a concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) por meio do Spot Test, avaliação da atividade antifúngica com a metodologia de disco-difusão e teste do efeito volátil dos extratos.

As avaliações e testes realizados foram para os extratos de *B. dracunculifolia* e *P. aduncum*, individualmente, sob duas formas de extração, aquoso e hidroalcoólico, nos patógenos *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*.

2.1 Obtenção e confirmação dos patógenos

Os fungos *B. cinerea* e *M. fructicola* foram isolados e identificados pelo método direto, que consiste na transferência do patógeno (esporos e hifas) do material vegetal com lesão aparentes para placas de Petri com meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). Nas placas com o meio solidificado, foi adicionado fragmento da lesão com massa micelial ou conídios utilizando alça de platina estéril. Procedimento realizado em capela de fluxo laminar.

A contaminação com outros fungos foi eliminada devido a sucessivas repicagens do material. Para manutenção de cada cultura foi realizada a transferência de discos (0,5 cm) com micélio para placas novas. Tanto para isolamento quanto para manutenção houve a incubação em BOD (Biochemical Oxygen Demand) à 24 ± 1 °C, em fotoperíodo de 12 horas por aproximadamente 10 dias (Bernardi, 2020).

A confirmação das espécies isoladas foi realizada após as placas terem 7 dias, pelo Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário Agrônômica, localizado no município de Porto Alegre - RS. Com o micélio do fungo, foi realizada a extração do DNA, posteriormente a reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação do produto de PCR e sequenciamento. Em seguida, por meio de análise filogenética, utilizando a Máxima Verossimilhança, verificou-se se o isolado agrupou-se com referências em *B. cinerea* e *M. fructicola*. Confirmando então, que se tratava dos fungos em questão (Apêndice A e B).

2.2 Obtenção do extrato

As folhas de *Piper aduncum* e de *Baccharis dracunculifolia* foram coletadas em São Miguel do Oeste - SC e secas em estufa com circulação de ar, à 40°C por 72 horas.

Para a preparação dos extratos aquosos de *P. aduncum* (EAPa) e de *B. dracunfolia* (EABd) e também, os extratos hidroalcoólicos de *P. aduncum* (EHPa) e de *B. dracunculifolia* (EHBd) as folhas desidratadas foram trituradas em moinho analítico.

A preparação dos extratos aquosos consistiu em colocar 40g de folhas desidratadas e trituradas em 200 mL de água destilada a 100°C, mantidas em infusão por 30 minutos. Posteriormente, a filtração em funil com papel filtro, e em seguida o líquido foi novamente submetido ao sistema de filtração a vácuo, com membrana PES (poro de 0,45 µm) na capela de fluxo laminar. Em seguida, o EAPa e o EABd, com concentração de 200 mg.mL⁻¹, foram armazenados em frasco âmbar estéril e refrigerados, por duas semanas, até o momento do uso.

Para obtenção dos extratos hidroalcoólicos (EHPa e EHBd) a 200 mg.mL⁻¹, foram formuladas soluções com 40 g das folhas secas moídas, em 200 mL de álcool etílico 80%. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar, ao abrigo da luz, por 6 dias, e agitados manualmente a cada 8 horas. Os extratos foram filtrados em papel filtro, e rotaevaporados a 70 rpm e 50°C. Recuperou-se a concentração dos extratos repondo-se o álcool evaporado com água destilada estéril. Após, os extratos foram filtrados em sistema de filtração a vácuo, com membrana PES (poro de 0,45 µm) na capela de fluxo laminar e armazenados em frasco âmbar estéril sob refrigeração, por duas semanas, até o momento do uso.

2.3 Preparação da solução-padrão do inóculo

A preparação do inóculo para utilização na avaliação da concentração inibitória mínima, volátil e método disco-difusão, consistiu na utilização de placas de Petri com *B. cinerea* e *M. fructicola* bem desenvolvidos, em torno de 10 dias após o repique. Para cada placa com fungo foi adicionado 5 mL de caldo Batata e Dextrose (BD) e posterior raspagem da massa micelial da placa com auxílio de uma espátula. A massa micelial foi filtrada em gaze estéril, com adição de mais 5 mL de caldo BD, esta solução foi levada ao espectrofotômetro (Analyser 800M) com comprimento de onda de 530 nm. Utilizou-se caldo BD ou massa micelial para ajuste, deixando a solução com absorbância entre 0,400 e 0,500, conforme escala de McFarland. Todos os instrumentos utilizados no procedimento foram previamente esterilizados e o processo de preparação ocorreu em capela de fluxo laminar (Bernardi, 2020).

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

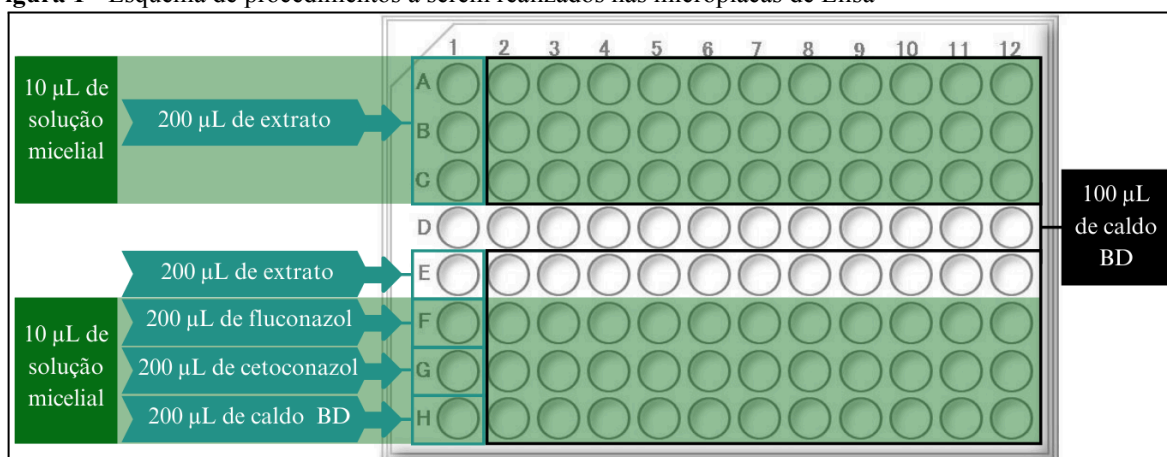
O teste de avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) teve como base a norma da CLSI M27 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Utilizou-se microplacas de Elisa com 96 poços, onde cada fungo, *B. cinerea* e *M. fructicola*, foi submetido a testes individuais referente às concentrações dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas das plantas *P. aduncum* e *B. dracunfolia*.

O teste consistiu na adição de 100 μL de caldo BD nos poços das colunas 2 a 12, das linhas A, B, C, E, F, G, e H. Após, em cada poço da coluna 1, foram pipetados: 200 μL de cada extrato, EAPa, EABd, EHPa e EHBd na concentração de 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, nas linhas A, B e C (triplicata) e E (inocuidade do extrato); 200 μL de fungicida, fluconazol e cetoconazol (250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nas linhas F e G, respectivamente (controle negativo) e; 200 μL de caldo BD na linha H, para testar a capacidade de desenvolvimento do microrganismo nas condições testadas.

Em seguida, foram feitas diluições seriadas, a fim de reduzir em 50% as concentrações dos extratos e fungicidas a cada coluna consecutiva. Com o auxílio de um pipetador multicanal, retirou-se 100 μL dos conteúdos presentes nos poços da primeira coluna e transferidos ao segundo poço, com posterior homogeneização da solução. Decorrente disso, repetiu-se o procedimento passando 100 μL do segundo poço para o terceiro, homogeneizando, e assim sucessivamente até o último poço (12), do qual, depois de homogeneizado, foi retirado e descartado 100 μL da solução deste último. As ponteiras eram trocadas a cada diluição.

Após a diluição das soluções, 10 μL de solução-padrão fúngica, que consistiu no inóculo preparado previamente (solução micelar), já ajustada, foi adicionada em cada poço (colunas 1 a 12, exceto nas linhas D e E). Procedimento esquematizado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema de procedimentos a serem realizados nas microplacas de Elisa



Fonte: As autoras (2025).

As microplacas foram, então, incubadas a 24 ± 2 °C por 72 horas em câmara BOD com fotoperíodo 12/12 e reveladas com 20 µL de solução de resazurina (10 mg em 100 mL de água destilada estéril), responsável por indicar a presença de células vivas. As avaliações foram realizadas de acordo com a coloração dos poços, onde a CIM é referente ao poço anterior ao primeiro poço com coloração azul. As menores concentrações sem crescimento aparente foram definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento do fungo (Bernardi, 2020).

2.5 Concentração fungicida mínima (CFM)

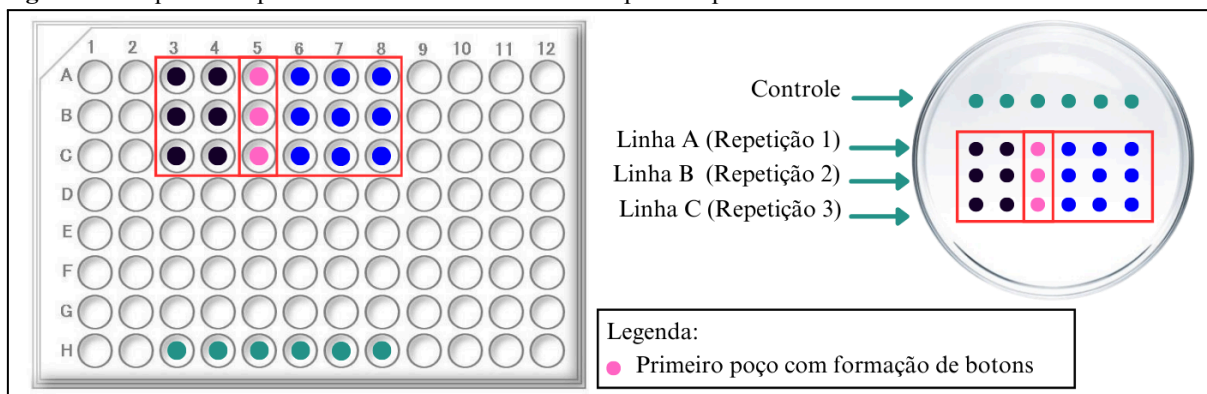
Para a avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), foi adotado o Spot Test, que consiste na observação das placas de Elisa e na presença de botons. O boton é a formação de massa micelial que se acumula no fundo do micropoço, o que indica crescimento microbiano e é identificado por meio de avaliação visual.

Após a identificação do primeiro poço (coluna 1 a 12, linhas A, B e C) da placa de Elisa que apresentaram essa formação, foram escolhidos poços, sendo dois anteriores e três posteriores à formação de botons. Sendo assim, utilizou-se o poço que apresentou menor crescimento microbiano, tendo em vista que essa foi a concentração mais próxima da CIM.

Abaixo das placas de petri, já com 20 ml de meio BDA solidificado, foram colados os gabaritos de papel milimetrado com marcações feitas a 1 cm² entre eles, para indicar os pontos onde a solução, após observação da formação dos botons, foi adicionada. Então, após a preparação e incubação do teste de CIM, antes da revelação com resazurina, foram retirados 2

μL de solução dos micropoços selecionados e adicionadas as marcações feitas na placa de Petri. Ver figura 2.

Figura 2 - Esquema de procedimentos a serem realizados para o Spot Test



Fonte: As autoras (2025).

As placas foram incubadas a 24 ± 2 °C por 72 horas em câmara BOD com fotoperíodo 12/12. A avaliação consistiu no aparecimento de colônia, após 72 horas.

2.6 Avaliação da atividade antifúngica

O método de disco-difusão permite avaliar a atividade antifúngica (Bona *et al.*, 2014), e foi realizado com base em metodologia proposta pela norma M2-A8 (NCCLS, 2003). Em placas de petri, contendo BDA, foram adicionados 4 mL da solução de inóculo preparada previamente. Realizou-se o espalhamento da solução com auxílio de alças de Drigalski. Posteriormente foram adicionados quatro discos estéreis de papel Whatman n° 1, de 6 mm de diâmetro, e adicionou-se 10 μL do extrato em cada placa de Petri. Cada concentração do extrato testado foi realizada em triplicata para ambos os fitopatógenos. As placas foram vedadas com revestimento plástico de PVC e armazenadas em câmara do tipo BOD à 24 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Como controle, foram utilizados discos contendo somente água destilada estéril, nas mesmas quantidades dos extratos. As avaliações foram realizadas com base na formação de halo de inibição do crescimento.

2.7 Teste de inibição por compostos voláteis dos extratos

O método de inibição por compostos voláteis serve para avaliar se os extratos apresentam compostos voláteis capazes de inibir o desenvolvimento do micélio fúngico

(Bernardi, 2020). Foram fixados nas tampas das placas de petri quadrados de papel filtro estéril, medindo 1 cm², com auxílio de uma gota de meio BDA. No papel filtro, pipetou-se 10 µL de cada extrato ou 10 µL de água destilada estéril, utilizada como controle. Nas bases das placas contendo 20 ml de meio BDA já solidificado adicionou-se 0,5 ml da solução-padrão de inóculo e espalhou-se com alça de Drigalski.

O teste com os extratos foi realizado em triplicata, para ambos os fitopatógenos. Para o controle utilizou-se água destilada estéril. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Todos os materiais foram previamente esterilizados em autoclave.

3. RESULTADO E DISCUSSÕES

Os extratos aquosos e hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* e de *P. aduncum* não afetaram o crescimento do *B. cinerea* sob as condições testadas. A exposição do fitopatógeno aos diferentes extratos foi similar ao controle (água), havendo crescimento micelial e formação de botons nos poços da CIM, desenvolvimento micelial normal na CFM. Para a atividade antifúngica por disco-difusão, e o teste para avaliar possível efeito volátil dos extratos, o *B. cinerea* se desenvolveu bem nas placas de todos os extratos (Tabela 1).

Para o *M. fructicola*, resultados foram observados no extrato aquoso de *P. aduncum* (EAPa), extrato aquoso de *B. dracunculifolia* (EABd) e extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* (EHBd) na concentração inibitória mínima, com 200 mg.mL⁻¹, 100 mg.mL⁻¹ e 100 mg.mL⁻¹, respectivamente. Embora com resultado na CIM, os três extratos EAPa, EABd, e EHBd, não foram eficazes quando testados na atividade antifúngica, por disco difusão e o teste do efeito volátil, permitindo um bom desenvolvimento do fungo.

O extrato hidroalcoólico de *P. aduncum* (EHPa) não afetou o crescimento do *M. fructicola*, apresentando crescimento similar ao controle nas diferentes metodologias de exposição do fungo ao extrato, mesmo na maior concentração (200 mg.mL⁻¹). Ver Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima, Concentração Fungicida Mínima, Atividade antifúngica por disco-difusão e Teste volátil para os extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum*, em *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*.

Fungo	Extratos á 200 mg.mL ⁻¹	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	Atividade antifúngica por disco-difusão	Teste volátil
<i>B. cinerea</i>	EAPa	Crescimento	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EABd	Crescimento	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EHPa	Crescimento	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EHBd	Crescimento	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
<i>M. fructicola</i>	EAPa	200 mg.mL ⁻¹	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EABd	100 mg.mL ⁻¹	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EHPa	Crescimento	Crescimento	Crescimento similar ao controle	Crescimento
	EHBd	100 mg.mL ⁻¹	200 mg.mL ⁻¹	Crescimento similar ao controle	Crescimento

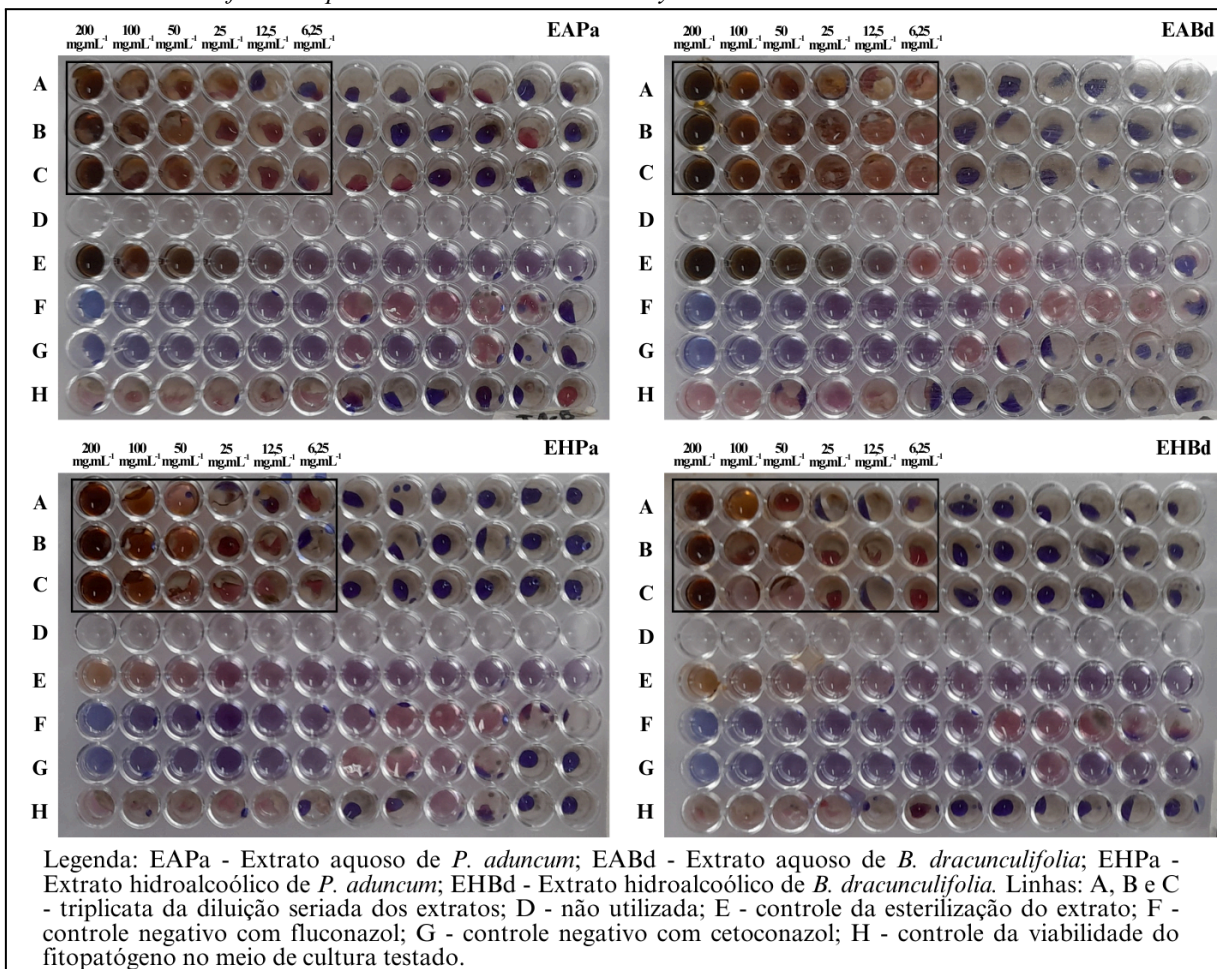
Legenda: EAPa - Extrato aquoso de *P. aduncum*; EABd - Extrato aquoso de *B. dracunculifolia*; EHPa - Extrato hidroalcoólico de *P. aduncum*; EHBd - Extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia*.

Fonte: As autoras (2025).

A observação do teste CIM acontece pela aplicação de resazurina após 48 horas de incubação da placa de Elisa. A resazurina é um composto a base de tetrazólios, utilizado para análises de sensibilidade em bactérias e fungos, onde ao reagir e formar cores arroxeadas, é possível dizer que houve a ausência de metabolismo, ou seja, sem a presença de vida (Chitolina, 2019). Com base nas cores formadas nos poços das placas de Elisa, podemos observar os resultados visualmente em cada concentração dos extratos (Figuras 3 e 4).

Sobre o teste CIM, não houve nenhuma concentração de extrato capaz de inibir o crescimento de *B. cinerea*. Pode-se observar na Figura 3, o desenvolvimento do fungo, principalmente nas colunas com concentrações menores que 6,25 mg.mL⁻¹ (linhas A, B e C). Nestas, foi observado que ao adicionar a resazurina, ela não tocou no meio, uma vez que o fungo se desenvolveu amplamente, formando uma película sobre os poços. Nas concentrações mais altas, mesmo com o desenvolvimento menos evidente, houve a formação de botons. Nota-se que na linhas F e G, controle negativo com fungicida concentrado, houve o crescimento do fungo nas últimas colunas da diluição (1,953 mg.mL⁻¹ para o fluconazol e 3,906 mg.mL⁻¹ para o cetoconazol). Ver figura 3.

Figura 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* testados em *Botrytis cinerea*.



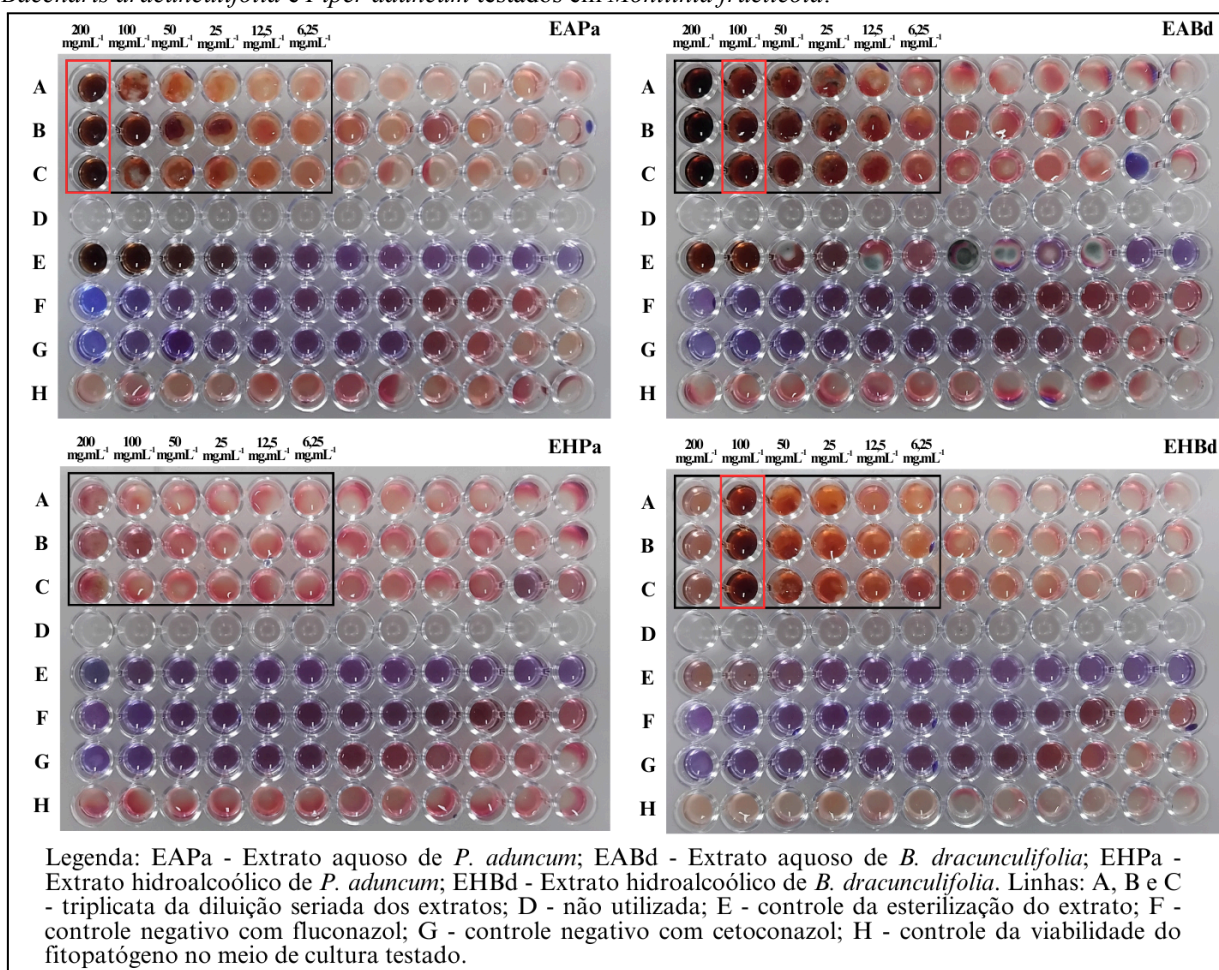
Fonte: As autoras (2025).

Sabe-se que o *B. cinerea* é um dos patógenos mais agressivos e de difícil controle. Em estudos feitos por Shao, Zhao e Ma (2021), *B. cinerea* apresentou resistência a diversas moléculas comerciais de fungicidas como carbendazim, dietonfercarbe, procymidone, pyrimethanil, cyprodinil, azoxystrobin, fludioxonil. Com isso, percebe-se o quão difícil se torna o controle deste patógeno, mesmo com o uso de diversos tipos de fungicidas comerciais.

Mesmo os extratos testados não apresentando capacidade de controle do *B. cinerea*, nota-se visível decrescência em seu desenvolvimento conforme aumenta a concentração dos extratos. Então, infere-se que concentrações mais altas ou outras formas de extração possam contribuir com melhores resultados frente a este patógeno, ou mesmo, no futuro isolando os compostos que afetam seu desenvolvimento. No entanto, vale ressaltar que concentrações mais altas encarecem o produto final, pensando na produção em escala, dificultando o acesso de pequenos produtores.

O teste CIM referente ao fungo *M. fructicola*, apresentou influência dos extrato aquoso de *P. aduncum* (EAPa) (200 mg.mL⁻¹), extrato aquoso de *B. dracunculifolia* (EABd) (100 mg.mL⁻¹) e extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* (EHBd) (100 mg.mL⁻¹). A coluna com retângulo vermelho marca a menor concentração que não apresentou crescimento fúngico visível (boton). Porém, o extrato hidroalcoólico de *P. aduncum* (EHPa) não demonstrou efeito semelhante aos demais extratos, apresentando botons no fundo de todos os micropoços das linhas A, B e C. É importante pontuar, que a coloração do extrato interferiu na coloração final do poço, e neste caso a ausência de boton foi o indicador de crescimento fúngico. Ver Figura 4.

Figura 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* testados em *Monilinia fructicola*.



Fonte: As autoras (2025).

Comparando resultados obtidos com outros estudos realizados com *B. dracunculifolia*, verifica-se que em Fonseca *et al.* (2015), o óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou efeito fungistático, inibindo o crescimento micelial de *Fusarium*

oxysporum, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia minor*, o mesmo quando utilizado em uma concentração maior (3000 mg.L⁻¹), inibiu 100% o crescimento de *R. solani*, *S. rolfsii* e *S. minor*. O extrato etanólico de *B. dracunculifolia* apresentou efeito de inibição em *Escherichia coli* e também em *Staphylococcus aureus* (Piantino, 2004). Observa-se que a utilização de óleos essenciais podem ter um efeito antifúngico maior quando comparados a extratos aquosos e hidroalcoólicos, no entanto, este acaba por elevar o custo de aplicação, muitas vezes não se mostrando viável ao produtor em comparação à outras formas de controle, além de ser necessário um adjuvante para facilitar a aplicação.

A cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico vegetal de (alecrim-do-campo) *B. dracunculifolia*, apresentou diversos compostos, como ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, pinobancsina, canferol, apigenina, isosacuranetina, canferide e artepelin (Alencar *et al*, 2005). Assim, observa-se que o alecrim-do-campo é rico em compostos fenólicos.

Segundo Peres (2004), em fungos, os compostos fenólicos acabam por interferir na síntese de aminoácidos, causando uma reação entre fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, o que leva à formação de ácido chiquímico. Esse processo resulta na produção de triptofano e impede a geração de fenilalanina e tirosina por meio da via do ácido prefênico.

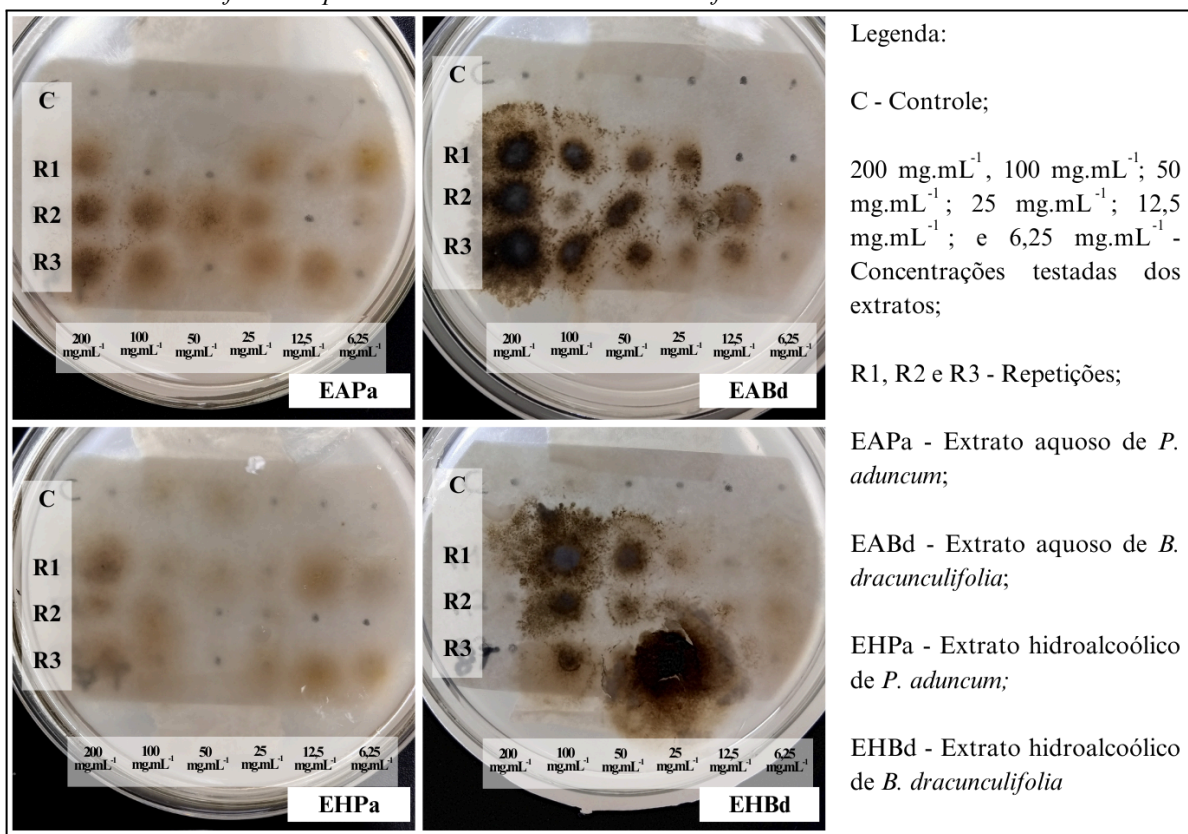
Ao observar as concentrações testadas nota-se que as mais altas foram as que mais obtiveram resultados quanto à influência no crescimento de *M. fructicola*, implicando que extratos mais concentrados tenham efeito quanto à inibição do crescimento desses fitopatógenos. Isso sugere que a concentração dos compostos bioativos nos extratos é fundamental no controle. Além disso, é importante destacar que os resultados obtidos podem variar de acordo com a composição química de cada extrato, indicando que a presença de determinados compostos, como ácidos fenólicos ou flavonoides, possam influenciar os resultados.

Segundo Santos (2023), após análise fitoquímica no extrato etanólico de *Piper aduncum* foi encontrado em sua composição, classes de metabólitos secundários como compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, triterpenos, esteroides e saponinas. Dentre os compostos fenólicos e flavonoides, estão, ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, catequina, ácido p-coumárico, epicatequina, quercetina 3-O-Glicosídeo, kaempferol 3-O-Glicosídeo, luteolina e apigenina.

Em consonância com o teste CIM em *B. cinerea*, a CFM também não foi observada, demonstrando que os extratos testados não tiveram efeito sobre este patógeno.

Com relação ao teste de CFM sobre *M. fructicola*, pode-se observar que não houve uma CFM em relação aos extratos de *P. aduncum*. Porém, nota-se grande estresse do fungo quando submetido a concentrações mais altas de extrato de *B. dracunculifolia*. O estresse é tão elevado que o microrganismo esporula como forma de autodefesa a fim de gerar descendentes. Quando foi ultrapassado o nível de estresse, foi possível observar sobre o extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* (EHBd), na concentração de 200 mg.mL⁻¹, a concentração fungicida mínima. O extrato aquoso de *B. dracunculifolia* (EABd) causou efeito de estresse semelhante, no entanto, não foi encontrada a CFM neste extrato. Ver Figura 5.

Figura 5 - Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* testados em *Monilinia fructicola*.



Fonte: As autoras (2025).

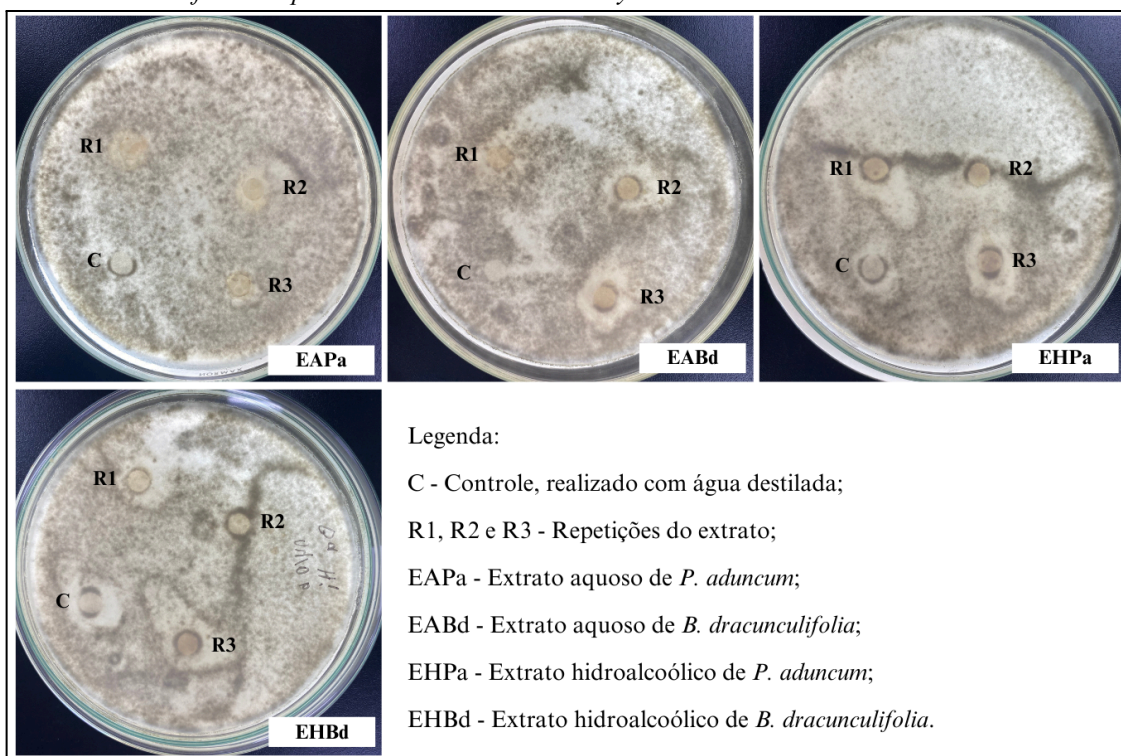
O efeito de estresse pode ser explicado devido aos compostos presentes na planta e também a forma de extração destes compostos. Visto que, a epiderme foliar da *B. dracunculifolia* apresenta grande quantidade de tricomas glandulares espalhados por seu

limbo foliar, que armazenam substâncias, como terpenoides, flavonoides e compostos fenólicos prenilados derivados de ácido cumárico (Bernardes, 2014).

Entre os principais compostos já identificados no óleo essencial de *B. dracunculifolia*, destacam-se os mono e sesquiterpenos, dentre eles, o componente majoritário é o nerolidol (Salazar *et al.*, 2018). Dentre os dez mil compostos fenólicos existentes, alguns são apenas solúveis em solventes orgânicos, existindo também os que são solúveis em água e os que são insolúveis (Taiz; Zeiger, 2009). Muitos grupos de flavonoides possuem atividade antifúngica, inibindo o crescimento de seus esporos (Cushnie; Lamb, 2005), visto que, o grupo hidroxila (OH) presente em compostos secundários, como os flavonoides e fenólicos, ligam-se a receptores enzimáticos de determinados microrganismos, inibindo a síntese de ácidos proteicos, alterando seu metabolismo (Gusmão, 2020).

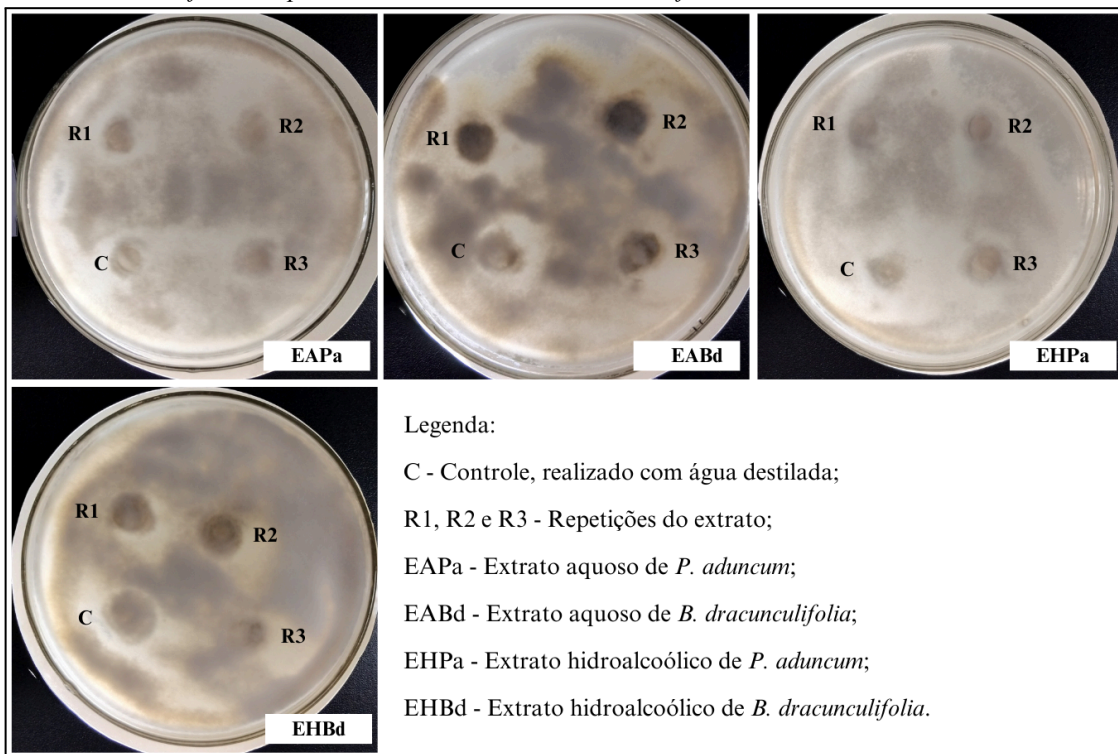
Tendo em vista os resultados obtidos no teste de disco-difusão, pode-se inferir que tanto os extratos aquosos como os extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. aduncum* e *B. dracunculifolia*, não apresentaram atividade antifúngica sobre os fungos *B. cinerea* e *M. fructicola*. Para confirmar a atividade antifúngica, é necessário a presença de halo de inibição. Esse halo é caracterizado como sendo uma área de não crescimento do fungo quando este entra em contato com o extrato, formando um halo ao redor do disco de papel (Figura 6 e 7).

FIGURA 6- Atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* testados em *Botrytis cinerea*.



Fonte: As autoras (2025).

Figura 7 - Atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e *Piper aduncum* testados em *Monilinia fructicola*.



Fonte: As autoras (2025).

Tendo em vista que o EHPa não apresentou ação fungicida quando submetido ao teste de disco-difusão contra o *M. fructicola*, infere-se que este resultado seja devido ao fato de que neste teste o fungo fica apenas em contato pontual, sendo que, no teste CIM, o fungo fica imerso, podendo afetar a eficácia do extrato. Por isso, vale mais estudos sobre este extrato, explorando novas formas de extração

Já no teste de inibição com compostos voláteis dos extratos, não foi observado crescimento diferente do controle.

4. CONCLUSÃO

Os extratos vegetais (EAPa, EABd, EHPa e EHBd) nas condições de extração utilizadas e nas concentrações testadas não apresentaram potencial de controle no fitopatógeno *B. cinerea*. O EHPa, nas condições testadas, também não controla o *M. fructicola*.

O EHBd apresentou potencial de controle para o *M. fructicola*, apresentando capacidade fungicida na concentração de 200 mg.mL⁻¹. No entanto, avaliações de novas

formas de extração, e até mesmo de concentrações são necessárias, uma vez que em testes de diferentes submissões do fungo ao extrato, o controle não ocorreu.

Para extratos aquosos EAPa e EABd testados no *M. fructicola*, houve efeito fungistático quando o fungo ficou imerso no extrato (CIM), mostrando que as plantas podem ser estudadas, mas considerando novas formas de obtenção dos compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S. M. D. *et al.* **Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais.** Campinas-SP. ISSN 0103-8478. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, p. 909-915, 2005.

BACK, T. F. **Redução de crescimento micelial *in vitro* no controle de *Monilinia fructicola* (Wint) Honey.** 2021. p. 36. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) - Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo-RS, 2021.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia brasileira**, Marituba-PA, v. 29, n. 5, p. 555-557, outubro de 2004.

BERNARDES, C. T. V. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Pinus elliottii* Engelm.** 2014. p. 71. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2014.

BERNARDI, C. **Caracterização química e potencial biotecnológico do extrato de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) no tratamento de sementes.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

BONA, E. A. M. D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONETT, L. P. *et al.* Óleo de *Baccharis dracunculifolia* DC. e seu efeito *in vitro* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Cultivando o Saber**, Cascavel-PR, v. 3, p. 24-36, 2010.

BONETT, L. P.; CERRI, C. S. Fungitoxicidade do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (DC.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.). **Iniciação Científica CESUMAR**, Paraná, v. 13, p. 103-110, dez. 2011.

CHITOLINA, G. M. **Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa.** 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-18052020-143352/pt-br.php>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2025.

CHEN, P.; CHEN, R.; CHOU, J. Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. **Microbiology**, p. 33-46, v. 46, (2018)

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DEAN, R. *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DE SOUZA, D. C. **Progresso temporal e padrão espacial de epidemias da podridão parda do pessegueiro**. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP, 2006.

DILKIN, E. R. S. *et al.* Fungitoxic effect and phytochemical characteristics of Brazilian Cerrado weeds against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* fungi. **Brazilian Journal of Biology**, Campo Grande-MS, v. 84, p. 1–8, abr. 2022.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2003. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cultivos-criacoes-e-sistemas-de-producao>>. Acesso em: 23 de março de 2024.

GOTARDO, R. *et al.* Distribuição espacial e temporal das chuvas no estado de Santa Catarina. **Geosul**, v. 33, n. 67, p. 253–276, 2018.

GUSMÃO, D. E. **Uso de extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. como método alternativo no controle de fungos fitopatogênicos**. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Produção e Gestão Agroindustrial. Campo Grande - MS. 2020.

FAZOLIN, M. *et al.* Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): Características Gerais e Resultados de Pesquisa. Rio Branco-AC: **Embrapa**, 2006.

FONSECA, M. C. M. *et al.* **Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

FONTANA, D. C. *et al.* **Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pessegueiro**. Revista Cultivando o Saber, v. 10 2017.

FOSSÁ, J. L. Alterações na agricultura familiar de Santa Catarina a partir do PRONAF. **Rev. Econ. NE**, Fortaleza, v. 53, n. 1, p. 168-185, jan./mar., 2022.

HONG, C. X.; MICHAELIDES, T. J. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest Brown rot of stone fruit. **Plant Disease**, v.82, n.11. p. 1210 – 1216, nov. 1998.

DE MIO, L. L. M. *et al.* Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical plant pathology**, Curitiba-PR, v. 33, n. 3, p. 227–234, jun. 2008.

MAHMOUD, M. *et al.* Understanding bud rot development, caused by *Botrytis cinerea*, on cannabis (*Cannabis sativa* L.) plants grown under greenhouse conditions. **Botany**, v. 101, n. 7, p. 200–231, 2023.

MIRANDA, A. C. *et al.* Neoliberalism, pesticide consumption and food sovereignty crisis in Brazil. **Cien Saude Colet**. v.12, n.1, p. 7-14, 2007.

MORAIS, V. P. **Extratos ativos de *Piper aduncum* L., sobre os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Barry, *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) sacc. e *Rhizopus***

stolonifer (ehrenb. fr.) vuill., teste *in vitro* e *in vivo* em soja. 2023. p. 97. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2023.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A. **Manejo Integrado do Mofo Cinzento, Causado por *Botrytis cinerea***. Maio, 2005. Embrapa. Jaguariúna, SP, 2005.

NASCIMENTO, F. V. **Controle alternativo de podridão parda em pêssegos na pós-colheita**. 2013. p. 58. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia, Ênfase em Fitopatologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2013.

NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 15-23, 2014.

OLIVEIRA, B.R., PENETRA, A., CARDOSO, V.V. *et al.* Biodegradation of pesticides using fungi species found in the aquatic environment. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p. 11781–1179, 2015.

OLIVEIRA, C.A. *et al.* Efeito de variáveis ambientais, épocas e métodos de plantio na intensidade da seca da haste (*Botrytis cinerea*) em *Hibiscus sabdariffa*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.2, p.101-106, 2011.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário das plantas**. Escola Superior de Agricultura. 2004.

RASEIRA, A. *et al.* A cultura do pêssego. Brasília-DF: **EMBRAPA**, 1993.

PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Campinas – São Paulo, 2008.

ROZWALKA, L. C.; *et al.* 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.

SALAZAR, G. J. T. *et al.* Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial crops and products**, v. 122, p. 591–595, 2018.

SANTOS, N. D. C. L. **Investigação fitoquímica, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico de *Piper aduncum* *in vitro***. Campo Grande - MT. Tese apresentada para obtenção do título de Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2023

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E, D. S.. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. p. 129-137, **Floresta**, v. 30, n. 12, 2000.

SHAO, W.; ZHAO, Y.; MA, Z. Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. **Phytopathology**, v. 111, n. 3, p. 455-463, 2021. DOI: 10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. ed. 4ª. Porto Alegre-RS: Artmed, 2009, p. 343–373.

TIMBE, P. P. R. **Atividade antimicrobiana de *Baccharis dracunculifolia* DC (Alecrim-do-campo) combinado com nisina e nanoencapsulado**. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2019.

VALADARES, A. C. F. *et al.* Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Campus Rio Verde-GO, v. 90, n. 3, p. 2691–2699, 2018.

WELTER, T. M. **Emulsão de óleo essencial de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) no controle de doenças e indução de resistência em tomateiro**. TCC (Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia) - Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Laranjeiras do Sul-PR, 2022.

ZHAO, X. *et al.* Genetic structure and pyrimethanil resistance of *Botrytis spp.* causing gray mold on strawberry from greenhouses in Zhejiang, China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 205, p. 106128–106128, 13 set. 2024.

**APÊNDICE A - Confirmação de que a espécie isolada se tratava de *B. cinerea*.
Procedimento realizado pelo laboratório Agrônômica.**

 <small>Part of the Colson Group</small>	<p style="text-align: center;">AGRONÔMICA – LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO E CONSULTORIA NIRE 43.205.056.551 CNPJ 05.554.224/0001-69 www.agronomicabr.com.br</p> <p style="text-align: center;">FORMULÁRIO – FOR0126 – Laudo de Sanidade Vegetal</p>									
Revisão nº 09, em vigor desde 05/06/2023 Página 1 de 1										
Laudo de Sanidade Vegetal 10216/2024-AGR										
Data Coleta: 06/06/2024	Recebimento: 02/07/2024	Resultado: 15/08/2024								
INTERESSADO:	Francieli Lima Cardoso, Vinte dois de Abril ,2440, São Miguel do Oeste, SC, Brasil, 89900-000, (49) 98403-046									
AMOSTRADO POR:	Larissa Suelen Dietrich Degani									
NATUREZA DA ANÁLISE:	Planta: Fungo acondicionado em frasco plástico (<i>Fungo acondicionado em frasco plástico</i>) Variedade/Cultivar: 729/2024 Lote: Botrytis sp. Parte Coletada: Fungo Medida: 1 Placa(s) Lacre: SEM LACRE									
MATERIAL:	Representatividade da amostra: 1 Classe/Marca/Safra: 06/06/2024 Protocolo: 221953/2024-AGR Número Amostra: 18735 Descrição: Termo: Termo de Coleta; Número Termo: NI; Brasil									
ORIGEM:										
DESTINO:										
ANÁLISE:	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><thead><tr><th>Praga</th><th>Laboratório</th><th>Método</th><th>Procedimento</th></tr></thead><tbody><tr><td>Fungo</td><td>Micologia</td><td>Biológica/Molecular</td><td>POP0021</td></tr></tbody></table>		Praga	Laboratório	Método	Procedimento	Fungo	Micologia	Biológica/Molecular	POP0021
Praga	Laboratório	Método	Procedimento							
Fungo	Micologia	Biológica/Molecular	POP0021							
	Baseado nos resultados das análises o material descrito acima indicou a presença da(s) praga(s) descrita(s) abaixo:									
RESULTADO:	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><thead><tr><th>Praga</th><th>Identificação</th><th>Incidência/Quantidade</th><th>Status</th></tr></thead><tbody><tr><td>Fungo</td><td><i>Botrytis cinerea</i> (= <i>Botryotinia fuckeliana</i>)</td><td></td><td></td></tr></tbody></table>		Praga	Identificação	Incidência/Quantidade	Status	Fungo	<i>Botrytis cinerea</i> (= <i>Botryotinia fuckeliana</i>)		
Praga	Identificação	Incidência/Quantidade	Status							
Fungo	<i>Botrytis cinerea</i> (= <i>Botryotinia fuckeliana</i>)									
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:	Período de realização das análises: 22/07/2024 à 15/08/2024.									
DIAGNOSTICADO POR:	Sra. Luana de Andrade Pereira									
NOTAS:	1 – A identificação da amostra é de exclusiva responsabilidade do requerente 2 – A presente análise tem seu valor restrito à amostra acima identificada 3 – NI - Não Informado 4 – O relatório de ensaio não pode ser reproduzido sem a aprovação do laboratório, exceto se for reproduzido na íntegra. <p style="text-align: right;">Porto Alegre, 15 de agosto de 2024.</p>									
	Documento eletrônico assinado digitalmente por Priscila Silva da Costa Ferreira Gomes, Responsável Técnica , em Porto Alegre no dia 15/08/2024 , às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com validade jurídica assegurada conforme MP 2.200-2/2001, que instituiu a ICP-Brasil.									
<small>Avenida Ipiranga, 7464/Q 1202, Bairro Jardim Botânico, CEP 91530-000, Porto Alegre, RS, Fone: (51) 2131-6262, Site: www.agronomicabr.com.br; Razão Social: Agrônômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário LTDA</small>										
<small>*Credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, através da Portaria SDA Nº 709, de 13 de dezembro de 2022, publicada no D.O.U. nº 238, seção 1 de 20 de dezembro de 2022, como Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário para análise de identificação de fungos, oomicetos, procariontos, vírus, viróides, nematoides, insetos, ácaros e sementes de espécies invasoras em plantas e sub-produtos vegetais.</small>										

**APÊNDICE B - Confirmação de que a espécie isolada se tratava de *M. fruticola*.
Procedimento realizado pelo laboratório Agrônômica.**

Agrônômica
Laboratório de Diagnóstico
Fitossanitário e Consultoria

FOR 281 RELATÓRIO FINAL - PROJETOS

Revisão nº 01, em vigor desde 08/04/2020

Página 3 de 5

fruticola previamente depositadas no Genbank, também foram acrescentadas às análises (Fischer et al., 2017).

Resultados

Caracterização molecular e filogenética

Na análise filogenética, utilizando a Máxima Verossimilhança, o isolado agrupou-se com isolados referências de *Monilinia fruticola* (Anexos 1 e 2).

Anexo 3. Sequência das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS), 5.8S rDNA e partes de 18S e 28S rDNA.

>Amostra 26609

```
CTTGTGTAATTACTTTTGTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCTTGTATGCTCGCCAGAGGATAAATTAACCTCTTTTATTAA  
TGTCGCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCAT  
GCCTGTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGC  
GGCGCCGTGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGTTCTCAGTGTGCTTCTGCC
```

Anexo 4. Sequência do gene fator de alongação 1-alfa (TEF)

```
GAGAAGGTGAGAAATTTTCTTTTATCCTTTGTCGTATGGGTTGGTACTCAACAATACCCAATCTTATCGCGCTCT  
ACCCCTCGGTGGGGCAAAAACCTTGCCCATTTCACTGGCACATATCGTTGTTGCATCCAGACTTTTATGTTTGACGCAACGA  
TCACATCTGCGAGTGGTGCATACCGACACGGATACATCTTCATCAACTCAACAGCCACTGACATCCATGATAGGAAGCCGCC  
GAACTCGAAAGGGTTCTTTCAAGTACGCATGGGTTTGGACAAGCTCAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATCGACA  
TTGCTCTGGAAGTTCGAGACACCAAAGTACTATGTTACCGTCAATGGTAAAGTGGTTCACATCCCTTCACAGTATATAACAAT  
ATCCTAACAATAACCCTAGATGCCCTGGACATCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACT
```

Anexo 5. Sequência do gene RNA polymerase II second largest subunit (RPB2)

```
TGACAGATATACTTTTCGCATCAACACTCTCTCATTTGCGCCGAACCAATACACCCATTGGACGTGATGGAAAGATTGCCAAGC  
CTAGACAATTGCAACAACACTCATTGGGGTTGGTATGTCCGGCAGAGACGCCGAAGGACAAGCTTGGCGCTTGGTCAAGAA  
TTTGGCTTTGATGTGTTACGTTACAGTTGGTACGCCAAGTGATCTATCGTTGAGTTTATGATTACAGCGAAACATGGAAGTGCT  
GGAGGAGTATGAACCGCTTCGAGCGCCCAATGCGACAAGGTTTGTCAATGGTGTGGGTTGGTATTCATCGAGATCCCG  
CCCATTGGTTAAATGTGTACAAGACCTTCGTAGATCGCACTTGATTTCTCATGAAGTCTCACTTATTCGAGAAATTCGAGACA  
GAGAATTCAAGATTTTCACTGACGCAGGACGGGTGTGACAGCTCTGTTGGTATCGACAATGATCCCGACAGCGCTAACAA  
AGGTAACCTGGTATTGAACAAAGATCATATTCCCGTTGGAGGATGATCAGTCGCTACCAGCAAACATGGATCCTGCAGAA  
CGAGTACATCAAGGATATTATGGATTCCAAGGTTTGGATTAATGATGGTGTGGTCAATATCTGGACGCTGAGGAAGAAGAGA  
CTGTATGATTACCATGACCCCTGAAGATCTGGACATTTCTCGACAACCTCAGGCTGGTATCAAATTCGCCGACGAAAGT  
GGTGAATTAATAAGCGTGTCAAGGCACCTATCAATCCTACTGCTCATATATGGACTCATTGTGAAATTCATCAAGTATGAT  
TCTTGGTATCTGTGCAAGCATATCCCTTCCCTGATCATAACCAGGTAAGCTTTGAATCCGAGAATGAATTGGTCAACTTATG  
GCTAAT
```