IV CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAgro 2019

FORMULAÇÃO FUNGICIDA NATURAL À BASE DE EXTRATO DE *Azadirachta indica* PARA USO COMO DEFENSIVO AGRÍCOLA

FORMULACIÓN DE FUNGICIDAS NATURALES CON EXTRACTO DE *Azadirachta indica* PARA USO COMO DEFENSA AGRÍCOLA

NATURAL FUNGICIDE FORMULATION FROM *Azadirachta indica* EXTRACT FOR USE AS AGRICULTURAL DEFENSIVE

Apresentação: Comunicação Oral

Ana Lúcia Eufrázio Romão¹; Katiany do Vale Abreu²; Elini Alves Oliveira de Sousa³
Aristides Pavani Filho⁴; Carlucio Roberto Alves⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IVCOINTERPDVAgro.2019.0062>

Resumo

Crescem as pesquisas voltadas para aplicação de metabólitos secundários de plantas no manejo integrado de pragas, já que o uso destas substâncias pode reduzir os custos de produção da lavoura, bem como diminuir os riscos ambientais e a dependência dos inseticidas sintéticos. Contudo, os métodos mais utilizados no controle dos insetos-pragas ainda se encontram baseados na utilização de inseticidas sintéticos, que apresentam altos riscos de toxicidade e contaminação ambiental, além de custo elevado. Um fitopatógeno importante para agricultura é o fungo *L. theobromae*, que é um microrganismo bastante agressivo capaz de infectar várias espécies de plantas e seus diferentes órgãos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver formulações fungicidas capazes de inibir o crescimento do fungo *L. theobromae*. Foram desenvolvidas formulação a base de extrato de neem (*Azadirachta indica*) com a adição de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*), cravo (*Syzygium aromaticum* [L]) e citronela (*Cymbopogon nardus*). As formulações desenvolvidas foram utilizadas em testes de controle do crescimento do fungo *in vitro*. Na avaliação da atividade antifúngica empregou-se a determinação do percentual de crescimento micelial (PIC), realizada conforme metodologia descrita por Menten, (1976). Também foi avaliada a toxicidade aguda das formulações a partir

¹ Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará anaeufrazio@yahoo.com.br

² Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, katianeabreu@yahoo.com.br

³ Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, eliniaos@hotmail.com

⁴ Ms. em Engenharia Elétrica, Ministério da Ciência, Tecnologia, Informação e Comunicação, aristides.pavani@mctic.gov.br

⁵ Pós-Doctor, Universidade Estadual do Ceará, carlucio.alves@uece.br

da determinação da DL₅₀ (Dose Letal 50%). A partir deste estudo foi possível inferir que as formulações obtidas a partir o extrato etanólico em associação com os óleos de cravo e eucalipto apresentam forte atividade fungicida. Os produtos elaborados foram eficientes na inibição do crescimento do fungo em até 100%, indicando que os óleos essenciais atuam em sinergia com o extrato no combate ao fungo *L. theobromae*. Além disso, foi possível verificar que, assim como os óleos essenciais puros e o extrato bruto, as formulações apresentam baixa toxicidade.

Palavras-Chave: óleo essencial, cravo, eucalipto, *Azadiracta indica*, *L. theobromae*,

Resumen

La investigación sobre la aplicación de metabolitos secundarios de plantas en el manejo integrado de plagas está aumentando, ya que el uso de estas sustancias puede reducir los costos de producción de cultivos, así como reducir los riesgos ambientales y la dependencia de los insecticidas sintéticos. Sin embargo, los métodos más utilizados para el control de plagas de insectos todavía se basan en el uso de insecticidas sintéticos, que presentan altos riesgos de toxicidad y contaminación ambiental, así como un alto costo. Un fitopatógeno importante para la agricultura es el hongo *L. theobromae*, que es un microorganismo muy agresivo capaz de infectar varias especies de plantas y sus diferentes órganos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar formulaciones fungicidas capaces de inhibir el crecimiento del hongo *L. theobromae*. La formulación del extracto de Neem (*Azadiracta indica*) se desarrolló con la adición de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*), clavo (*Szigium aromaticum* [L]) y citronela (*Cymbopogon nardus*). La evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica se usó para determinar el porcentaje de crecimiento micelial (PIC), llevado a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Menten (1976). La toxicidad aguda de las formulaciones también se evaluó determinando la DL₅₀ (Dosis letal 50%). De este estudio fue posible inferir que las formulaciones obtenidas del extracto etanólico en asociación con los aceites de clavo y eucalipto tienen fuertes actividades fungicidas. Los productos elaborados fueron eficaces para inhibir el crecimiento del hongo en hasta 100 %, lo que indica que los aceites esenciales actúan sinérgicamente con el extracto para combatir el hongo *L. theobromae*. Por lo tanto, fue posible verificar que, además de los aceites esenciales puros y el extracto crudo, las formulaciones tienen baja toxicidad.

Palabras Clave: aceite esencial, clavo, eucalipto, *Azadiracta indica*, *L. theobromae*.

Abstract

Research on the application of plant secondary metabolites in integrated pest management is increasing, as the use of these substances can reduce crop production costs, as well as reduce environmental risks and dependence on synthetic insecticides. However, the most widely used methods for insect pest control are still based on the use of synthetic insecticides, which present high risks of toxicity and environmental contamination, as well as high cost. An important phytopathogen for agriculture is the fungus *L. theobromae*, which is a very aggressive microorganism capable of infecting various plant species and their different organs. The objective of the present work was to develop fungicidal formulations capable of inhibiting the growth of the fungus *L. theobromae*. Neem extract (*Azadiracta indica*) formulation was

developed with the addition of eucalyptus (*Eucalyptus staigeriana*), clove (*Syzygium aromaticum* [L]) and citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil. *In vitro* evaluation of antifungal activity was used to determine the percentage of mycelial growth (PIC), carried out according to the methodology described by Menten, 1976. The acute toxicity of the formulations was also assessed by determining the LD₅₀ (Lethal Dose 50%) From this study it was possible to infer that the formulations obtained from the ethanolic extract in association with clove and eucalyptus oils have strong fungicidal activities. %, indicating that the essential oils act synergistically with the extract to combat the fungus *L. theobromae*. Therefore, it was possible to verify that, as well as pure essential oils and crude extract, the formulations have low toxicity.

Keywords: essential oil, clove, eucalyptus, *Azadirachta indica*, *L. theobromae*

Introdução

Crescem as pesquisas voltadas para aplicação de metabólitos secundários de plantas no manejo integrado de pragas, já que o uso destas substâncias pode reduzir os custos de produção da lavoura, bem como diminuir os riscos ambientais e a dependência dos inseticidas sintéticos. Além disso, o interesse crescente por fitotoxinas deve-se a ampla gama de novos sítios de ação nos organismos alvo. Muito embora o uso desses fitoquímicos não seja viável economicamente, é possível usá-los como modelos moleculares para realização de síntese de moléculas semelhantes e que tenham a mesma atividade. Atualmente, são várias as pesquisas envolvendo plantas inseticidas no controle de praga. Contudo, os métodos mais utilizados no controle dos insetos-pragas ainda se encontram baseados na utilização de inseticidas sintéticos, que apresentam altos riscos de toxicidade e contaminação ambiental, além de custo elevado (RUFINO; ARAÚJO; NOGUEIRA, 2018; TAGLIARI *et al.*, 2010).

Dentre os produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais podemos destacar os óleos essenciais (OE's), cuja a demanda está em franca ascensão nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Estes produtos se tornaram alvos de destaque nas pesquisas em decorrência do elevado potencial farmacológico já comprovado, a complexa variabilidade química, serem economicamente viáveis, estarem presentes nos diversos órgãos da planta e por serem de fácil extração. Essa classe de compostos possui odor intenso e, na planta, tem atividade de proteção contra patógenos, na atração de polinizadores e podem ser encontrados em folhas, flores, frutos e até mesmo raízes de plantas aromáticas (BATISTA; BARROS, 2018).

Os OE's são metabólitos secundários voláteis, cujos principais compostos encontrados são mono e sesquiterpenos e difenilpropanoides, cujas estruturas são baseadas na molécula de isopreno. São compostos voláteis que fornecem a essência da planta, sendo responsáveis pelo sabor e aroma de especiarias. A extração desses compostos pode ser realizada através da técnica

de arraste a vapor, hidrodestilação e também através de prensagem. Essa classe de metabólito é bastante utilizada em perfumaria (como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias), cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, comercializados *in natura* ou beneficiado, podendo fornecer substâncias isoladas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (CLAYTON *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2006).

Pesquisas sobre o manejo e tipos de uso dos recursos vegetais, em particular os relacionados às plantas medicinais e seus compostos bioativos, considerando o conhecimento empírico sobre a terapêutica de diferentes doenças, têm propiciado importantes descobertas científicas. Particularmente, o Brasil é detentor de uma vasta diversidade cultural e biológica e o que permite inferir que o potencial de descoberta e exploração de compostos bioativos é bastante expressivo.

Fundamentação Teórica

A. indica é uma espécie que ficou conhecida mundialmente como planta medicinal e por apresentar elevado potencial pesticida. Em inglês, é conhecida como “Lilac indiano”, “neem tree” ou “margosa”; é conhecida também por *Melia azadirachta* e *Melia indica* (A. Juss). Os nomes vernaculares são “neem” ou “nim” (Hindi, Urdu), “neeb” (árabe), “azad dirakht” (persa) e “Nimba” (sânscrito). Esta espécie é indígena da Ásia, mais precisamente do subcontinente indo-paquistão, e pertence à família *Meliaceae*. No Brasil é uma espécie exótica (MORO; WESTERKAMP, 2011).

Neem é uma planta originária de uma região entre a Índia e a Birmânia pertencente à família das *meliaceae* (ZHU *et al.*, 2017). Sua versatilidade enquanto planta medicinal a tornou importante mundialmente (DALLAQUA *et al.*, 2013). Esta espécie é utilizada na medicina tradicional indiana há mais de 2000 anos devido às suas atividades anti-inflamatórias, anti-úlceras, anti-maláricas, antibacterianas e antioxidantes (KURIMOTO *et al.*, 2014). Nos países onde é cultivada, existem estudos relatando que suas preparações são eficazes contra micose e problemas de pele, incluindo dermatite eczema, acne e infecções fúngicas (BHOWMIK *et al.*, 2011), cataplasmas ou decocções foliares são usados contra furúnculos e o óleo é usado para curar doenças de pele, como escrófula e úlceras indolentes (KUMAR; MEHTA; PATHAK, 2018).

Dentre as espécies medicinais que produzem óleos essenciais (OE's) podemos destacar as do gênero *Eucalyptus*, cultivadas em larga escala mundial. Somente no Brasil são conhecidas

aproximadamente 400 espécies que são beneficiadas para a produção de celulose a partir do caule e das folhas são extraídos os OE's. Os extratos das folhas são usados como aditivos alimentares e/ou em formulações cosméticas. Algumas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular como antisséptico e contra infecções do trato respiratório superior, em gripes, resfriados e congestão nasal. Relatos na literatura descrevem relevantes resultados referentes à atividade antimicrobiana. Sendo o OE efetivo no controle biológico de pragas na agricultura em decorrência de suas atividades antimicrobianas, acaricida, nematocida, herbicida e repelente de insetos. Na farmacologia, pode ser utilizado como antisséptico, antifúngico, antibacteriano, expectorante e no combate as células que provocam leucemia (CARVALHO *et al.*, 2010).

As espécies *E. citriodora*, principal espécie comercializada (contém cerca de 80% de citronelal), *E. staigeriana*, rico em acetato de geranila (contem entre 60 a 70%) e *Eucalyptus macarthuri* são fontes de óleos essenciais destinados, principalmente à perfumaria. De acordo com análise por cromatografia gasosa o óleo essencial de *E. staigeriana* é composto por 26 substâncias diferentes. Dentre os constituintes do óleo que possuem efeitos inseticidas são conhecidos o citral, alfa-pineno e beta-pineno, terpineno e terpineol e ainda o dl-limoneno. Nenhum gênero foi tão largamente plantado no mundo como o *Eucalyptus*. Dados estimados revelam que dos seis milhões de hectares plantados mundialmente a metade está sendo cultivada no Brasil, o que pode representar mais da metade de toda a área reflorestada do país. Contudo, das mais de 600 espécies e variedades de *Eucalyptus* existentes, somente vinte têm sido exploradas comercialmente e menos de doze têm importância econômica no mercado mundial de óleos essenciais (CHAGAS *et al.*, 2002).

Nas espécies os óleos encontram-se primordialmente nas folhas, são produzidos e armazenados por suas glândulas e distribuído de forma abundante no parênquima. Os OE's de eucalipto constituem uma complexa mistura de compostos orgânicos voláteis, entre 50 e até 100 moléculas diferentes. Entre elas, podem ser encontrados compostos químicos como: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Contudo, são mais comuns os terpenos mais complexos, como o citronelal e o cineol. Ainda estão presentes na essência na porcentagem que pode varia de 20 a 30 % os α -pineno, piperitona, felandreno, butiraldeído, hexanal (SILVEIRA *et al.*, 2012).

Outra fonte de OE é o *Szigium aromaticum* [L], esta espécie pertence à família *Myrtaceae*, que é composta por aproximadamente 100 gêneros e três mil espécies, todas tropicais ou subtropicais. *Myrtaceae* é a maior família da ordem, é cosmopolita, muito embora tenha dois

centros de dispersão nas Américas e na Austrália. No Brasil há aproximadamente mil espécies e todos os representantes nativos pertencem à subfamília *Myrtoideae* (BOLIVAR; ROJAS; GARCIA-LUGO, 2014).

O *Szgium aromaticum* L., conhecido popularmente como craveiro da Índia pertence à família das *mirtáceas* (*Myrtaceae*), porém, também já foi classificado como *Eugenia caryophyllus*, *Caryophyllus aromaticus* L., *Eugenia caryophyllata* e *Eugenia aromática* L. Os principais produtos derivados do cravo da Índia disponíveis no mercado nacional hoje em dia são o OE puro ou produtos derivados dele, cuja principal aplicação é como anestésico local em odontologia, e o próprio botão floral seco que é usado como tempero (AFFONSO *et al.*, 2012).

Análises cromatográficas realizadas por Costa e colaboradores (2005), a partir de folhas de *S. aromaticum*, revelaram que seu OE é composto majoritariamente de mono e sesquiterpenóides, apresentando como principal constituinte o eugenol, que na amostra avaliada alcançava aproximadamente 80% do volume total. Os autores apontam ser este o constituinte que, sozinho ou em atividade sinérgica, possui bioatividade. Além deste, também verificaram a presença de β -cariofileno, na proporção de 5,4%, acetil eugenol 3,7% e metil eugenol 1,8%, dentre outros constituintes em menores proporções.

Outra planta produtora de óleo essencial é o *Cymbopogon nardus*, conhecido popularmente como capim citronela. O seu cultivo tem crescido bastante no Brasil, já que o óleo essencial é empregado como repelente (HIRATA, 2018). Os constituintes primordiais no óleo essencial de citronela são os monoterpenos citronelal (34,61%), seguido de geraniol (23,18%) e citronelol (12,10%). Os constituintes e o percentual dos constituintes presente em uma mesma espécie dependem da origem da planta, da parte e do estágio de desenvolvimento da planta utilizada, bem como, das condições de crescimento e climáticas, como temperatura, solo e adubação e as condições de destilação e estocagem (OLIVEIRA, 2011).

O fungo *L. theobromae* é um microrganismo bastante agressivo capaz de infectar várias espécies de plantas e seus diferentes órgãos. A infestação da planta com o fungo (Fig. 3) pode provocar o cancro em raízes, caules e ramos, causar lesões em folhas, sementes, estacas e frutos e, em muitos casos, pode provocar a morte de mudas e enxerto ou a morte descendente, doença popularmente conhecida como a podridão seca ou “*dry-back*” em inglês. Essa espécie de patógeno está bem adaptada ao clima do semiárido brasileiro, principalmente, às áreas irrigadas e atua infestando culturas como a mangueira, videira, goiabeira, laranjeira, coqueiro, tamareira, abacateiro, dentre outros. Contudo, o fungo *L. theobromae* é uma espécie cosmopolita,

encontram-se catalogados mais de 500 hospedeiros em regiões tropicais e temperadas (FREIRE, 2004; PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017).

Metodologia

A presente pesquisa, de caráter qualitativo foi desenvolvida no Sistema de Laboratórios em Nanotecnologia e Biomateriais da Universidade Estadual do Ceará.

A Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE) aprovou as experimentações utilizando o zebrafish como modelo animal no decorrer da presente pesquisa, tendo sido registrada sob o nº 3915755/2018. Os modelos animais utilizados foram mantidos e acondicionados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

As amostras para produção do extrato etanólico de neem foram coletadas de plantas adultas com idade aproximada de 5 anos, no Campus da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil (03° 43' 02'' S and 38° 32' 35'' W). O espécime vegetal foi identificado por Luiz Wilson Lima-Verde, no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará em 13/03/2018, sendo o depósito de exsicata registrado com o número 61196.

Obtenção dos óleos essenciais e produção do extrato

O extrato etanólico foi obtido a partir de 200 g de raízes previamente lavadas em água corrente e seca em estufa a temperatura de 40°C. O material vegetal triturado permaneceu imerso em 1 L de EtOH-H₂O (75:25, v/v) durante sete dias, à temperatura ambiente, com agitação ocasional e abrigado da luz. O extrato foi filtrado em papel de filtro e solvente evaporado até a secura em rotaevaporador, resultando em 1,2 g de extrato bruto.

Os óleos essenciais utilizados nas formulações utilizadas no presente estudo, *Eucalyptus staigeriana*, *Sigillum aromaticum* [L] e *Cymbopogon nardus* foram adquiridos em comércio especializados e produzidos pela BioEssência® (Anvisa MS 2.048.81.6).

Avaliação da atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica, as formulações foram obtidas a partir da solubilização de 1,4 mg de extrato para 1 mL de água. Em seguida, foram preparadas emulsões

a partir da solubilização dos óleos essenciais nas concentrações de 5%, 10% e 15% (m/v em relação ao extrato). O emulscionamento foi facilitado pela adição de dimetilsufóxido (DMSO) ao óleo na proporção de 5%. Obtendo-se dessa forma, formulações nas concentrações de 1400 mg/L de extrato emulsionado em 5%, 10% e 15% de óleos essenciais em relação ao extrato.

A determinação do percentual de crescimento micelial (PIC) foi realizada conforme metodologia descrita por Menten, 1976. O extrato foi adicionado ao meio Agar Potato Dextrose fundente e vertido em placa de Petri. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração de constituintes/fungo. No centro de cada placa teste foi depositado um disco de micélio medindo 7 mm de diâmetro. Os discos inoculados nas placas teste foram retirados das bordas da colônia de fungos cultivados em etapa anterior. Em seguida os organismos foram incubados por até 72 horas à temperatura constante de 25 °C. Para efeito comparativo da atividade fungicida dos extratos utiliza-se como testemunha uma placa de Petri inoculada com o fungo sem a adição dos produtos teste. Determinou-se o diâmetro médio das colônias (em milímetros) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

Avaliação das toxicidades

Para a avaliação das toxicidades, as formulações foram obtidas a partir da solubilização de 2,0, mg, 1,0 mg e 0,5 mg de extrato para 1 mL de água. Em seguida, foram preparadas emulsões a partir da solubilização dos óleos essenciais nas concentrações de 15% (m/v em relação ao extrato). O emulscionamento foi facilitado pela adição de dimetilsufóxido (DMSO) ao óleo na proporção de 5%. Obtendo-se dessa forma, formulações nas concentrações de 500, 1000 e 2000 mg/L de extrato emulsionado em 15% de óleos essenciais.

Para cada concentração avaliada foram utilizados grupos de seis espécimes selvagens e adultos de *Danio rerio* (zebrafish), idade entre 60 a 90 dias ($4,0 \pm 0,1$ g). A avaliação da toxicidade seguiu o método de imersão, no qual os animais são colocados submersos nas soluções avaliadas. Como controle negativo um grupo de animais foi monitorado em aquário contendo somente água potável (EKAMBARAM; PERUMAL; PAVADAI, 2017). Após 24, 48 e 72 h, foram contabilizados os números de animais mortos e realizada a análise estatística pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* com intervalos de confiança de 95%, estimando-se a dose letal que promove a morte de 50% (DL₅₀) dos modelos utilizados.

Resultados e Discussão

Conforme é possível observar, a partir dos resultados apresentados nas Tabelas 1. e através das fotografias correlacionadas, os ensaios revelam formulações com elevadas atividades fungicidas, principalmente se comparado ao extrato etanólico bruto.

Tabela 1- Determinação do percentual de inibição promovido pelas formulações e pelo extrato bruto frente ao fungo *L. thebromae*.

Percentual de inibição do fungo (%)				
Formulação	C5	C10	C15	Test
Extrato + citronela	17,2	20,5	22,3	NI
Extrato + cravo	100	100	100	NI
Extrato etanólico	31,45	34,23	39,82	NI

* C5 = 5%, C10 = 10% e C15 = 15% para as 3 primeiras linhas

C5 = 800ppm, C10 = 1100ppm e C15 = 1400 ppm para a última linha

Atividade antifúngica com o extrato etanólico da raiz do neem

Diversos autores relataram o potencial antifúngico do neem. Wang, Cao e Jiang (2010), descreveram que o neem foi expressivamente efetivo na inibição do crescimento dos fungos *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*. Estes fungos são responsáveis por doenças de frutas no pós-colheita. Dias-Ariera e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antifúngica do óleo de neem frente ao *Colletotrichum acutatum*, trabalhando com o óleo diluído em água nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0%, (v/v) obtendo inibições de crescimento micelial superiores a 75%. Já El-Kholie, Abdelreheem e Khader (2012) observaram em seus estudos que a ação fungicida dos extratos de neem propiciam significativos níveis inibição no crescimento micelial deste. Contudo, na literatura não foi encontrado avaliação das atividades do extrato etanólico da raiz de neem em associação com os óleos essenciais descritos no presente trabalho.

Na Foto 1 é possível verificar que o extrato etanólico do neem tem atividade frente ao *L. teobromae*. É possível observar que o extrato atua inibindo o crescimento do fungo ao longo da placa.

Foto 1- Teste de atividade antifúngica com o extrato etanólico da raiz do neem após 72 horas de ensaio

* Da esquerda pra direita: testemunha, 1400ppm, 1100 ppm, e 800 pmm

Atividade antifúngica com extrato etanólico e óleo de cravo

Conforme é possível observar a partir da Foto 2 a associação do óleo de cravo ao extrato etanólico promoveu um forte incremento no controle do crescimento do fungo. Todas as concentrações avaliadas foram capazes de inibir a evolução do fungo em 100%, indicando uma potente atividade fungicida. A atividade do óleo de cravo sobre o *L. teobramae* foi avaliada por Ranasinghe, Jayawardena e Abeywickrama (2002). Os autores determinaram que a Concentração Inibitória Mínima para o óleo essencial frente ao fungo gira em torno de 0.045 % (v/v). A contração determinada pelo autor se encontra bem superior a utilizada no presente estudo. Logo, o indicativo é que o efeito fungicida observado no presente trabalho está a associado ao efeito sinérgico entre o extrato de neem e os componentes do óleo de cravo e não somente o potencial fungicida do óleo de cravo.

Foto 2- Resultados da atividade antifúngica da formulação extrato etanólico + óleo de cravo após 72 h de ensaio.

* Da esquerda para a direita, 5%, 10%, 15% de óleo e testemunha

Atividade antifúngica com extrato etanólico e óleo de eucalipto

Na avaliação da atividade fungicida do produto obtido a partir da associação entre o extrato e o óleo essencial de eucalipto, Foto 3, é possível também observar forte incremento na inibição ao crescimento do fungo. Contudo, esse incremento começa a ocorrer somente a partir da utilização da solução na qual o óleo está presente proporção de 10% em relação ao extrato, tendo sido essa formulação capaz de inibir o crescimento do fungo em 78,4%. A inibição máxima obtida na avaliação coincide com a inibição de 100% no crescimento do fungo. A partir dos dados avaliados é possível inferir que a formulação tem forte atividade fungicida. A ausência de dados na literatura referentes a teste com óleo essencial de eucalipto inviabiliza a comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.

Foto 3- Resultado do processo de inibição do extrato etanólico + eucalipto após 72 horas de ensaio frente ao *L. theobromae*

* Da esquerda para a direita 5%, 10%, 15% de óleo e testemunha

Atividade antifúngica com extrato etanólico e óleo de citronela

A partir da Foto 4 é possível observar que a associação entre o extrato e óleo essencial de citronela não produziu incremento no controle do crescimento do fungo. Anthony e colaboradores (2004) avaliaram a atividade fungicida do óleo essencial da citronela contra *L. theobromae*, determinando que a CIM girou em torno de 3% (v/v). a CIM identificada pelos autores é substancialmente superior à concentração utilizada no presente estudo. De toda forma, os resultados parecem estar em concordância entre si, já que a concentração mínima com atividade frente ao fungo descritas pelos autores é significativamente elevada. O óleo de citronela não foi eficaz no melhoramento da atividade fungicida do extrato, indicando que não houve sinergia entre o extrato e óleo ou que a proporção utilizada estava abaixo da mínima capaz de alterar o potencial bioativo.

Foto 4- Potencial de inibição do extrato etanólico + citronela frente ao fitopatógeno *L. theobramae* após 72 horas de ensaio

*Da esquerda para a direita 5%, 10%, 15% e testemunha

Toxicidade aguda utilizando o modelo animal zebrafish

Os resultados obtidos para o teste de toxicidade aguda com as formulações, utilizando o zebrafish, permitiram inferir que nenhuma das concentrações avaliadas apresenta toxicidade aguda frente aos organismos teste. Durante as experimentações não ocorreu nenhuma morte dentre os indivíduos utilizados. Dados da literatura indicam que as preparações com neem não apresentam toxicidade (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; ASHAF, OREKOYA e YAKUBU 2012). Relatos da literatura indicam que óleo essencial de eucalipto apresentam baixa toxicidade (Macedo *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2011). Alonso (1998), descreveu que a DL_{50} do óleo essencial de cravo-da-índia em ratos, por via oral, foi estabelecida em 2.650 mg/kg, para humanos, a estimativa de dose diária máxima permitida de eugenol é de 2,5 mg/kg. Testes

de toxicidade aguda com óleo de citronela indicaram baixa toxicidade em ensaios com roedores tratados por diferentes vias de administração (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997).

Foto 5- Teste de toxicidade aguda realizado com o extrato e as formulações utilizando como modelo animal zebrafis

* Fonte: próprio autor.

Apesar dos dados indicando baixa toxicidade para os compostos avaliados, é preciso ressaltar que toda substância pode ser considerada um agente tóxico. O seu potencial tóxico é dependente das condições de exposição, ou seja, da dose administrada ou absorvida, do tempo e da frequência de exposição e até das vias de administração (AFFONSO *et al*, 2012)

Conclusões

A partir deste estudo foi possível inferir que as formulações obtidas a partir o extrato etanólico em associação com os óleos de cravo e eucalipto apresentam fortes atividades fungicida. Os produtos elaborados foram eficientes na inibição do crescimento do fungo em até 100%, indicando que os óleos essenciais atuam em sinergia com o extrato no combate ao fungo

L. theobromae. Além disso, foi possível verificar que, assim como os óleos essenciais puros e o extrato bruto, as formulações apresentam baixa toxicidade.

Referências

AFFONSO, R. S.; RENNO, M. N.; SLANA, G. B.C.A.; FRANÇA, T. C.C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina. 1. ed. Buenos Aires: Isis Editora, 1998

Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R. et al. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, v. 157, p. 91-97, 2004.

BATISTA, D.; BARROS, S. Tempo de extração para óleo essencial de *Croton* spp. (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 040, p. 37-40, 2018

BHOWMIK, D.; CHIRANJIB, J. Y.; TRIPATHI, K. K.; KUMAR, K. P. S. Herbal Remedies of *Azadirachta indica* and its Medicinal Application. **J. Chem. Pharm. Res.** v. 3, p. 234-244, 2011.

BOLIVAR, A. M.; ROJAS, A.; GARCIA-LUGO, P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. **Avances en Biomedicina**, v. 3, n. 1, p. 25-33, 2014.

CARVALHO, R.; ALVES, A.; FILHO, De M. NASSER, H. Influência da adubação NPK no rendimento do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* Introdução. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, 2010.

CHAGAS, A. C. D. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I; C; P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsificáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005

DALLAQUA, B.; SAITO, F. H.; RODRIGUES, T.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C.; VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C. *Azadirachta indica* treatment on the congenital malformations of fetuses from rats. **J. Ethnopharmacol**, v. 150, n. 13, p. 1109-1113, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.046>

DIAS-ARIEIRA, C. R., et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 36, n. 3, p. 228-232, Sept. 2010 .

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0303-2>.

EL-KHOLIE, E.M.; ABDELREHEEM, M.A.T.; KHADER, S.A. Azadirachta indica extracts influenced some pathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p. 5645-5649, 2012.

FREIRE, F. das C. O. Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2004, (Comunicado técnico 91).

HIRATA, D. B. et al . Efeito alelopático do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e extrato de *Annona muricata* na germinação de *Bidens pilosa* e *Megathyrus maximus*. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa , v. 41, n. 3, p. 141-150, set. 2018

KUMAR, R.; MEHTA, S.; PATHAK, S. R.. Bioactive constituents of neem. **Synthesis of Medicinal Agents from Plants**, p. 75-103, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00004-0>

KURIMOTO, S. I.; TAKAISHI, Y.; AHMED, F. A.; KASHIWADA, Y. Triterpenoids from the fruits of *Azadirachta indica* (Meliaceae). **Fitoterapia** v. 92, p. 200-205, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.11.004>.

LIMA, I. O. LIMA, R. A. G. FARIAS, E. O.; PORTO, N. M. Souza, Evandro Leite de Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACEDO I. T. F. *et al.* Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, V. 173, p. 93-98, 2010.

MACEDO I. T. F. *et al.* Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 223-227, 2011.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H.; Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macro-Phomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*In vitro*”, **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MORO, M. F.; WESTERKAMP, C. The alien street trees of Fortaleza (ne Brazil): qualitative observations and the inventory of two districts. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 789-798, out./dez., 2011.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaer.** v. 24, p. 139-148, 2005.

OLIVEIRA, Luciana Santos de *et al.* Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, p. 54-74, 2011.

OLIVEIRA, M.M.M et al . Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 14, n. 4, p. 571-578, 2012 .

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM; E. P. R. Control of dry rot (*Lasiodiplodia theobromae*) in bunches of grapevine cv. Itália using essential oil and chitosan. **Summa phytopathol**, Botucatu, v. 43 n.1, p. 23-31, Jan./Mar., 2017

RANASINGHE, L.; B. JAYAWARDENA AND K. ABEYWICKRAMA. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 208-211, 2002.

RUFINO, C. P. B.; ARAÚJO, C. DA S.; NOGUEIRA, S. R. Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na amazônia. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 1, p. 248-262, 2018.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA JUNIOR, A.; SCHEUERMANN, J. N.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavenda). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, 2012.

TAGLIARI M. S.; KNAACK. N.; FIUZA, L. U. C. Efeito de extratos de plantas na mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda*. (JE Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 259-264, abr./jun., 2010.

United States Environmental Protection Agency. Reregistration eligibility decision. Oil of Citronella. List C Case 3105. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 1997. Disponível em: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-021901_30-May-97.pdf. Acesso em 30 de agosto de 2019.

WANG, J.; CAO, J. L. J.; JIANG, W. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1100-1104, 2010.

Z HU, J.; LU, X.; FAN, X.; WU, R.; DIAO, H.; YU, R.; XU, H.; ZI, J. A new cytotoxic salannin-class limonoid alkaloid from seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. **Chinese Chem. Lett.** v. 29, p. 1261-1263, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2017.11.042>