

## **Atividade antimicrobiana de formulados a base de Alecrim contra Xanthomonas Campestris PV. Campestris e alternaria brassicae**

### **Antimicrobial activity of rosemary based formulates on Xanthomonas Campestris PV. Campestris and alternaria brassicae**

DOI:10.34117/bjdv7n9-540

Recebimento dos originais: 29/08/2021

Aceitação para publicação: 29/09/2021

#### **Tatiane Calandrino da Mata**

Doutoranda em Agronomia pela Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE)  
Instituição: Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Endereço: Rua Pernambuco, 1777, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil  
E-mail: tatiane\_calandrino@yahoo.com.br

#### **José Renato Stangarlin**

Doutor em Fitopatologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e professor em Fitopatologia  
Instituição: Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE)  
Endereço: Rua Pernambuco, 1777, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil  
E-mail: jose.stangarlin@unioeste.br

#### **Odair José Kuhn**

Pós-Doutorado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e professor em Fitopatologia  
Instituição: Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE)  
Endereço: Rua Pernambuco, 1777, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil  
E-mail: ojkuhn@gmail.com

#### **Eloisa Lorenzetti**

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE) e professora em Agronomia na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina  
Instituição: Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Endereço: Rua Pernambuco, 1777, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil  
E-mail: eloisa-lorenzetti@hotmail.com

#### **Jeferson Carlos Carvalho**

Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE) e coordenador e professor do curso de Engenharia de Produção  
Instituição: Faculdade de Ensino Superior de Marechal Cândido Rondon  
Endereço: Rua 7 de Setembro, 2341, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil

E-mail: jefersoncarvalho@outlook.pt

**Andréa Celina Ferreira Demartelaere**

Doutora em Agronomia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB/CCA/Campus II)  
e professora em Agroecologia  
Instituição: Escola Técnica Estadual Senador Jessé Pinto Freire  
Endereço: Rua Monsenhor Freitas, 648, Centro, CEP: 59586-000, Parazinho-RN, Brasil  
E-mail: andrea\_celina@hotmail.com

**Olivia Diulen Costa Brito**

Doutoranda em Agronomia pela Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE)  
Instituição: Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Estadual do  
Oeste do Paraná  
Endereço: Rua Pernambuco, 1777, Caixa Postal: 91, CEP: 85960-000, Marechal  
Cândido Rondon-PR, Brasil  
E-mail: odc.brito@gmail.com

**Arnaldo Pantoja da Costa**

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA)  
e professor titular do Ensino Básico Técnico e Tecnológico (IFPA)  
Instituição: Instituto Federal do Pará – Campus Castanhal  
Endereço: BR 316, Km 61, Saudade II, Cristo Redentor, CEP: 68740-970, Castanhal-  
PA, Brasil  
E-mail: arnaldo.pantoja2@hotmail.com

**Lindomar Assi**

Pós-Doutorado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)  
All Crim Pesquisas e Desenvolvimento de Produtos Biológicos  
Endereço: Rua Armando Grutzmann, 377, CEP: 85988-000, Entre Rios do Oeste-PR,  
Brasil  
E-mail: lindomar.assi@gmail.com

**RESUMO**

Considerando a demanda por produtos fitossanitários alternativos aos tradicionais pesticidas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de formulados orgânico e químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e *Alternaria brassicae* isolados de couve folha. A atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada a partir de colônia jovens (com 32 h) de Xcc preparada em suspensão  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> com solução salina (0,85% de NaCl) estéril em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura caldo nutriente, acrescido dos tratamentos 0 (meio de cultura); 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6% (massa/volume), avaliando-se a absorvância a 580 nm. A atividade antifúngica *in vitro* foi feita em meio de cultura suco V8-ágar, esterilizado em autoclave e vertido em placas de Petri, avaliando-se diâmetro das colônias e esporulação, bem como a germinação de esporos em lâminas de microscopia recobertas com ágar-água 1%. Os formulados químico e orgânico reduziram o crescimento de Xcc em 74,5% e 54,8%, respectivamente. Houve inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. brassicae* em todas as concentrações testadas de maneira dose-dependente. Houve inibição do crescimento micelial em 40% e 33%, esporulação em 61,35% e 54,5% e na germinação de conídios em 77,41% e 68,22% no formulado químico e orgânico, respectivamente, na

concentração 6%. Esses resultados indicam o potencial antimicrobiano dos formulados sobre *X. campestris* pv. *campestris* e *A. brassicae*.

**Palavras-Chave:** Brassica Oleracea, Rosmarinus Officinalis, Planta Medicinal, Controle Alternativo.

## ABSTRACT

Considering the demand for alternative phytosanitary products to traditional pesticides, this work aimed to evaluate the antimicrobial activity of organic and chemical rosemary-based formulations (*Rosmarinus officinalis*) on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *Alternaria brassicae* isolated from cabbage leaf. The in vitro antibacterial activity was performed from young colony (with 32 h) of Xcc prepared in  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> suspension with sterile saline solution (0.85% NaCl) in test tubes containing 5 mL of nutrient broth culture medium, plus the treatments 0 (culture medium); 0.5%; 1%; 2%; 4% and 6% (weight/volume), evaluating the absorbance at 580 nm. The in vitro antifungal activity was performed in V8-agar juice culture medium, sterilized in autoclave and poured into Petri plates, evaluating colony diameter and sporulation, as well as spore germination on microscope slides covered with 1% water-agar. The chemical and organic formulations reduced the growth of Xcc by 74.5% and 54.8%, respectively. There was a dose-dependent inhibition of *A. brassicae* mycelial growth, sporulation and spore germination in all concentrations tested. Also, there was an inhibition of mycelial growth in 40% and 33%, sporulation in 61.35% and 54.5% and in the germination of conidia in 77.41% and 68.22% in the chemical and organic formulations, respectively, in the concentration of 6%. These results indicate the antimicrobial potential of the formulates on *X. campestris* pv. *campestris* and *A. brassicae*.

**Keywords:** Brassica Oleracea, Rosmarinus Officinalis, Medicinal Plant, Alternative Control.

## 1 INTRODUÇÃO

A podridão negra e a mancha de alternaria são doenças causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae*, respectivamente, que reduzem a produtividade da couve folha (*Brassica oleracea*) e elevam o custo de produção devido ao aporte de insumos químicos utilizados durante todo o ciclo da cultura com intuito de prevenir e ou controlar estes patógenos (MARINGONI; SILVA JR., 2016).

O uso de agrotóxicos nos cultivos de hortaliças pode causar diversos problemas, tanto ao homem como a contaminação dos alimentos e a intoxicação de produtores, quanto ao meio ambiente, como a contaminação do solo, da água, a resistência de patógenos a diversos princípios ativos, o desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e a perda da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2018). Neste contexto, o uso de fungicidas ecológicos ou produzidos a partir de extratos vegetais torna-se uma opção.

A redução da aplicação de produtos químicos nos cultivos de hortaliças somente será possível se houver conhecimento a respeito do patossistema desses microrganismos de importância econômica, bem como a sensibilidade desses patógenos em relação ao espectro de ação antimicrobiana proveniente dos extratos vegetais. Dessa forma, através de técnicas de detecção de *in vitro* que demonstram a sensibilidade e ou resistência dos patógenos, é possível selecionar extratos vegetais que possam ser usados em métodos de controles alternativos. Nos últimos anos têm-se aumentado o número de pesquisas nesse âmbito, devido à eficiência e confiabilidade nos testes *in vitro* em laboratórios visando a seleção de novos produtos para controle de doenças (BARROS et al., 2015).

O alecrim, *Rosmarinus officinalis* L. (família Lamiaceae) representa uma importante fonte de compostos bioativos como cineol, cânfora, pipeno, canfeno, terpineol, ácido rosmarínico e os compostos polifenólicos, incluindo os flavonoides, capazes de controlar doenças, tanto pela ação antimicrobiana direta no patógeno, quanto pela ação indireta, através da ativação de mecanismos de defesa das plantas (ZAOUALI et al., 2010; LORENZETTI et al., 2017).

A atividade antimicrobiana do alecrim em experimento *in vitro* contra *Alternaria* sp. foi observada com sucesso por Díaz Dellavalle et al. (2011), pela redução da esporulação do patógeno. Camatti-Sartori et al. (2011), utilizando extrato acético de alecrim na concentração de 25%, verificaram a inibição de 48% do crescimento micelial de *Fusarium* sp. e 90% do fungo *Botrytis* sp. Lorenzetti et al. (2017) verificaram que o extrato aquoso de alecrim na concentração de 5% reduziu o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* em meios sólidos e líquidos em 44% e 74%, respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de formulados a base de alecrim contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae* isolados de couve folha.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon-PR (24° 33' 40" de latitude Sul e 54° 04' 12" de longitude Oeste), no período de junho 2019 a outubro 2020.

Os patógenos foram isolados a partir de lesões em folhas de couve folha as quais apresentavam sintomas característicos da podridão negra causada por *X. campestris* pv.

campestris e da mancha preta causada por *A. brassicae*, provenientes de cultivo comercial no município de Marechal Cândido Rondon–PR.

Para isolamento de *X. campestris* pv. *campestris*, fragmentos de folha (5 mm x 5 mm) foram retirados na área de transição do tecido sadio e da lesão, em seguida imergidos em solução aquosa de etanol 70% por 30 seg, solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 1 min e enxaguados em água destilada conforme metodologia descrita por Mafia et al. (2016). Após a desinfestação superficial, foram triturados em tubos contendo solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada, e em seguida, com alça de platina transferiu-se uma alíquota do homogeneizado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente. As placas foram mantidas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) por 48 h a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 h. A preservação da bactéria ocorreu em solução salina 0,85% a 10 °C (GONÇALVES et al., 2016).

O isolado de *A. brassicae* foi obtido conforme metodologia descrita por Alfenas et al. (2016) em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Um disco de micélio com aproximadamente 5 mm de diâmetro retirado do meio BDA foi transferido para placa de Petri contendo o meio suco V8-ágar, (200 mL de suco V8, 20 g de ágar, 3 g de  $\text{CaCO}_3$  e 1000 mL ADE) esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 min e 1 atm, e incubadas em BOD a 25 °C durante sete dias. Posteriormente, o isolado foi transferido e preservado pelo método de Castellani (GONÇALVES et al., 2016).

## 2.2 FORMULADOS A BASE DE ALECRIM

Foram utilizados dois formulados a base de alecrim: All Crim Convencional™ composto por nitrogênio (1%), cobre (5%) e cálcio (29%) e All Crim Orgânico™ composto por nitrogênio (1,87%), cálcio (0,37%), potássio (1,13%) e fósforo (0,36%), ambos contendo pó solúvel de alecrim. Os dois formulados foram utilizados nas concentrações 0%; 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6%, diluídos em água destilada esterilizada (massa/volume).

## 2.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO

Foram utilizados tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura caldo nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de glicose e 1000 mL de água destilada esterilizada) (MARIANO; SOUZA; GAMA, 2016), acrescido das concentrações dos formulados. Constituíram-se como testemunha somente o meio de

cultura + a bactéria e adicionou-se mais um tubo sem bactéria e apenas com meio de cultura para leitura de absorvância (branco).

A partir de colônia jovens (com 32 h) de *X. campestris* pv. *campestris*, foi preparada uma suspensão  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC)  $\text{mL}^{-1}$  com solução salina (0,85% de NaCl) estéril. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  da suspensão de células bacterianas em cada tubo de ensaio, os quais foram incubados a  $25 \pm 1$  °C por 48 h em estufa sob agitação a 150 rpm. A avaliação da multiplicação bacteriana foi determinada pela leitura de absorvância a 580 nm em espectrofotômetro.

#### 2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO

Os formulados nas devidas concentrações foram incorporados em meio de cultura suco V8-ágar e esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm por 20 min e, em seguida, vertidos em placas de Petri. Um disco de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *A. brassicae* foi retirado da borda da colônia cultivada em meio BDA (colônia com 7 dias), e repicado para o centro de cada placa de Petri, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas a  $25 \pm 1$  °C e no escuro (BALBI-PEÑA et al., 2006).

As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), com uma régua graduada em milímetros, iniciando 24 h após a instalação do experimento. As culturas foram avaliadas durante um período de 6 dias ou até que, em uma das placas, o micélio já tivesse tomado por completo a superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999). Com os valores obtidos foi calculada a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) pela equação:

$$\text{AACCM} = \left[ \frac{(Y_1 + Y_{1+1})}{2} * I \right] + \left[ \frac{(Y_2 + Y_{2+1})}{2} * I \right] \dots \left[ \frac{(Y_n + Y_{n+1})}{2} * I \right]$$

Onde:

AACCM = área abaixo da curva de crescimento micelial (adimensional);

$Y_i$  e  $Y_{i+1}$  = Tamanho do micélio do fungo observado em duas avaliações consecutivas (cm);

I = intervalo entre duas avaliações consecutivas (dias).

O teste de inibição de esporulação foi realizado ao término do teste de inibição do crescimento micelial, avaliando a produção de esporos em cada uma das placas usadas no teste. Dessa forma, foram adicionados 10 mL de água destilada em cada placa de Petri,

seguido de raspagem da colônia com espátula inoxidável esterilizada e filtragem da suspensão de esporos em gaze. A contagem do número de esporos  $\text{mL}^{-1}$  foi realizada em câmara de Neubauer e em microscópio óptico (BALBI-PEÑA et al., 2006).

A germinação de conídios foi avaliada em lâmina de microscopia revestida com  $800 \mu\text{L}$  de ágar-água 1% autoclavado. Para tanto, uma alíquota  $50 \mu\text{L}$  das concentrações dos formulados a base de alecrim (corrigidas para se manter as concentrações citadas anteriormente) e alíquota de  $50 \mu\text{L}$  da suspensão de esporos ( $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) de *A. brassicae*, obtidas de uma colônia com 7 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas.

Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida no escuro a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h (BALBI-PEÑA et al., 2006). Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada. Após 24 h cada lâmina recebeu  $40 \mu\text{L}$  de azul algodão com lactofenol para paralisar a germinação dos esporos. A avaliação foi realizada pela contagem de esporos germinados em microscópio óptico. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

## 2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

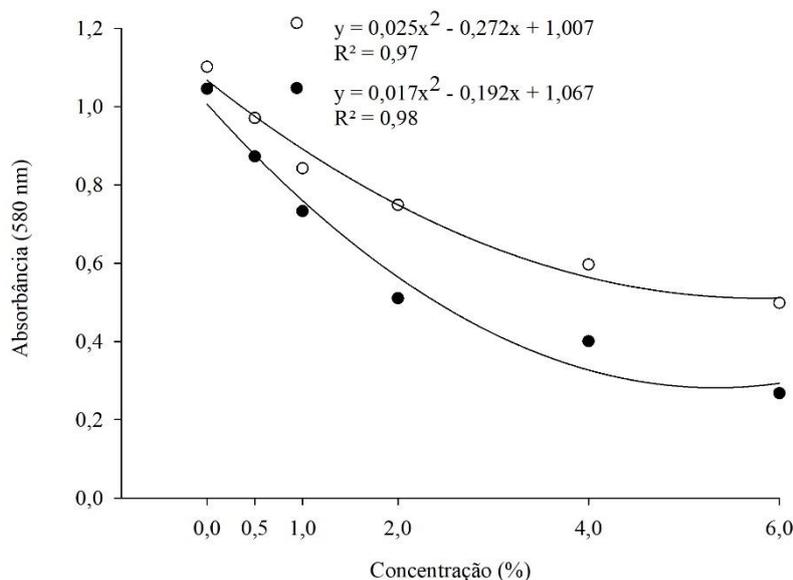
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Ambos experimentos possuíram seis tratamentos representados pelos formulados convencional e orgânico a base de alecrim com seis concentrações e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) a ( $p \leq 0,05$ ) realizada no Software livre Genes (CRUZ, 2013) e quando significativos foram submetidos à análise de regressão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Observou-se inibição da multiplicação de *X. campestris* pv. *campestris* de maneira dose-dependente. Os formulados de alecrim orgânico e convencional apresentaram efeito direto sobre a multiplicação *in vitro* da bactéria, tendo seus comportamentos representados por equação quadrática. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,33% do formulado convencional e no orgânico na concentração 5,79%, na qual o menor valor de absorvância foi 0,28 e 0,51 respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Efeito de concentrações dos formulados a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) orgânico (○) e convencional (●) sobre o crescimento de *X. campestris* pv. *campestris*. (○) CV = 6,15% e (●) CV = 6,33%.



Os formulados foram capazes de reduzir o crescimento *in vitro* das colônias de *X. campestris* em todas as concentrações testadas. Entretanto, as maiores concentrações (4% e 6%) foram capazes de diminuir significativamente a multiplicação da bactéria, levando a uma redução média de 61,8 % e 74,5% para o formulado convencional, enquanto as médias 45,8% e 54,8% foram obtidas no formulado orgânico quando comparadas com a testemunha (concentração zero).

Comportamento semelhante ao presente trabalho foram obtidos por Vigo et al. (2009), quando observaram ação inibitória *in vitro* em isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao utilizarem óleo essencial de alecrim a partir da concentração de 1%, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a eficiência do óleo sobre a inibição do patógeno.

Martins et al. (2011), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim nas concentrações de 4% e 8%, verificaram ação inibitória em *Ralstonia solanacearum* em frutos de tomate e tubérculos de batata. Lima (2016) confirmou que em ensaio *in vitro*, o óleo essencial de alecrim a partir da concentração de 0,5% inibiu completamente o crescimento de *R. solanacearum*.

Essas atividades antibacterianas poderiam ser explicadas pelo fato do alecrim possuir princípios ativos como  $\alpha$ -pipeno, 1,8-cineol, canfeno, cânfora e borneol, como também compostos monoterpênicos responsáveis por romper as paredes celulares e

membrana citoplasmática, perturbando a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos, comprovando que a citotoxicidade parece incluir tais danos às membranas dos patógenos e rompimento de parede celular (CUTRIM et al., 2019).

A análise dos perfis lipídicos por cromatografia gasosa e da estrutura do envelope da célula por microscopia eletrônica de varredura de várias bactérias tratadas por alguns dos componentes do alecrim mostrou uma forte diminuição de ácidos graxos insaturados e um aumento em ácidos graxos saturados, bem como alterações dos envelopes celulares (HUSSAIN et al., 2010). Em geral, a atividade citotóxica de óleos essenciais ocorre principalmente devido à presença de fenóis, aldeídos e álcoois (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

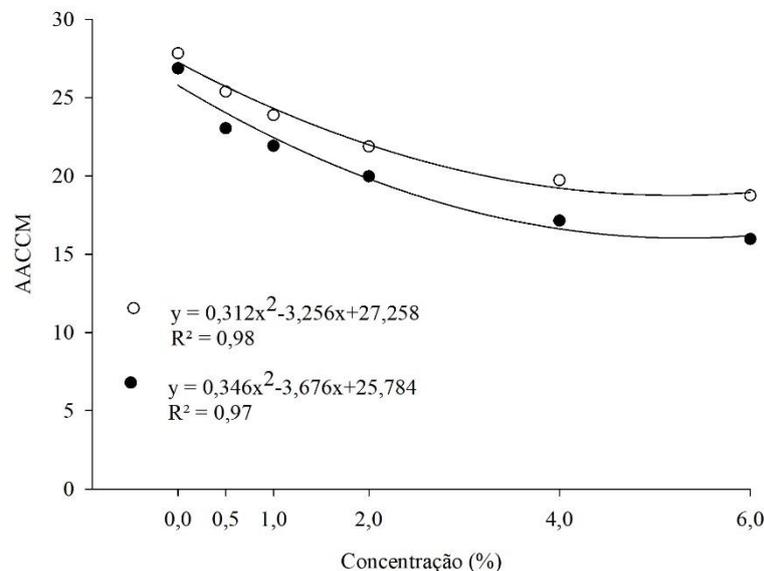
Vale ressaltar outro ponto importante em relação aos formulados a base de alecrim utilizados no presente trabalho, principalmente o convencional, que exerceu uma efetiva atividade antibacteriana em relação ao orgânico, o que pode ser devido à presença de cobre em sua composição, que é um importante nutriente com atividade antimicrobiana (SHEIKH et al., 2011). Quando o cobre entra em contato com a bactéria, este causa distorção repentina da parede celular e destruição da membrana celular, pois os íons de cobre que tem uma forte redução podem extrair os elétrons das bactérias, fazendo com que o seu citoplasma escorra e o seu núcleo celular oxide, causando sua morte (SHEIKH et al., 2011).

Tal comportamento também foi verificado por Trabulsi et al. (1999), ao realizarem estudos de resistência das bactérias a determinadas moléculas de formulado a base de alecrim, afirmando que um simples aumento da dose pode impedir o crescimento do microrganismo.

### 3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a atividade antifúngica houve inibição do crescimento micelial de maneira dose-dependente, com redução da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), tendo seu comportamento representado por equação quadrática. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,31% do formulado convencional e 5,22% do orgânico, onde se verificam as menores AACCM, com valores de 16,02 e 18,76, respectivamente (Figura 2). Os formulados convencional e orgânico a base de alecrim, na concentração 6%, inibiram o crescimento em 40% e 33%, respectivamente em relação a testemunha (concentração zero).

Figura 2. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Alternaria brassicae* em meio de cultura suco V8-ágar acrescido de formulados orgânico (○) e convencional (●) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (○) CV = 2,37% e (●) CV = 2,80%.

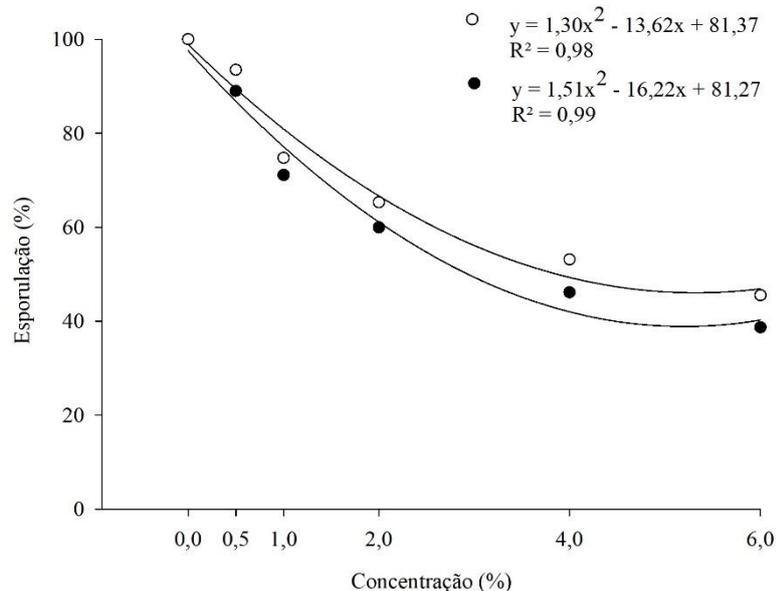


Corroborando com esses resultados, Goetten et al. (2014), utilizando extrato bruto aquoso de alecrim nas concentrações 0, 10%, 30% e 40%, observaram inibição no crescimento micelial do fungo *Sphaceloma ampelinum*, agente causador da antracnose da videira, com efeito dose-dependente. O mesmo foi encontrado por Formentini et al. (2014), quando estudaram o efeito de 10% do extrato de alecrim sobre o *Metarhizium anisopliae*.

Lorenzetti et al. (2017), avaliando o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* em meio BDA contendo concentrações do extrato de alecrim, verificaram que a concentração 4,5% apresentou a menor AACCM. Hillen et al. (2012), estudando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim, observaram que a partir da concentração 20% houve 100% de inibição do crescimento micelial de *Alternaria carthami*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*.

Ao analisar a influência das concentrações dos formulados convencional e orgânico a base de alecrim na esporulação de *A. brassicae*, observou-se modelo de regressão quadrática com efeito dose-dependente. Os tratamentos com formulado convencional e orgânico inibiram a esporulação em 61,35% e 54,5%, respectivamente, com a aplicação da concentração 6%, quando comparado a concentração zero (Figura 3).

Figura 3. Porcentagem de esporulação de *Alternaria brassicae* em função dos tratamentos com formulados orgânico (○) e convencional (●) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (○) CV = 8,91% e (●) CV = 7,34%.



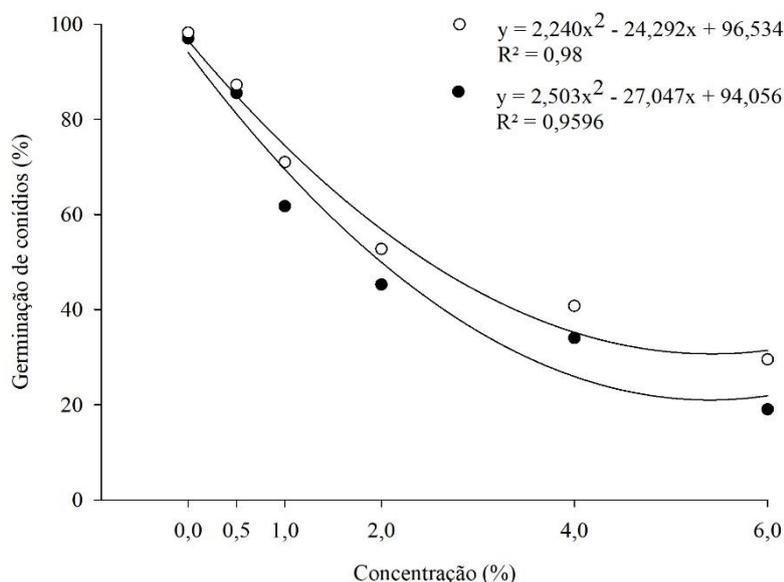
Os resultados obtidos corroboram com os de Mamprim et al. (2013), quando utilizaram o extrato de alecrim na concentração de 10% e observaram redução da formação de conídios de *M. anisopliae* entre 24% a 39%.

Nascimento (2017) observou inibição de 100% na esporulação quando utilizou o óleo essencial de alecrim a 0,75% sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Da mesma forma, Silva et al. (2018), utilizando o óleo essencial de alecrim, verificaram redução na esporulação in vitro de *Bipolaris oryzae*.

Em estudos realizados por Itako et al. (2008), verificou-se o poder inibitório dos extratos brutos aquosos de *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *R. officinalis* nas concentrações de 20% e 40%, com redução acima de 90% da esporulação de *Alternaria solani*.

Os formulados convencional e orgânico a base de alecrim inibiram a germinação dos esporos de *A. brassicae*, tendo seu comportamento representado por modelo de regressão quadrática em função das concentrações crescentes. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,40% do formulado convencional e 5,42% do orgânico, onde se verificou a menor porcentagem de germinação de conídios, de 20,99% e 30,68%, respectivamente (Figura 4). Houve redução de 77,41% na germinação de esporos no formulado convencional e 68,22% do orgânico quando se utilizou a concentração de 6%.

Figura 4. Inibição in vitro da germinação de esporos de *A. brassicae* em função dos tratamentos com formulados orgânico (○) e convencional (●) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (○) CV = 8,30% e (●) CV = 11,39%.



Resultados semelhantes a presente pesquisa foram encontrados por Andrade; Vieira (2016), quando verificaram que 50 e 100  $\mu$ L de óleo essencial de alecrim reduziram em 70% e 78% o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e na germinação de esporos observaram reduções em torno 31,2% utilizando 30  $\mu$ L. Testando extrato aquoso de alecrim nas concentrações de 5%, 10% e 20%, Marcondes et al. (2014) observaram que a germinação de conídios de *Fusarium moniliforme* foi menor em todas as concentrações testadas.

Itako et al. (2009), ao avaliarem o efeito do extrato bruto aquoso de alecrim sobre a germinação dos esporos de *Cladosporium fulvum* observaram redução de 65,14% da germinação na concentração de 40%.

Esses resultados sustentam a hipótese de que o alecrim possui ação antimicrobiana, podendo estar relacionado aos compostos antifúngicos presentes em suas folhas como por exemplo cineol, pineno, borneol e cânfora. Esses compostos podem afetar os microrganismos de várias formas, como pela desorganização da membrana citoplasmática de suas células, quanto pela quebra do fluxo de elétrons e transporte ativo desbalanceado, porém, não se pode dizer como cada um atua separadamente, pois vários desses compostos trabalham de forma conjunta (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011).

Além do alecrim presente nos formulados, tem-se os nutrientes que podem ter ação direta sobre os fitopatógenos como o nitrogênio e o cobre constituintes do formulado convencional, e o potássio e o fósforo presentes no formulado orgânico. Santos et al. (2018), utilizando fosfito de cobre e potássio na concentração de 0,006%, verificaram ação fungicida, não havendo o crescimento *in vitro* de *Pythium sp.* Pereira (2018), em pesquisa com nitrato de cobre na dose 146,5 mg Kg<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> observaram inibição de 99,7% da germinação de uredinósporos de *Hemileia vastatrix* em condições *in vitro*.

Sobrinho et al. (2016) testaram fosfito de potássio no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro, e verificaram inibição do patógeno na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> em cultivo *in vitro*, bem como Schurt et al. (2013), testando a eficiência do fosfito de potássio *in vitro* sobre *R. solani*, verificaram inibição do crescimento micelial do patógeno.

Rezende (2014), em estudo para verificar o efeito do fosfito de potássio no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora plurivora*, verificou que o produto além de reduzir o crescimento micelial dos fungos, agiu na morfologia das hifas e síntese da parede celular dos micélios dos fitopatógenos. Ortíz; Zapata (2012) também verificaram que o fosfito de potássio teve ação inibitória sobre a germinação dos esporos de *Mycosphaerella fijiensis*.

Os resultados indicam o potencial antifúngico dos formulados a base de alecrim de forma direta sobre *A. brassicae* e *X. campestris pv. campestris*. Considera-se ainda a necessidade de continuidade das pesquisas para controle desses patógenos quando em interação com a planta hospedeira couve folha, avaliando-se a redução na intensidade das doenças, seja de maneira antimicrobiana direta ou por indução de resistência.

#### 4 CONCLUSÃO

Os formulados convencional e orgânico a base de *R. officinalis* apresentaram atividade antimicrobiana direta sobre *X. campestris pv. campestris* e *A. brassicae* isolados de couve folha, de maneira dose-dependente.

## REFERÊNCIAS

1. ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G. GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em Fitopatologia. 2 ed. Viçosa, MG. UFV. 2016. p. 55-92.
2. ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose in vitro e em frutos de mamoeiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 1, p. 367-372, 2016.
3. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
4. BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 3, p. 310-314, 2006.
5. BARROS, J. de S. G.; GOMES, E. C. de S.; CALVACANTI, L. S. Efeitos de extratos de *Allamanda blanchetti* no controle de *Alternaria brassicola* em mudas de couve-manteiga. *Revista Caatinga*, v. 8, n. 3, p. 36-46, 2015.
6. CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F. E.; CRIPPA, L. B.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; MARCHETT, C. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. *Revista Brasileira de Agrobiologia*, v. 6, n. 2, p.117-122, 2011.
7. COSTA, A. T.; AMARAL, M. F. Z.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M.; BARA, M. T. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.
8. CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
9. CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (gingibre) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). *Revista Virtual Química*, v. 11, n. 1, p. 60-81, 2019.
10. DÍAZ DELLAVALLE, P.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; FERREIRA, F.; RIZZA, M. D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 71, n. 2, p. 231-239, 2011.
11. FORMENTINI, M. A.; ALVES, L. F. A.; PINTO, F. G. S.; MAMPRIM, A. P. In vitro assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Clavicipitaceae). *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 9, n. 1, p. 195-204, 2014.

12. GOETTEN, M. R.; GOMES, B. R.; PIRES, A. F.; VACARI, J.; PIZZATTO, D.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; ITAKO A. T. Fungitoxidade de extratos brutos aquosos sobre *Sphaceloma ampelinum* da videira. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 118, 2014.
13. GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos**. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia, Editora UFV, ed. 2, 2016. p. 92-105.
14. HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. *Revista Brasileira de plantas Medicinai*s, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.
15. HUSSAIN, A. I; ANWAR F.; CHATHAI, S. A. S; JABBAR, A.; MAHBOOBIII, S.; NIGAM, P. S. **Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, 1070 p. 2010.
16. ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 75-83, 2009.
17. ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. **Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais**. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.
18. LIMA, M. A. G. **Óleos essenciais e silício no controle de murcha bacteriana no tomateiro**. 2016. 89 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2016.
19. LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. Antifungal activity of rosemary extract on *Macrophomina phaseolina* and charcoal rot control in soybean. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 3, p. 777-780, 2017.
20. MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em Fitopatologia, Editora UFV, ed. 2, 2016. p. 145-170.
21. MAMPRIM, A. P.; ALVEZ, L. F. A.; PINTO, F. G. da S.; FORMENTINI, M. A.; MARTINS, C. C.; BONINI, A. K. Efeito de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Semina Ciências Agrárias*, v. 34, n. 4, p. 1451-1466, 2013.
22. MARCONDES, M. M.; MARTINS MARCONDES, M.; BALDIN, I.; MAIA, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 16, n. 4, p. 896-904, 2014.

23. MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. **Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas**. In: MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. de. Manual de Práticas em Fitobacteriologia. 3 ed. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2016. v. 1, p. 51-55.
24. MARINGONI, A. C.; SILVA Jr., T. A. F. **Doenças das brássicas**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. v. 2, Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2016. p.165-173.
25. MARTINS, E. S. C. da S.; FARIAS, A. de A; SANTOS, M. da S.; BARROS, H. M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais no controle in vitro da *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 5, n. 1, p. 25-29, 2011.
26. NASCIMENTO, D. M. **Efeito do tratamento de sementes de pimentão com óleos essenciais sobre o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e o potencial fisiológico das sementes**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em proteção de plantas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2017.
27. OLIVEIRA, J. L. S.; LIMA, A. C. B.; MININI, D.; SILVA, E. Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. **Agrarian Academy**, v. 5, n. 9, p. 454-467, 2018.
28. ORTÍZ, A. M. M.; ZAPATA, J. C. Evaluación in vitro de Inductores de Resistência sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. **Revista Facultad Nacional Agronomía-Medellín**, v. 65, n. 1, p. 6327-6336, 2012.
29. PEREIRA, A. B. **Fontes de cobre no controle da ferrugem do cafeeiro. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2018.**
30. REZENDE, C. R. **Fosfito de potássio no controle *Phytophthora* spp. em citros e faia e seu modo de ação**. 2014. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2014.
31. RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
32. SANTOS, S. L. dos; CAMPOS, T. de; DALLACOSTA, N. L.; MAZARO, S. M. Potencial de produtos à base de fosfitos no controle de *Pythium* sp. em condições in vitro. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, p. 105-110, 2018.
33. SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. A.; SOUZA, N. F. A.; REIS, R. D. Eficiência de diferentes moléculas na redução dos sintomas da queima das bainhas em arroz e no crescimento de *Rhizoctonia solani* in vitro. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 221-225, 2013.

34. SHEIKH, F. A.; KANJWAL, M. A.; SARAN, S.; CHUNG, W. J.; KIM, H. Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials. **Applied Surface Science**, v. 257, 7 ed. p. 3020-3026, 2011.
35. SILVA, W. R.; MOREIRA-NUÑEZ, V.; GAVIRIA-HERNANDÉZ, V.; GOLÇALVES, V. P. AZAMBUJA, R. H. M.; FARIAS, C. R. J. de. Fungitoxicidade de extratos vegetais e óleo essencial de alecrim no crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris oryzae*. **Magistra**, v. 29, n. ¾, p. 257-265, 2018.
36. SOBRINHO, G. G. R.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, A.; JESUS JUNIOR, W. C.; NOVAES, Q. S. Efeito de fosfito de potássio no crescimento e na densidade micelial do *Fusarium solani* do maracujazeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 180-182, 2016.
37. STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 11, p. 16-21, 1999.
38. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
39. VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. de C.; LIMA, G. P. P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 293-304, 2009.
40. ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3144-3152, 2010.