Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

Daniele Cristina Fontana

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

Daniele Cristina Fontana
Engenheira Agrônoma

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

Orientador:
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Co-Orientador:
Prof. Dr. **BRAULIO OTOMAR CARON**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia.

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Fontana, Daniele Cristina

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais / Daniele Cristina Fontana. - - Piracicaba, 2021.

111 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Pinta preta do tomateiro 2. Biofungicidas 3. Sustentabilidade 4. Tomate 5. Formulação I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por tudo!

E graças a Ele, muitas pessoas boas fizeram parte desta caminhada.

À minha família, aos meus pais, Dirceu e Nires, ao meu irmão Daniel Fontana pelo amor incondicional, e por estarem presentes mesmo a muitos quilômetros de distância.

Ao professor Dr. Durval Dourado Neto pela orientação, direcionamento e suporte necessário para que o período de doutoramento fosse realizado de forma tranquila, leve e de grande crescimento pessoal e profissional. Em seu nome, agradeço as secretárias da diretoria por todo apoio e agilidade em resolver minhas inquietações e desafios, especial agradecimento à Sandra de Marchi Vello.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Esalq/USP, em nome do professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati, que abriu as portas do laboratório para que todas as análises fossem desenvolvidas. Além disso, gratidão por me acolher no seu grupo de pesquisa, colaborar imensamente com cada detalhe das análises, pela amizade e grandes ensinamentos de vida. Aos colegas do laboratório, gratidão pela paciência, amizade e ensinamentos, em especial aos amigos Abel Torres, Mariana Colli e Samuel de Paula.

Às grandes inspirações: professores Dr. Braulio Otomar Caron e Dra. Denise Schmidt por todo apoio, amizade, carinho, cumplicidade e incentivo durante toda caminhada. Agradeço ainda ao Laboratório de Extrativos Aromáticos da UFSM, campus de Frederico Westphalen, por ceder os óleos essenciais utilizados, em especial ao Matheus Pretto Milani por toda ajuda na realização deste trabalho. Ao professor Marcio Mazuti que sempre esteve disponível para auxílio nos experimentos. Aos amigos Tiago Olivoto, Maria Inês Diel e Eduardo Engel, por todo auxílio estatístico.

Ao Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal da Esalq/USP por todo suporte, em especial ao professor Dr. Paulo Mazaffera e ao Técnico Edson de Moraes, pelo auxílio nas análises enzimáticas e pelos ensinamentos adquiridos. Aos colegas de laboratório que sempre foram tão especiais, amigáveis, tornando esse período de doutoramento leve e divertido.

À Maria Heloisa Duarte de Moraes por permitir o uso de seu laboratório para a produção de esporos que utilizamos no projeto de pesquisa. Ao professor Tiago Osorio Ferreira (Laboratório de Geoquímica do Solo) por permitir uso de seu laboratório e equipamentos para formulação dos fungicidas. À professora Lilian Amorim, que além de ser inspiração, colaborou com ideias e discussões pertinentes.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp de Sorocaba, em especial ao professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Dr. Jhones de Oliveira, pela grande parceria na determinação da estabilidade físico-química das formulações, e por estarem prontamente disponíveis para contribuir com nosso trabalho.

Às amigas de prédio por se tornarem minha família. Agradeço todas as pessoas especiais que conheci em Piracicaba (SP), e que tornaram meus dias mais leves, felizes e únicos. A todos, que de uma forma ou outra contribuíram para que a tese fosse concluída: muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica:

a vontade”

Albert Einstein

e a Fé.

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Cultura de tomate 17
2.2 Doenças 18
2.3 Pinta preta de tomateiro 19
2.4 Controle 22
2.4.1 Controle químico 22
2.4.2 Problemas 23
2.5 Óleos essenciais 23
2.6 Nanotecnologia na formulação 25
3 MATERIAIS E MÉTODO 29
3.1 Condição experimental 29
3.1.1 Obtenção dos isolados fúngicos 29
3.1.1.1 Procedimento de análise da filogenia dos isolados II e III 30
3.1.2 Obtenção dos óleos essenciais e análise da composição química 32
3.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de isolados de *Alternaria* spp. *in vitro.* 32
3.3 Teste de metodologias 33
3.3.1 Teste de metodologia para produção e suspensão de esporos 33
3.3.2 Teste de doses para os experimentos *in vivo* 34
3.4 Eficiência dos óleos essenciais no controle da pinta preta 35
3.5 Processo da nanoformulação 37
3.5.1 Local 37
3.5.2 Formulações a base água e óleo essencial E 37
3.5.3 Fungicidas 37
3.5.4 Aditivos 37
3.5.5 Procedimento experimental 37
3.6 Eficiência das nanoformulações desenvolvidas 40

3.6.1 Eficiência de controle *in vitro* 40
3.6.2 Eficiência de controle *in vivo* 41
3.6.3 Análise estatística das nanoformulações 43
3.7 Caracterização da estabilidade físico-química 44
3.7.1 Diâmetro médio e Índice de Polidispersão 44
3.7.2 Potencial Zeta 45
3.7.3 Rastreamento de nanopartículas 45
3.8 Alterações bioquímicas em plantas de tomate tratadas com nanoformulações para controle da pinta preta 45
3.8.1 Preparo do extrato enzimático 47
3.8.2 Quantificação de proteínas totais 47
3.8.3 Atividade da enzima guaiacol peroxidase 47
3.8.4 Atividade da β-1,3-glucanase 48
3.8.5 Quantificação de fenóis livres 49
3.8.6 Análise estatística das enzimas 49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
4.1 Composição química dos óleos essenciais 53
4.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de isolados de *Alternaria* spp. *in vitro*. 53
4.3 Teste de metodologias 58
4.3.1 Teste de doses para os experimentos *in vivo* 58
4.4 Eficiência dos óleos essenciais no controle da pinta preta de tomateiro 60
4.5 Eficiência das nanoformulações desenvolvidas 64
4.6 Caracterização da estabilidade físico-química 74
4.7 Alterações bioquímicas em plantas de tomate tratadas com nanoformulações para controle da pinta preta 81
4.8 Potencial dos formulados na redução do desenvolvimento da pinta preta de tomateiro 94
5 CONCLUSÃO 101
REFERÊNCIAS 103

RESUMO

Nanoformulação de fungicidas a partir de óleos essenciais

A cultura de tomate está entre as principais commodities agrícolas brasileiras, e figura entre as principais hortaliças cultivadas do mundo. Embora com elevada importância econômica, a cultura apresenta suscetibilidade a um amplo espectro de pragas e doenças. Doenças como a pinta preta de tomateiro, ocasionada pelo fungo *Alternaria* spp. podem reduzir a produtividade da cultura, e gerar perdas substanciais quando não controlada. Existem no mercado grande número de produtos recomendados para seu controle, e aproximadamente 35% do número total de produtos para a cultura são recomendados para controle da *Alternaria.* Problemas ambientais, contaminação alimentar, resistência microbiana aos ingredientes ativos já existentes são alguns dos motivos que impulsionam pesquisas com novas estratégias de manejo. Neste sentido, formulações com óleos essenciais oriundos de plantas aromáticas poderiam contribuir para uma agricultura eficiente e sustentável, caso atrelada a técnicas de agricultura "nano". Diante disso, o objetivo deste trabalho foi utilizar a nanotecnologia para desenvolver formulações de fungicidas a partir de óleos essenciais, para controle da pinta preta de tomateiro. Os experimentos foram desenvolvidos na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" durante os anos de 2019 a 2021. Primeiramente os óleos essenciais foram avaliados quanto ao seu efeito direto na inibição do crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp., e caracterizados quimicamente quanto à sua composição. Os óleos essenciais promissores foram testados para o controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa de vegetação. Após seleção do óleo essencial promissor desenvolveram-se as nanoformulações, gerando 37 produtos, e estes foram testados quanto a sua eficiência no controle de *Alternaria linariae in vitro*, e da doença em tomateiro. Os resultados de eficiência das nanoformulações foram analisadas estatisticamente e selecionadas para as análises de caracterização e estabilidade físico-química e atividade bioquímica. Os óleos essenciais A, B, C e E apresentaram controle do crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. em baixas doses. Os óleos essenciais possuem satisfatório controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa-de-vegetação na dose de 2,5 $\mu L\ mL^{-1}$. As nanoformulações a partir do óleo essencial E controlaram eficientemente a *Alternaria* spp. em condições *in vitro,* e a doença na planta. As formulações 1, 5, 9, 10 e 18 apresentaram tamanho médio inferior a 300 nm, sem que ocorressem grandes alterações na sua composição físico-química até 150 dias de armazenamento, demonstrando estabilidade de prateleira. A formulação 9 se destacou devido às suas características de tamanho, polidispersão, potencial zeta e concentração de partículas. As formulações 1, 9, 10 e 23 induziram resistência em tomateiro, auxiliando na ativação inerente da planta contra a pinta preta de tomateiro, através das enzimas guaiacol peroxidase e β, 1-3 glucanase. As nanoformulações desenvolvidas recebem destaque, pois os produtos desenvolvidos são altamente eficazes no controle da pinta preta de tomateiro atuando através do controle direto e indução de resistência. Além disso, fungicidas desenvolvidos a partir óleos essenciais garantem a sustentabilidade do sistema de manejo de plantas, contribuindo substancialmente na oferta de alimento seguro para futuras gerações.

Palavras-chave: Sustentabilidade, Formulação, Biofungicidas, Compostos naturais, Pinta preta de tomateiro, *Alternaria* spp.

ABSTRACT

Nanoformulation of fungicides from essential oils

The tomato crop is among the main Brazilian agricultural commodities, and is among the main cultivated vegetables in the world. Although of high economic importance, the crop is susceptible to a wide spectrum of pests and diseases. Diseases such as the black spot of tomato, caused by the fungus *Alternaria* spp. they can reduce the productivity of the crop, and generate substantial losses when not controlled. There are a large number of products recommended for your control on the market, and approximately 35% of the total number of products for culture are recommended for control of *Alternaria*. Environmental problems, food contamination, microbial resistance to existing active ingredients are some of the reasons that drive research with new management strategies. In this sense, formulations with essential oils from aromatic plants could contribute to an efficient and sustainable agriculture, if linked to "nano" farming techniques. Therefore, the objective of this work was to use nanotechnology to develop fungicide formulations from essential oils, to control the black spot of tomato. The experiments were carried out at the "Luiz de Queiroz" College of Agriculture during the years 2019 to 2021. Firstly, essential oils were evaluated for their direct effect on inhibiting the mycelial growth of Alternaria spp. its composition. The promising essential oils were tested to control the black spot of tomato in greenhouse conditions. After selecting the promising essential oil, nanoformulations were developed, generating 37 products, and these were tested for their efficiency in controlling Alternaria linariae in vitro, and the disease in tomato plants. The efficiency results of the nanoformulations were analyzed statistically and selected for the analysis of characterization and physical-chemical stability and biochemical activity. Essential oils A, B, C and E showed mycelial growth control of Alternaria spp. in low doses. The essential oils have satisfactory control of the black spot of the tomato under greenhouse conditions at a dose of 2.5 $\mu L\ mL^{-1}$. Nanoformulations from essential oil E efficiently controlled Alternaria spp. in vitro conditions, and the disease in the plant. Formulations 1, 5, 9, 10 and 18 showed an average size of less than 300 nm, without major changes in their physical-chemical composition until 150 days of storage, demonstrating shelf stability. Formulation 9 stood out due to its characteristics of size, polydispersity, zeta potential and particle concentration. Formulations 1, 9, 10 and 23 induced resistance in tomato plants, assisting in the plant's inherent activation against tomato black spot, through the enzymes guaiacol peroxidase and β, 1-3 glucanase. The developed nanoformulations are highlighted, since the products developed are highly effective in controlling the black spot of tomato, acting through direct control and resistance induction. In addition, fungicides developed from essential oils ensure the sustainability of the plant management system, contributing substantially to the provision of safe food for future generations.

Keywords: Sustainability, Formulation, Biofungicides, Natural compounds, Black spot of tomato, *Alternaria* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de produtos recomendados para controle de doenças na cultura de tomate. Pesquisa realizada na Plataforma AGROFIT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento durante o mês de março de 2021. 19
Figura 2. Ciclo da pinta preta de tomateiro, destacando as etapas do ciclo primário e secundário de infecção. Fonte: BioRender.com. 21
Figura 3. Sintomas típicos da pinta preta de tomateiro promovida por isolados *Alternaria* spp. Fotos: Arquivo pessoal. 22
Figura 4. Esporos de isolados de *Alternaria* spp. avaliados: Isolado I (A), Isolado II (B), Isolado III (C), Isolado IV (D) e Isolado V (E). Barra: 70 µm. Fotos: Arquivo pessoal. 29
Figura 5. Árvore filogenética dos isolados II (UCB 181) e III (UCB 180) de *Alternaria* spp. 31
Figura 6. Esquema representativo dos experimentos realizados. Fonte: BioRender.com. 51
Figura 7. Dose dos óleos essenciais A, B, C, D, E e F necessária para inibir o crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. 55
Figura 8. Severidade e eficiência de controle - EC (A), área foliar doente - AD e área foliar sadia - AS (B) e número de folhas (C) de plantas de tomate tratadas com doses de óleo essencial..... 59
Figura 9. Severidade (A), eficiência de controle (B), área foliar doente (C) e área foliar sadia (D), de plantas de tomate tratadas com óleos essenciais 72 horas antes da inoculação com o isolado III de *Alternaria* spp..... 60
Figura 10. Imagens das folhas de tomateiro escaneadas e analisadas pelo programa QUANT, aos quatro dias após inoculação do isolado III de Alternaria spp., sendo os tratamentos: [OA+I] (A), [OB+I] (B), [OC+I] (C), [OD+I] (D), controle [A+I] (E) e testemunha [A+A] (F)..... 61
Figura 11. Imagens referentes ao experimento desenvolvido, demonstrando o aspecto visual das plantas de tomate após quatro dias da inoculação do isolado III de Alternaria spp., sendo os tratamentos: [OA+I] (A), [OB+I] (B), [OC+I] (C), [OD+I] (D), controle [A+I] (E) e testemunha [A+A] (F). 62
Figura 12. Folhas de plantas de tomate tratadas com 50% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h, escaneadas e tratadas com o software Quant quanto a severidade da pinta preta de tomateiro. 66

Figura 13. Folhas de plantas de tomate tratadas com 100% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h, escaneadas e tratadas com o software Quant quanto a severidade da pinta preta de tomateiro. 67
Figura 14. Contribuição dos fatores para cada experimento e a classificação dos tratamentos em ordem crescente para o índice MGIDI; os tratamentos selecionados são mostrados na cor vermelha e o círculo vermelho representa o ponto de corte de 10% para os experimentos com 50% (A, B) e 100% dose dos formulados (C, D), *in vitro* (D, E) e todas as variáveis agrupadas (E, F), respectivamente. O tratamento controle [A+I] foi retirada da seleção nesta etapa para não influenciar nos resultados. 71
Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das formulações armazenadas em temperatura ambiente e geladeira, em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em ambiente analisadas por DLS (A); Formulações armazenadas em geladeira analisadas por DLS (B); Formulações armazenadas em ambiente analisadas por NTA (C); Formulações armazenadas em geladeira analisadas por NTA (D). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). 76
Figura 16. Índice de polidispersão das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). 77
Figura 17. Distribuição de tamanho das formulações analisadas por DLS e NTA e armazenadas em temperatura ambiente. Determinação em triplicata (n=3). 78
Figura 18. Potencial Zeta das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). 79
Figura 19. Concentração de partículas das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 160 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). 80
Figura 20. pH das formulações em função do tempo de armazenamento (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B)..... 80
Figura 21. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β-1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F1, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna. 83

Figura 22. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β -1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F9, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna..... 84
Figura 23. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β -1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F10, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna..... 85
Figura 24. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β-1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F23, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna..... 86
Figura 25. Análise de componentes principais para as análises bioquímicas realizadas nos experimentos I e II, sendo as variáveis: peroxidase (Perox), β, 1-3 glucanase (Beta), compostos fenólicos (Fenois), e os tratamentos: [A_A], [F_1_A], [F_9_A], [F_{10}_A] e [F_{23}_A]. Os contornos foram classificados em função dos horários de avaliação. Traço entre os caracteres representa a aplicação prévia + inoculação ou não. 89
Figura 26. Acompanhamento da sintomatologia da pinta preta de tomateiro em plantas tratadas previamente com os formulados (F) ou água (A) e inoculadas (I) com o isolado III de *Alternaria* spp. 96
Figura 27. Acompanhamento da sintomatologia da pinta preta de tomateiro em plantas controle, as quais foram tratadas previamente às 72 horas com água e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp..... 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos isolados fúngicos e sua codificação para realização do experimento... 30
Tabela 2. Descrição dos tratamentos realizados em plantas de tomate tratadas previamente (-72 horas) com as doses dos óleos essenciais B, C e água, e a inoculação (I) a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A). 35
Tabela 3. Descrição dos tratamentos realizados em plantas de tomate tratadas previamente (-72 horas) com os óleos essenciais (O) A, B, C, E e água, e inoculadas a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A). 36
Tabela 4. Código da formulação e combinações de ingrediente ativo de fungicidas, óleos essenciais e aditivos de formulações (valores em %): (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) e (IX). 39
Tabela 5. Descrição dos tratamentos realizados em plantas tratadas previamente (-72 horas) com os formulados (F) e água, e inoculadas a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A). 42
Tabela 6. Descrição dos tratamentos realizados em experimentos com plantas de tomate tratadas apenas com o agente indutor de resistência (F) e água (A) (1º experimento), e tratadas com o agente indutor (-72 horas) e inoculadas (I) a 0 hora com isolado III de *Alternaria* spp. ou com água (2º experimento). 46
Tabela 10. Teste de comparação de médias para o experimento de plantas de tomate pulverizadas com 100% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h. 70
Tabela 11. Área abaixo da curva do progresso da atividade bioquímica (AACPab) em folhas de tomate submetidas a pulverização com os indutores + água (A) ou inoculação (I), nos experimentos I e II, respectivamente. 88
Tabela 12. Severidade (S), eficiência de controle (EC), área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), número de lesões (NL) e área abaixo da curva de progresso das lesões (AACPL) para plantas de tomate pulverizadas com os formulados (F) e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. 95

1 INTRODUÇÃO

A produção de tomate alcançou uma área total de 55,6 mil ha no Brasil no ano de 2020, e aproximadamente 65% desta área é destinada para cultivo de tomate de mesa. Neste mesmo ano, a produção foi de 3,9 milhões de toneladas e embora apresente redução da área plantada e da produção, o rendimento por área tem aumentado nos últimos anos (IBGE, 2021).

A cultura de tomate é afetada por diversas doenças, dentre elas está a pinta preta ocasionada por fungos do gênero *Alternaria*, sendo uma das mais comuns e que vem ocasionando redução no rendimento e na qualidade da produção agrícola. A *Alternaria solani*, como é amplamente conhecida, foi reclassificada para *Alternaria linariae,* espécie predominante na cultura de tomate (WOUDENBERG et al., 2014).

O controle de doenças de plantas ocorre principalmente através do controle químico, no entanto, sua utilização de forma indiscriminada pode resultar em poluição ambiental, seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos utilizados (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018), além de colocar em risco a saúde do agricultor e também do consumidor final (GAUR; SHARMA, 2010). Dessa forma, buscamos na natureza produtos menos tóxicos e eficientes no controle de doenças de plantas.

Uma alternativa é o uso de óleos essenciais. Os óleos essenciais (EO) são naturais produzidos pelo metabolismo secundário em plantas aromáticas, contendo compostos aromáticos voláteis (ABD EL-GAWAD, 2016), altamente antimicrobianos e biologicamente ativos. Além disso, os óleos essenciais vem ganhando destaque na agricultura, pois possuem características importantes como atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida.

Para fungos do gênero *Alternaria*, os óleos essenciais podem reduzir/inibir o crescimento micelial, produção e germinação de esporos, prejudicando a morfologia e integridade das membranas (WAN et al., 2019), além de promover ativação de mecanismos de defesa da planta contra os patógenos (STANGARLIN et al., 2011). A ativação destes mecanismos envolve principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), metabolismo oxidativo e alterações estruturais (MURPHY, 2013).

A aplicação de óleos essenciais em plantas pode ser prejudicada devido a sua alta volatilidade, baixa estabilidade e solubilidade em água, rápida degradação e dificuldade de atravessar membranas, o que prejudica sua performance em aplicações (BONIFÁCIO et al., 2014). Para melhorar a eficiência de formulações com óleos essenciais, têm sido utilizadas abordagens novas como a nanotecnologia. Exemplo positivo pode ser observado no trabalho

de Mossa et al. (2021), que verificaram eficiência de controle de uma doença do pepino causada pelo fungo *Alternaria*, utilizando nanoemulsões dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Nigella sativa.*

Devido ao fato da cultura de tomate ser economicamente importante para o mundo, e pela busca por ferramentas mais sustentáveis no controle de doenças comuns, como a pinta preta de tomateiro estar aumentando, nossa linha de pesquisa recebe impulso inovador. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi responder as seguintes perguntas:

(i) Os óleos essenciais inibem o crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp.?

(ii) Os óleos essenciais são eficientes no controle da pinta preta em plantas de tomate?

(iii) Nanoformulações de fungicidas com óleo essencial são eficientes no controle de *Alternaria* spp. *in vitro* e da pinta preta em plantas de tomateiro?

(iv) As nanoformulações desenvolvidas a partir de óleo essencial apresentam estabilidade físico-química?

(v) As nanoformulações promovem indução de resistência contra a pinta preta de tomateiro?

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura de tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos vegetais mais consumidos no mundo, além de ser base para outros produtos alimentícios (COYAGO-CRUZ et al., 2019). Hortaliça de grande aceitação no mercado consumidor, que aliado ao seu elevado valor nutricional e fonte de vitaminas A e C, sais minerais como potássio e magnésio, proporcionam expressiva produção no Brasil e no mundo (MELO et al., 2014).

O cultivo do tomate pode ocorrer em diversas regiões, podendo ser cultivado em vários países, devido seu desenvolvimento ocorrer em condições de clima tropical, subtropical e temperado. Do total de tomate produzido no mundo, na ordem de aproximadamente 130 milhões de toneladas por ano, 88 milhões de 33 toneladas são consumidas in natura enquanto que os 42 milhões de toneladas restantes são destinadas à indústria (FOODNEWS, 2020).

A produção global de tomate é 5,1% maior dos últimos anos (FOODNEWS, 2020), e o Brasil encontra-se em oitava colocação no ranking de produção de tomate. De acordo com Rodrigues (2016), a cultura de tomate apresenta elevada importância no agronegócio brasileiro, em especial no segmento das hortaliças, criando cerca de 300 mil vagas de trabalho, sendo 280 milhões de reais gerados só com mão-de-obra. O tomate gera 16% do PIB, movimentando valores superiores a 2 bilhões de reais.

Devido à sua adaptação às condições climáticas do Brasil, pode ser facilmente cultivado em praticamente todos os estados (FILGUEIRA, 2008). Embora a área destinada à produção tenha reduzido nos últimos anos, a produtividade (produção por unidade de área) tem aumentado (4,2% de 2017 a 2020) (IBGE, 2021), alcançando a média de 71 t ha^{-1}, isso só foi possível graças as tecnologias desenvolvidas constantemente.

Um dos principais fatores que causa sazonalidade no volume de produção e no preço do tomate no país está relacionado com a pressão de um amplo número de pragas e doenças (FILGUEIRA, 2008), além da diversidade das condições climáticas existentes, que permitem o desenvolvimento da doença em alguns períodos do ano. Dessa forma, a resiliência de culturas com tamanha importância econômica precisa ser aumentada a fim de garantir alta produtividade e oferta no mercado consumidor de maneira constante.

2.2 Doenças

Durante seu ciclo de vida, as plantas são expostas a múltiplos estresses ambientais, tanto abióticos como bióticos, influenciando seu crescimento e desenvolvimento. Os fatores bióticos podem ter uma influência benéfica no crescimento das plantas, como na simbiose, mas também efeitos negativos, como herbivoria, infecção por patógenos ou alelopatia (CIURA; KRUK, 2018). Dessa forma, alguns fitopatógenos representam grande ameaça à produtividade das culturas e ao abastecimento de alimento para a crescente população mundial (ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018).

A cultura de tomate pode ser afetada por mais de uma centena de doenças, que ocorrem desde a emergência e durante todo o seu ciclo. Sob condições normais de cultivo, entretanto, poucas delas ocorrem simultaneamente; a presença e a intensidade de cada uma vai depender basicamente da resistência da cultivar, da população do patógeno e vetores, da virulência e das condições ambientais (LOPES; REIS, 2011). Segundo estes autores, o tomateiro é suscetível a doenças como: a podridão de colo, murcha de verticílio, murcha de esclerócio, pinta preta, septoriose, cranco bacteriano, pinta bacteriana, topo amarelo, mosaico dourado do tomateiro, nematoide de galhas e a murcha de fusarium.

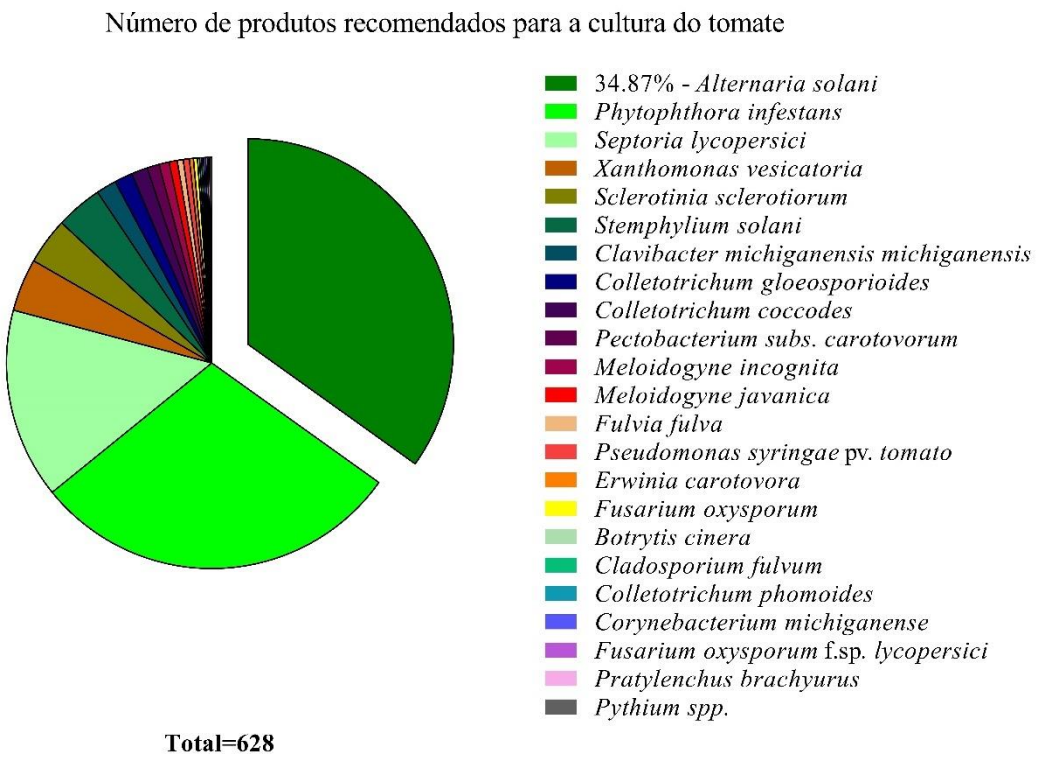

Figura 1. Número de produtos recomendados para controle de doenças na cultura de tomate. Pesquisa realizada na Plataforma AGROFIT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento durante o mês de março de 2021.

Devido ao número de doenças, existem no mercado grande número de produtos registrados para seu controle. De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), as doenças que mais apresentam produtos registrados para controle são (em ordem decrescente de número de registros): (i) pinta preta (*Alternaria solani*) com 219 produtos, (ii) requeima (*Phytophthora infestans*) com 184 e (iii) mancha de septória (*Septoria lycopersici*) com 94 produtos registrados (Figura 1) (MAPA, 2021).

A pinta preta é responsável por 34,87% do número total de produtos recomendados. O grande número de produtos registrados para o controle desta doença mostra sua importância no cenário brasileiro, além do interesse das empresas detentoras de tecnologias em minimizar as perdas.

2.3 Pinta preta de tomateiro

Dentre as várias doenças que afetam as lavouras de tomate, a pinta preta ocasionada por fungos do gênero *Alternaria* são comuns em todas as lavouras do mundo. A *Alternaria solani*, como é amplamente conhecida, foi reclassificada por (WOUDENBERG et al., 2014),

alterando sua nomenclatura para *Alternaria lineariae*. Este fungo pode infectar as plantas em todos os estádios de desenvolvimento, causando perdas consideráveis na colheita (BASHIR et al., 2016).

Favorecida por períodos de altas temperaturas e umidade, a pinta preta de tomateiro é uma doença policíclica, cujos primeiros sintomas são verificados nas folhas mais velhas, e que, posteriormente evoluem para toda a parte aérea da planta. O progresso do processo infeccioso e o aumento da suscetibilidade estão associados ao aumento da idade das plantas e ao início do período de frutificação. Durante essa fase, ocorre uma demanda maior de aúcares e nutrientes para a formação de frutos, em detrimento da folhagem, o que favorece o processo infeccioso em órgãos exportadores (ROTEM, 1994).

A *Alternaria solani* desenvolve seu ciclo biológico completo no tomateiro, todavia, pode apresentar uma fase saprofítica associada a matéria orgânica ou ainda sobreviver no solo por longos períodos na forma de clamidósporos (ROTEM, 1994). Podem sobreviver ainda em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas no transporte dos frutos, os quais também constituem fonte de inóculo inicial para cultivos subsequentes (PEREIRA et al., 2013).

Em geral, os conídios são disseminados principalmente pelo vento, água de chuvas e irrigação, sementes e implementos agrícolas. A germinação do patógeno ocorre em ampla faixa de temperatura, 6 a 32°C. Contudo, as temperaturas mais favoráveis situam-se entre 28 a 30°C. Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições. Nestas condições, os conídios germinam rapidamente e a pronta formaçao de apressórios permite ao fungo penetrar diretamente pela cutícula da folha. A colonização dos tecidos é intercelular e provoca alterações em diversos processos fisiológicos, exteriorizando-se na forma de lesões pardas com presença típica de áreas concêntricas. De maneira geral, os primeiros sintomas aparecem três a cinco dias após a penetração e a expansão das lesões e favorecida por períodos de altas temperaturas e umidade (PEREIRA et al., 2013).

O ciclo infeccioso da doença pode ser dividido em ciclo primário e ciclo secundário. No ciclo primário, ocorre a chegada do inóculo de uma planta vizinha através da **sobrevivência,** iniciando os processos de **infecção, colonização** e **reprodução** no tecido. Após a reprodução, estes esporos serão **disseminados** para uma nova planta. A diferença do ciclo secundário, é que estes esporos produzidos não irão permanecer em restos culturais até conseguirem ser **disseminados** para uma nova planta, neste caso os esporos irão infectar a mesma planta, promovendo ciclos policíclicos da doença (Figura 2).

A doença caracteriza-se pela presença de manchas pequenas de cor marrom escura, circundadas ou não de um halo amarelado. À medida que a lesão cresce, formam-se anéis concêntricos, característicos desta doença (FREITAS FILHO et al., 2008) (Figura 3). Quando não é controlada adequadamente há severa destruição da área foliar e, nos frutos, verifica-se podridão deprimida, circular, próxima ao pedúnculo, coberta por mofo preto (ALVARENGA, 2013). Devido à alta agressividade com que se desenvolve, a pinta preta provoca perdas diretas por infectar os frutos e indiretas pela redução do vigor da planta, reduzindo o crescimento devido ao decréscimo da fotossíntese, pelos danos à área fotossinteticamente ativa, além da ocorrência da desfolha em estádios mais avançados da doença (ALVARENGA, 2013).

Para o controle dessa doença, a prática mais empregada é a utilização de fungicidas, devido à facilidade de aplicação somada com os resultados imediatos. Além disso, embora existam várias opções de fungicidas recomendados para combater a pinta preta de tomateiro, o uso indiscriminado de agrotóxicos aumenta consideravelmente os riscos.

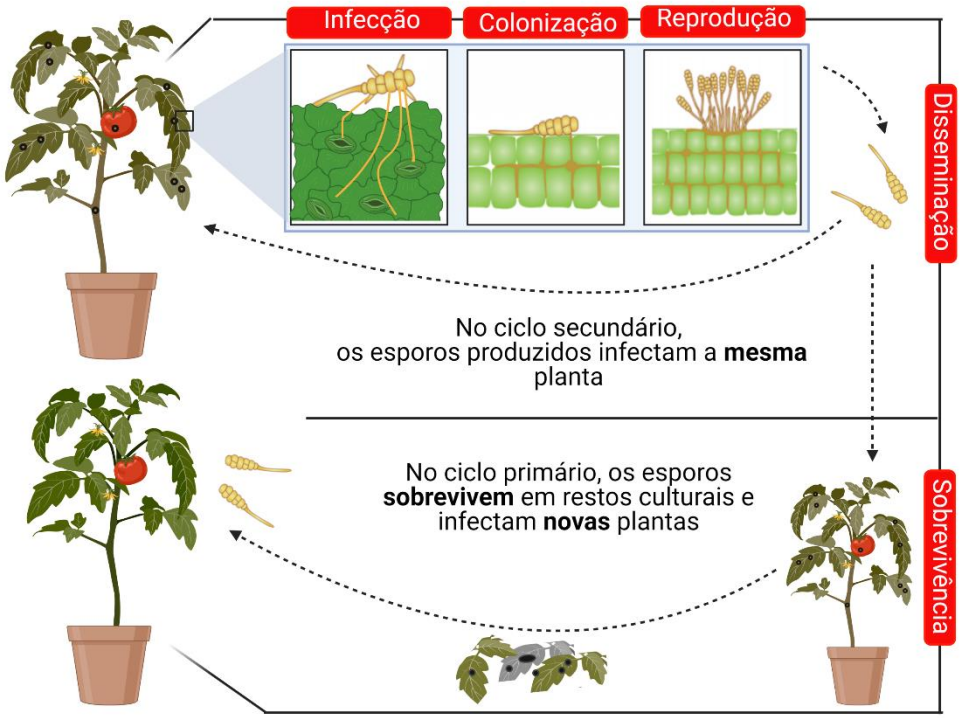

Figura 2. Ciclo da pinta preta de tomateiro, destacando as etapas do ciclo primário e secundário de infecção. Fonte: BioRender.com.

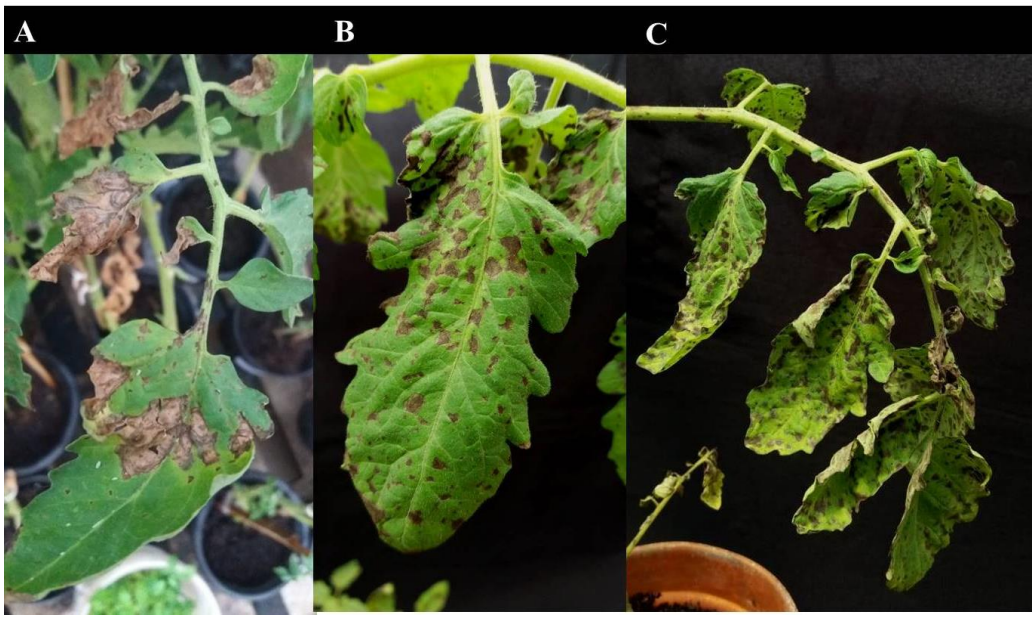

Figura 3. Sintomas típicos da pinta preta de tomateiro promovida por isolados *Alternaria* spp. Fotos: Arquivo pessoal.

2.4 Controle

Desde o início do controle de doenças até os dias atuais, muito se evoluiu no número de produtos registrados, que apresentam diferentes mecanismos de ação, e da mesma forma, os microrganismos acompanharam a evolução, tornando-se cada vez mais adaptados e resistentes aos métodos de controle tradicionais.

2.4.1 Controle químico

O controle químico, método tradicionalmente utilizado para o controle de doenças do tomate, é baseado na utilização de moléculas orgânicas ou inorgânicas, obtidas naturalmente ou sintetizadas, para a proteção das plantas contra os patógenos. Além de ser um dos métodos mais importantes de controle de doenças, pois é eficiente e economicamente viável, garantindo a alta produtividade e qualidade da produção (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

Atualmente, observa-se a dependência a poucas moléculas presentes em fungicidas sistêmicos que surtem efeito significativo no controle de doenças de plantas, sendo aquelas dos grupos triazóis (DMIs), estrobilurinas (QoIs) e inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) as mais utilizadas. A partir da década de 2010, as misturas de grupos químicos como os inibidores de desmetilação (DMI) + inibidores da quinona externa (QoI) passaram a apresentar eficiência reduzida no controle de algumas doenças, e novas misturas foram

introduzidas no mercado. Esse período também foi marcado pelo aumento do uso de produtos multissítios associados com fungicidas sistêmicos (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

2.4.2 Problemas

O uso não judicioso de pesticidas químicos visando aumentar a produção agrícola pode ocasionar contaminação do solo, das águas subterrâneas e dos sedimentos. Além disso, uso extensivo de pesticidas em práticas agrícolas tem sido associado a problemas de saúde humana e contaminação ambiental em todo o mundo (DE QUEIROZ et al., 2018). O uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz, colocando em risco a eficiência do método.

A resistência é um dos mais importantes problemas do controle químico de doenças de plantas (GHINI; KIMATI, 2002). A grande diversidade das populações de fungos e sua intensa capacidade de multiplicação fornecem uma ampla oportunidade para seleção de linhagens resistentes surgidas espontaneamente na população (GHINI; KIMATI, 2002). Mudanças genéticas que resultam na resistência de um patógeno a fungicidas ocorrem com maior facilidade com compostos que atuam primariamente em um ou poucos passos do metabolismo da célula fúngica, do que com fungicidas que interferem em muitos passos do processo metabólico, os multissítios, por exemplo (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

Esta situação está levando os pesquisadores a explorar abordagens novas e não convencionais (CAMÓ et al., 2019), objetivando um manejo eficiente que possa reduzir os gastos com insumos e minimizar problemas com contaminação. A utilização do controle biológico, indução de resistência, controle físico, controle alternativo, sistema de prevenção entre outros, tem apresentado resultados satisfatórios no manejo das principais doenças do tomateiro. Além disso, produtos oriundos de plantas medicinais chamam atenção como novas propostas para o controle de doenças em plantas.

2.5 Óleos essenciais

Desde os tempos antigos, as plantas medicinais têm sido uma fonte valiosa de vários compostos terapêuticos e ainda representam fonte de novos produtos naturais ou seus derivados com atividades biológicas significativas (ABU KHALAF, 2016). Considerado uma das maiores biodiversidades do planeta e fonte de substâncias bioativas, o Brasil vem despertando o interesse para a área dos produtos naturais. Por este fato, a pesquisa e a

descoberta de novos compostos bioativos além de proporcionar o avanço da pesquisa multidisciplinar, contribui com o desenvolvimento tecnológico nacional (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Óleos essenciais (EO) são compostos naturais produzidos pelo metabolismo secundário em plantas aromáticas, contendo compostos aromáticos voláteis (ABD EL-GAWAD, 2016), altamente antimicrobianos e biologicamente ativos. Os produtos a base de plantas apresentam grande diversidade de compostos que agem sozinhos ou sinergicamente, podendo apresentar atividades atraentes, desalojantes ou repelentes (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009).

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados em pesquisas para desenvolvimento de "Pesticidas Verdes". Ademais, apresentam inúmeras vantagens sob o produto sintético, tais como obtenção de matéria-prima em recursos renováveis, rapidez na degradação, não deixando resíduos nos alimentos e nem no meio do ambiente (SOARES et al., 2011). Por serem produtos naturais, biodegradáveis e voláteis, estes se tornam menos prejudiciais ao meio ambiente, geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos, e podem atuar em várias moléculas-alvo ao mesmo tempo (OOTANI et al., 2011).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 2013), OE são considerados como produtos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS). Além disso, já foram encontrados resultados positivos no controle de doenças de plantas. Para *A. alternata*, por exemplo, óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* e O*riganum vulgare* apresentam controle satisfatório (BLACK SOLIS et al., 2017). Para a cultura de tomate, (TOMAZONI et al., 2017) verificaram eficiência de controle *in vivo* e *in vitro* de *Alternaria solani* utilizando soluções com os óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* e *Cinnamomum camphora*.

O potencial antifúngico dos óleos essenciais é geralmente atribuído a sua composição química. Compostos como citral, geraniol, eugenol e isoeugenol apresentam ação fungicida nas fases líquida e de vapor, inibindo o crescimento micelal e germinação de esporos (ROZWALKA et al., 2020). O eugenol, por exemplo, pode promover danos irreversíveis nas membranas e colápso de células da *Alternaria alternata* (JING et al., 2018). Os componentes fenólicos dos óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, causando um aumento da permeabilidade e vazamento de componentes vitais intracelulares ou deficiência dos sistemas de enzimas microbianas (JING et al., 2018).

Os óleos essenciais também podem atuar como elicitores de mecanismos de defesa da planta, através do aumento da atividade enzimática, como já verificado para os óleos de

Aloysia citriodora em plantas de pepino, aumentando a atividade de β-1,3-glucanases, fenilanina amônia-liase (FAL), quitinases e outras proteínas relacionadas à defesa vegetal (FREDDO et al., 2016). Efeitos indiretos como a indução de fitoalexinas também foram observadas com aplicações de preparados de plantas bioativas no controle de doenças do tomate, ocasionadas por fungos como *Alternaria linariae* e *Septoriose lycopercisi* (PIETROBELLI, 2019).

No entanto, o uso de óleos essenciais como composto livre pode ser prejudicado por suas características inerentes, como alta volatilidade, predisposição à degradação prematura, baixa solubilidade em água, estabilidade, dificuldade de atravessar as membranas lipídicas das células ou apresentarem tamanho molecular excessivamente alto, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia (BONIFÁCIO et al., 2014). Algumas tecnologias, como o encapsulamento e a nanotecnologia podem reduzir à degradação destes compostos no ambiente e aumentar a eficiência e vida útil das formulações a base de óleos essenciais (FRACETO et al., 2020).

2.6 Nanotecnologia na formulação

A nanotecnologia é uma abordagem inovadora que tem aplicações potenciais na investigação nutracêutica, uma vez que melhora a absorção de compostos bioativos, protege contra a degradação prematura e prolonga a vida útil, além de melhor a sua absorção celular devido a redução do tamanho das partículas, resultando em toxicidade diminuída (BONIFÁCIO et al., 2014; WANG et al., 2014).

Os nanopesticidas são relatados como “mais potentes” quando comparados com os análogos pois requerem doses menores de aplicação, consequentemente, reduzem os custos finais da cultura produção (KAH; HOFMANN, 2014; ADISA et al., 2019). A absorção de nanopesticidas ocorre quando uma partícula penetra nas paredes celulares das plantas após a aplicação. A parede celular atua como uma barreira ambiental semipermeável que regula o tráfego de materiais exógenos através da membrana celular através de vários poros para a célula vegetal. Portanto, o tamanho, carga e físico-química dos nanopesticidas desempenham um papel crítico em sua absorção por esses poros (FRACETO et al., 2020).

Os nanopesticidas com um tamanho menor que o diâmetro dos poros da parede celular podem penetrar facilmente na parede celular e atingir a membrana plasmática (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009). Consequentemente, os nanopesticidas podem entrar nas células vegetais por meio de endocitose, ligando-se a canais iônicos ou proteínas

transportadoras, ou pela formação de complexos associados com os transportadores da membrana plasmática (MCKNIGHT et al., 2003). Uma vez no citoplasma da célula, nanopesticidas também podem interagir com organelas celulares, DNA, hormônios, proteínas, e outros compostos celulares e afetam a planta bioquímica, metabólica ou reações fisiológicas em um determinado local.

A nanotecnologia agrícola provou ser um método bem sucedido para resolver diferentes problemas agrícolas. Devido a alta volatilidade dos óleos essenciais e da pequena quantidade produzida pela planta há dificuldade de sua viabilização para aplicação em campo (NASCIMENTO et al., 2007). Esse problema pode ser atenuado empregando a nanotecnologia, que favorece a redução de ingrediente ativo, imiscibilidade dos óleos em soluções aquosas, estabilidade e efeitos antimicrobianos aumentados (BRAVO CADENA et al., 2018).

Dessa forma, para melhorar a eficiência das aplicações de óleos essenciais, a nanotecnologia também proporciona menor fitotoxidade às plantas, como já constatado por (CRUZ et al., 2018), utilizando formulações com óleo essencial de *Lippia gracilis* no controle do fungo *Thielaviopis paradoxa* em coqueiros. A nanoemulsão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* mantém a bioatividade de seus compostos e aumenta sua solubilidade em água (LI et al., 2019). Óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Cinnamomum verum*, *Mentha* x *piperita* e *Syzygium aromaticum* nanoformulados aumenta a atividade fungicida dos mesmos, além de melhorar sua estabilidade (WAN et al., 2019). Nanoemulsão do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e *Nigella sativa* na proporção 2:1 controla doenças da pós colheita do pepino, incluindo uma espécie de alternária (*Alternaria* sp.) (MOSSA et al., 2021). Outro exemplo positivo pode ser citado, como por exemplo, a maior eficiência do óleo essencial de *Cinnamomum* para controle de patógenos de sementes (BRAVO CADENA et al., 2018).

As nanopartículas possuem características distintas devido à sua grande área de superfície para relação de volume, entrega direcionada e mecanismos de liberação lenta de ingredientes ativos (JOSHI; DE BRITTO; JOGAIAH, 2021). Com o recente avanço da pesquisa no campo da nanotecnologia, muitos estudos relataram o papel das nanopartículas como eliciadoras da resistência sistêmica induzida em um grande repertório de interações patógeno-hospedeiro (QUITERIO-GUTIÉRREZ et al., 2019; NANDINI et al., 2020). Emulsões oleosas com *Cymbopogon martinii* e *Melaleuca alternifolia* também promoveram o aumento da atividade de enzimas oxidativas e proteínas envolvidas na defesa vegetal (LUIZ, 2017).

Embora a utilização da nanoemulsão de óleos essenciais no controle de doenças seja uma abordagem inovadora e com alta eficiência (LI et al., 2019), a viabilidade econômica deste negócio compromete sua comercialização em composição pura, devido ao alto custo para extração dos óleos. Dessa forma, a utilização de misturas com agrotóxicos pode auxiliar na disseminação deste potencial.

Atualmente em níveis domésticos, misturas de tanque de fungicidas (estrobilurinas + triazois) com fosfito de cobre (CuPhi) apresentaram efeito sinérgico e/ou aditivo na eficácia do fungicida contra fungos importantes (CARMONA; SAUTUA; PÉREZ-HERNÁNDEZ, 2019). A eficácia destas misturas é justificada pelo efeito aditivo no controle de doenças, além de reduzir as chances de seleção de microrganismos resistentes ao modo de ação destes produtos, prolongando a vida útil de seus ingredientes ativos (LILJEROTH et al., 2016). Dessa forma, a utilização de misturas triplas e de produtos bioativos impulsiona estudos inovadores, que além de buscar na natureza moléculas eficientes, desenvolvam formulações e devolvam para a sociedade soluções sustentáveis.

Diante do exposto, unir ingredientes ativos sítio-específicos com produtos multissítios e/ou indutores de resistência que apresentem moléculas biodegradáveis como os óleos essenciais através da nanotecnologia, poderia alavancar uma estratégia de controle mais eficiente, duradoura e sustentável. Dessa forma, a seleção de óleos essenciais potenciais, a utilização destes óleos em mistura tripla com fungicidas e a utilização da nanotecnologia, poderia contribuir substancialmente para o controle da pinta preta de tomateiro.

As seguintes hipóteses são levantadas:

(i) Os óleos essenciais apresentam eficiência de controle sobre isolados de *Alternaria* spp. *in vitro* e da pinta preta de tomateiro;

(ii) É possível utilizar a nanotecnologia para realizar formulações de fungicidas com óleos essenciais; e

(iii) Formulações a partir de óleos essenciais são eficientes no controle de *Alternaria* spp. *in vitro* e *in vivo*, apresentam boa estabilidade físico-química e induzem a resistência de plantas contra a pinta preta de tomateiro.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Condição experimental

Os experimentos foram desenvolvidos na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo, sob supervisão do Professor Sérgio Florentino Pascholati, durante os anos de 2019 e 2020.

3.1.1 Obtenção dos isolados fúngicos

Utilizou-se cinco isolados de *Alternaria* spp. oriundos de plantas sintomáticas; quatro destes cedidos pelos professores Lucas Abreu e Eduardo S. G. Mizubuti da Universidade Federal de Viçosa (MG) (Tabela 1) e um coletado em Planalto (RS). As amostras obtidas dos isolados fúngicos foram repicadas em placas de Petri (90 x 15 mm, J. Prolab®) contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram incubadas em câmara do tipo B.O.D. em temperatura de 25ºC (fotoperíodo de 12 horas), quando da realização dos experimentos. Micrografias dos conídios podem ser observadas na Figura 4.

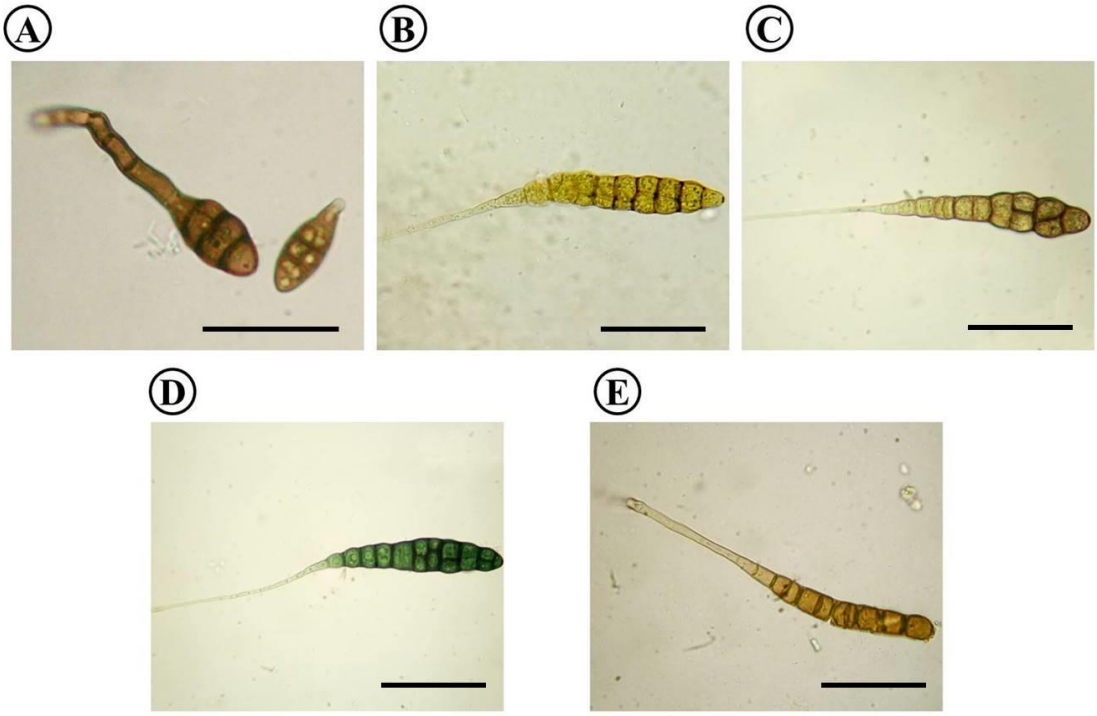

Figura 4. Esporos de isolados de *Alternaria* spp. avaliados: Isolado I (A), Isolado II (B), Isolado III (C), Isolado IV (D) e Isolado V (E). Barra: 70 µm. Fotos: Arquivo pessoal.

A análise filogenética do isolado IV pode ser verificada em Rodrigues et al. (2010), e a descrição do procedimento para análise do isolado III está no item a seguir *(3.1.1.1)*.

Tabela 1. Origem dos isolados fúngicos e sua codificação para realização do experimento.

Origem	Codificação	Nº acesso ao GenBank
UFSM PL* (*Alternaria* sp.)	Isolado I	-
UFV UCB181 (*Alternaria solani* lato sensu)	Isolado II	-
UFV UCBV180 (*Alternaria linariae*)	Isolado III	-
UFV AS232 (*Alternaria linariae*)	Isolado IV	EGS 42.156
UFV AS185 (*Alternaria grandis*)	Isolado V	-

*Isolado no município de Planalto/RS, em plantas de tomate sintomáticas.

3.1.1.1 Procedimento de análise da filogenia dos isolados II e III

Isolados foram cultivados por cinco dias em placa de Petri, o micélio foi raspado e usado para extração de DNA, com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit da promega. A PCR foi realizada com os primers e seguindo os parâmetros descritos por LIU, WHELEN; HALL (1999). Os produtos de PCR foram purificados e enviados para sequenciamento pela macrogen Coreia. Os eletroferogramas foram editados com o programa SeqAssem e as sequências consenso foram usadas para compor por um alinhamento junto a sequências de rpb2 de isolados de referência de espécies de alternaria (*Alternaria* spp.) da Seção Porri, publicados Woudenberg et al. (2014). O alinhamento foi submetido a uma análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança, utilizando o software RAxML, implementado no portal Cipress. A análise foi realizada com o modelo de evolução padrão do programa e o suporte das árvores foi inferido através da análise de Bootstrap, com mil repetições. A árvore gerada foi editada no programa Inkscape (www.inkscape.org), e pode ser observada na Figura 5.

A árvore filogenética mostrou que o isolado UCB 180 se agrupou em um clado com alto suporte, contendo sequências de isolados de referência da espécie *Alternaria linariae*, considerada o principal agente etiológico da pinta preta de tomateiro, e antes nomeada de *A. tomatophila*. Já o isolado 181 foi agrupado em um clado composto por sequências de isolados de referência de quatro espécies diferentes, não diferenciadas por este marcador, sendo então identificado somente como *Alternaria* spp. (Figura 5).

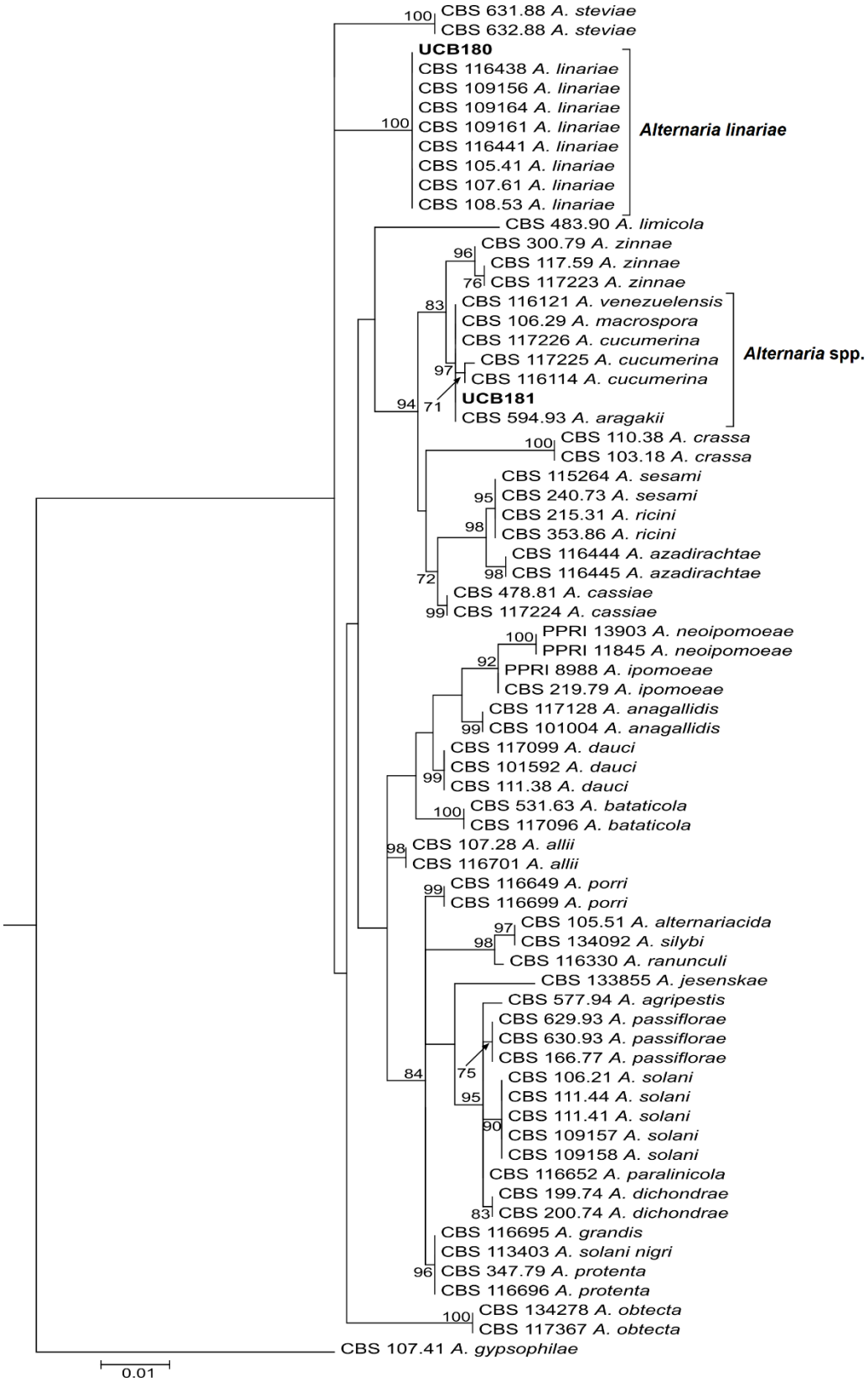

Figura 5. Árvore filogenética dos isolados II (UCB 181) e III (UCB 180) de *Alternaria* spp.

3.1.2 Obtenção dos óleos essenciais e análise da composição química

Os óleos essenciais A, B, C, D, E e F foram extraídos de folhas frescas de plantas aromáticas cultivadas a campo, na Universidade Federal de Santa Maria, campus Frederico Westphalen (RS), no Laboratório de Extrativos Aromáticos. Os óleos essenciais foram codificados em letras devido ao potencial de patenteabilidade dos resultados.

A extração dos óleos essenciais foi realizada por meio de hidrodestilação por aparelhos Clevenger e a sua análise cromatográfica realizada para conhecimento da composição química. A análise foi realizada pelo Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEV - UFSM), e pelo Laboratório de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN – Esalq/USP), através de cromatógrafo CG-MS TIC a gás, com detector de ionização em chama (DIC). Os constituíntes dos óleos essenciais foram identificados com base no índice de retenção (IR) e dos modelos de fragmentação de espectro de massas, através do programa Chemstation Agilent e as utilizações da base de dados NIST (BURGESS; LINSTROM; MALLARD, 2016), sendo os resultados expressos em porcentagem.

3.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de isolados de *Alternaria* spp. *in vitro.*

A fim de determinar os melhores óleos essenciais e sua concentração para inibir o crescimento dos isolados fúngicos, desenvolveu-se experimentos em delineamento inteiramente casualizado, utilizando cinco isolados de *Alternaria* spp., e nove concentrações [0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8 e 3,2 (µL mL^{-1})] para os seis óleos essenciais (A, B, C, D, E e F). Todos os tratamentos foram compostos por quatro repetições, e a unidade experimental considerada uma placa de Petri.

Em câmara de fluxo laminar, os tratamentos foram incorporados ao meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) fundente, a 50ºC, juntamente com o agente surfactante Tween 20 (0,05 mL), e para a testemunha (0,0 µL mL^{-1}) utilizou-se apenas o meio de cultura BDA. Após a solidificação dos meios, transferiu-se discos de micélio dos isolados fúngicos com 5,0 mm de diâmetro para o centro das placas de Petri contendo seus respectivos tratamentos. As placas inoculadas foram vedadas com parafilme para que não ocorresse evaporação dos constituintes e incubadas em câmara tipo B.O.D., conforme as condições citadas para a obtenção dos isolados.

Quando a testemunha atingiu a borda da placa realizou-se a última medição (média de duas medidas de diâmetros opostos), podendo-se determinar o crescimento micelial. A partir

dos valores médios do tratamento com a concentração 0,0 µL mL^{-1} (testemunha), foi possível avaliar a variável inibição do crescimento, calculada para cada concentração em relação aos valores da testemunha, com resultados expressos em porcentagem. Os valores de porcentagem de inibição dos tratamentos foram utilizados para determinar o EC_{50} através do ajuste da regressão linear, que corresponde a concentração do produto necessária para controle de 50% do fungo.

3.3 Teste de metodologias

Foram desenvolvidos testes preliminares para ajustar as metodologias dos experimentos.

3.3.1 Teste de metodologia para produção e suspensão de esporos

Para produção de esporos viáveis do isolado III de *Alternaria* spp. foram testadas algumas metodologias: períodos de crescimento (cinco, sete e dez dias) do isolado III no meio BDA e períodos de incubação na luz negra (12, 24 e 48 horas), e concentração de esporos, sendo que a melhor produção de esporos foi obtida com as seguintes metodologias.

Para a produção de esporos em menor quantidade (experimentos menores), as colônias do isolado III foram crescidas em BDA a 25ºC e fotoperíodo de 12 horas e câmaras do tipo BOD, e após cinco dias de crescimento o micélio foi raspado com auxílio de alça de Drigalski, 10 mL de água destilada e Tween. As placas foram mantidas, sem tampa, a 22ºC, sob 6 lâmpadas de luz negra 30 W (Sylvania® - 1,20 m de comprimento, distanciadas 10 cm entre si e posicionadas a 10 cm de altura das placas), em fotoperíodo de 16 horas de escuro e 8 horas de luz, para produção de conídios. Após 48 horas, os conídios foram removidos com adição de 10 mL de água destilada em seguida da raspagem superficial da colônia com alça de Drigalski. As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições durante 24 horas. Filtrou-se a suspensão em dupla camada de gaze esterilizada, a qual foi recolhida em béquer e calibrada com auxílio de hemacitômetro.

Metodologia de (RODRIGUES et al., 2010): Para elevar a produção de esporos modificou-se o protocolo deste autor, onde as colônias do isolado III cresceram em meio batata-dextrose (BD) a 25ºC, no escuro, sob agitação em shaker 200 rpm durante sete dias; após este período, a massa de micélio foi triturada em homogeneizador mecânico (Ultra-turrax) e depositada em meio V_8 em placas de Petri, incubando-as sem tampa em sala de

crescimento na temperatura de 22ºC, sob luz negra 30 W (Sylvania® - 1,20 m de comprimento, distanciadas 10 cm entre si e posicionadas a 10 cm de altura das placas) com 16 h de escuro e 6 h de luz, durante 48 h. Após este período as placas foram lavadas com água destilada e alça de drigalski, e as placas eram incubadas novamente nestas condições durante 24 h. A segunda lavagem produzia maior número de esporos do que a primeira às 48 h. Os esporos foram lavados e a suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada, a qual foi recolhida em béquer e calibrada com auxílio de hemacitômetro.

Foram testadas três concentrações de esporos para o isolado III, com: 8×10^3, 1×10^4 e 1×10^6 [esporos] mL^{-1}, e determinou-se a concentração de 1×10^4 [esporos] mL^{-1} como padrão para inoculação das plantas, pois a maior concentração destruiu as plantas em apenas três dias e a menor concentração não foi possível analisar os danos em cinco dias.

Apenas os isolados II e III promoveram sintomas nas plantas de tomate utilizando estas metodologias, e devido a facilidade de trabalho, escolheu-se o isolado III (*Alternaria linariae*) para dar seguimento aos experimentos.

3.3.2 Teste de doses para os experimentos *in vivo*

O experimento foi composto por aplicações foliares dos óleos essenciais B e C para o controle da pinta preta de tomateiro. Para isso, plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram cultivadas em vasos plástico com capacidade de 3 L de substrato comercial Plantmax®, mantidas em casa-de-vegetação e irrigadas diariamente.

Aos 40 dias após transplante as plantas foram pulverizadas com uma solução composta por óleo essencial nas doses de 2,5 ou 5,0 µL mL^{-1}, no volume aproximado de 50 mL por planta. Os óleos essenciais foram diluídos em água destilada com auxílio de tween 20, na proporção de 1:1 do óleo. Os tratamentos estão descritos na Tabela 2. Foram utilizadas cinco plantas por tratamento, e cada planta caracterizou-se como uma repetição.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos realizados em plantas de tomate tratadas previamente (-72 horas) com as doses dos óleos essenciais B, C e água, e a inoculação (I) a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A).

Tratamento	-72 h/Dose	0 h
Óleo essencial B [OB1+ I]	2,5 µL mL^{-1}	Inóculo
Óleo essencial B [OB2+ I]	5,0 µL mL^{-1}	Inóculo
Óleo essencial C [OC1 + I]	2,5 µL mL^{-1}	Inóculo
Óleo essencial C [OC2 + I]	5,0 µL mL^{-1}	Inóculo
Controle [A + I]	Água	Inóculo
Testemunha [A+ A]	Água	Água

Após 72 horas da aplicação dos tratamentos, realizou-se a inoculação com suspensão de esporos do isolado III de *Alternaria* spp. contendo 1 x 10^5 esporos mL^{-1} até que ocorresse escorrimento foliar. Após a inoculação de esporos, as plantas foram mantidas em câmera úmida com auxílio de umidificadores durante 48 h. Após este período as plantas permaneceram em casa de vegetação.

No quinto dia após a inoculação as plantas apresentavam-se sintomáticas e realizaram-se as avaliações. Foram avaliadas duas folhas do terço médio de cada planta, sendo escaneadas e submetidas ao software QUANT (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), obtendo as variáveis: severidade da doença, área foliar sadia e área foliar doente. A eficiência de controle foi calculada com os resultados de severidade em relação ao controle [A+I]. Outras variáveis de crescimento como o número de folhas e a altura das plantas também foram avaliadas.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativo ($p \leq 0,05$) procedida a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o pacote *ExpDes.pt* e o software R (Versão 4.0).

3.4 Eficiência dos óleos essenciais no controle da pinta preta

Utilizando os melhores resultados obtidos no teste de crescimento micelial, desenvolveu-se o experimento *in vivo* utilizando os óleos essenciais A, B, C e E. Com base no experimento anterior, determinou-se que a melhor dose dos óleos essenciais para ser utilizada *in vivo* seria de 2,5 µL mL^{-1}.

O experimento foi composto por aplicações foliares de óleos essenciais para o controle da pinta preta de tomateiro. Para isso, plantas de tomateiro cultivar Santa Clara foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 3 L de substrato comercial. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e irrigadas diariamente.

Aos 15 dias após transplante, as plantas foram pulverizadas com uma solução composta por óleo essencial na concentração de 2,5 µL mL^{-1} diluído em água destilada acrescido do agente surfactante Tween 20, na proporção de 1:1 de óleo, utilizando aproximadamente 50 mL de calda por planta.

Os tratamentos foram compostos pelas combinações descritas na Tabela 3. Foram utilizadas oito plantas por tratamento, e cada planta caracterizou-se como uma repetição.

Após 72 horas da aplicação dos tratamentos, realizou-se a inoculação do do isolado III de *Alternaria* spp. utilizando uma suspensão contendo 1 x 10^4 esporos mL^{-1} até o escorrimento foliar. As plantas foram mantidas em câmera úmida com auxílio de umidificadores durante 48 horas, condicionando ambiente favorável pro desenvolvimento da doença.

Tabela 3. Descrição dos tratamentos realizados em plantas de tomate tratadas previamente (-72 horas) com os óleos essenciais (O) A, B, C, E e água, e inoculadas a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A).

Tratamento	-72 h	0 h
[OA + I]	Óleo essencial A	Inóculo
[OB + I]	Óleo essencial B	Inóculo
[OC + I]	Óleo essencial C	Inóculo
[OE + I]	Óleo essencial E	Inóculo
Controle [A + I]	Água	Inóculo
Testemunha [A + A]	Água	Água

No quarto dia as plantas apresentavam-se sintomáticas e foram realizadas as avaliações. Foram coletadas três folhas do terço médio de cada planta, levados ao laboratório e escaneadas com auxílio de scanner digital. Foram escaneadas 15 folhas por tratamento, e dessa forma, considerou-se o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 15 repetições. Após obtenção das imagens, as áreas sintomáticas das folhas foram selecionadas e quantificadas pelo programa QUANT (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), e os valores expressos em porcentagem de doença. Outros resultados

gerados pelo software, como área foliar sadia, doente e total foram coletados e analisados estatisticamente.

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa R (Versão 4.0), e quando os tratamentos apresentaram-se significativos ($p \leq 0,05$) pela análise de variância, realizou-se a comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o pacote *ExpDes.pt*.

3.5 Processo da nanoformulação

3.5.1 Local

As formulações foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria, campus de Santa Maria (RS), no laboratório de Bioprocessos; e na Escola Superior em Agricultura "Luiz de Queiroz", campus de Piracicaba (SP), no laboratório de Geoquímica dos Solos. As formulações foram desenvolvidas durante os meses de fevereiro e março de 2020.

3.5.2 Formulações a base água e óleo essencial E

As formulações foram realizadas com base água e foram calculadas para um volume de calda de 200 L ha^{-1}. O óleo essencial E foi utilizado na dose fixa de 2,5 µL mL^{-1}, e todos os adjuvantes foram calculados neste padrão, 1:1 corresponde 100% da dose dos adjuvantes.

3.5.3 Fungicidas

Os fungicidas selecionados foram cedidos por empresas.

3.5.4 Aditivos

Os aditivos selecionados foram cedidos por empresa do ramo.

3.5.5 Procedimento experimental

Para o preparo das nanoemulsões utilizou-se o aparelho processador ultra-sônico de alta intensidade (200W) e frequência de 24kHz (Hielscher, Modelo UP 400S) com sonda titânio de 7 mm de diâmetro (GE 700 Nurtigen-Alemanha), com auxílio de agitador magnético. As formulações foram emulsionadas durante 10 minutos, com amplitude de 100%, e as combinações estão descritas na Tabela 4.

Todas as formulações foram mantidas em geladeira (11ºC) até a realização dos testes de eficiência.

Tabela 4. Código da formulação e combinações de ingrediente ativo de fungicidas, óleos essenciais e aditivos de formulações (valores em %): (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) e (IX).

D[1]	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	A[2]	A[2]	A[2]	A[2]
CF	**I[3]**	**II[3]**	**III[3]**	**IV[3]**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**
1	0	0	0	0	100	100	0	100	0
2	25	0	0	0	100	100	0	100	0
3	50	0	0	0	100	100	0	100	0
4	100	0	0	0	100	100	0	100	0
5	100	0	0	0	100	200	0	200	0
6	100	0	0	0	100	100	0	400	0
7	0	0	0	0	100	0	0	0	100
8	0	0	0	0	100	0	0	0	200
9	0	0	0	0	100	0	0	0	500
10	25	0	0	25	100	100	0	100	0
11	0	25	0	0	100	100	0	100	0
12	0	50	0	0	100	100	0	100	0
13	0	100	0	0	100	100	0	100	0
14	0	100	0	0	100	50	0	200	0
15	0	100	0	0	100	100	0	400	0
16	0	25	0	25	100	100	0	100	0
17	0	0	0	0	0	100	0	100	0
18	0	0	25	0	100	100	0	100	0
19	0	0	50	0	100	100	0	100	0
20	0	0	100	0	100	100	0	100	0
21	0	0	100	0	100	500	0	200	0
22	0	0	100	0	100	100	0	400	0
23	0	0	25	25	100	100	0	100	0
24	0	0	0	25	100	100	0	100	0
25	0	0	0	50	100	100	0	100	0
26	0	0	0	100	100	100	0	100	0
27	0	0	0	100	100	500	0	200	0
28	0	0	0	100	100	100	0	400	0
29	0	50	0	50	100	100	0	100	0
30	0	0	50	50	100	100	0	100	0
31	100	0	0	100	100	100	0	100	0
32	0	100	0	100	100	100	0	100	0
33	0	0	100	100	100	100	0	100	0
34	0	0	0	0	25	25	0	25	0
35	0	0	0	0	50	50	0	50	0
36	50	0	0	50	100	100	0	100	0
37	0	100	0	0	100	0	100	0	0

[1] D: Dose (mL L^{-1}) fixa. [2] A: Aditivos (mL L^{-1}): 1:1 do óleo essencial. [3] I, II, III e IV: Fungicidas considerando volume de calda de 200 L ha^{-1}.

3.6 Eficiência das nanoformulações desenvolvidas

As 37 formulações foram avaliadas quanto a sua eficiência em ensaios *in vitro e in vivo*, e todos os experimentos conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo (Esalq/USP), durante o ano de 2020.

3.6.1 Eficiência de controle *in vitro*

A eficiência de controle baseia-se na porcentagem que cada tratamento é eficiente em relação a testemunha doente; e para os experimentos *in vitro* é o crescimento ou germinação do fungo/esporo com água ou apenas meio de cultura padrão.

Crescimento micelial: Para selecionar as formulações mais promissoras, desenvolveram-se experimentos para avaliar a eficiência de controle do crescimento micelial do isolado III de *Alternaria* spp. Os 37 formulados foram misturados isoladamente em meio BDA, na proporção de 1:1 (v/v), alcançando a concentração de 50%, sendo vertidos em placas de Petri (90 x 15 mm, J. Prolab®). Após solidificação do meio, adicionou-se um disco de micélio (5 mm) de colônias puras do isolado III de *Alternaria* spp. no centro de cada placa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 38 tratamentos (37 formulados + testemunha), e quatro repetições, considerando cada placa Petri como uma unidade experimental. A testemunha correspondia tratamento com meio BDA e o disco de micélio apenas.

As placas foram vedadas e incubadas em câmara de crescimento na temperatura de 25ºC e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 10 dias. No décimo dia realizou-se a última medição (média de duas medidas de diâmetros opostos), podendo-se determinar o crescimento micelial. A partir dos valores médios da testemunha (apenas BDA), foi possível avaliar a variável eficiência de controle, calculada para cada formulação em relação aos valores da testemunha, com resultados expressos em porcentagem.

Germinação de esporos*:* Para a produção de esporos, as colônias do isolado III de *Alternaria* spp. foram crescidas em BDA a 25ºC e fotoperíodo de 12 horas incubadas em B.O.D, e após cinco dias de crescimento o micélio foi raspado com auxílio de alça de Drigalski e 10 mL de água destilada. As placas foram mantidas, sem tampa, a 22ºC, sob 6 lâmpadas de luz negra 30 W (Sylvania® - 1,20 m de comprimento, distanciadas

10 cm entre si e posicionadas a 10 cm de altura das placas), em fotoperíodo de 16 horas de escuro e 8 de luz, para produção de conídios. Após 48 horas, os conídios foram removidos com adição de água destilada em seguida da raspagem superficial da colônia com escova de cerdas macias. Filtrou-se a suspensão em dupla camada de gaze esterilizada, a qual foi recolhida em béquer e mantida a concentração de 1 x 10^4 esporos mL^{-1} (RODRIGUES et al., 2010).

Para avaliar a eficiência dos formulados no controle da germinação de conídios, utilizou-se a metodologia de Feng e Zheng (2007), utilizando conídios produzidos conforme metodologia citada anteriormente na concentração de 3 x 10^4 esporos mL^{-1}. Foram testadas três concentrações dos produtos, sendo: [dose de 75%], utilizou-se uma mistura de 1 mL dos formulados + 0,5 mL da suspensão de esporos, para [dose de 50%] utilizou-se 0,5 mL dos formulados + 0,5 mL da suspensão de esporos, e para [dose de 25%] utilizou-se mistura de 0,5 mL dos formulados + 1 mL da suspensão de esporos. Os tubos foram vedados com parafilme para evitar a evaporação de voláteis dos formulados, e mantidos durante 20 h em shaker com agitação de 100 rpm e temperatura controlada de 25ºC.

Os esporos foram avaliados em microscópio estereoscópio quanto a sua germinação (emissão de tubo germinativo) e avaliados 100 esporos aleatórios para contabilizar a porcentagem de germinação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 38 tratamentos [37 formulados + testemunha], três concentrações [25, 50 e 75%] e cada tratamento contou com três repetições.

A partir dos valores médios da testemunha, (suspensão de esporos + água), foi possível avaliar a variável eficiência de controle, calculada para cada nanoformulação em ambas concentrações em relação aos valores da testemunha, com resultados expressos em porcentagem.

3.6.2 Eficiência de controle *in vivo*

O experimento foi composto por aplicações foliares de óleos essenciais para o controle da pinta preta de tomateiro, ocasionada pelo fungo *Alternaria* spp. Para isso, plantas de tomateiro cultivar Santa Clara foram cultivadas em vasos plástico com capacidade de 3 L de substrato durante 15 dias. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e irrigadas diariamente.

Aplicação dos formulados nas doses de 50 e 100%, utilizando aproximadamente 50 mL de calda por planta, até o escorrimento superficial (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição dos tratamentos realizados em plantas tratadas previamente (-72 horas) com os formulados (F) e água, e inoculadas a 0 hora com o isolado III de *Alternaria* spp. ou água (A).

Tratamentos	-72 horas	0 hora
[F1+I]	F1	Inóculo
[F2+I]	F2	Inóculo
[F3+I]	F3	Inóculo
[F4+I]	F4	Inóculo
[F...+I]	F...	Inóculo
Controle [A+I]	Água	Inóculo
Testemunha [A+A]	Água	Água

Para produção de esporos foi utilizada a metodologia adaptada de Rodrigues et al. (2010), utilizando meio de cultivo batata-dextrose (BD) agitando em shaker a 110 rpm durante 7 dias a 25ºC no escuro. O meio foi triturado em homogeneizador mecânico (Ultra-turrax) e vertido sob placas com meio V_8 (suco de vegetais), as placas foram incubadas abertas em luz negra a 22ºC com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro durante 48 horas. Após 48 horas, as placas foram lavadas com água destilada e pincel de cerdas macias, e incubadas durante 24 horas nas mesmas condições citadas.

Após 72 horas da aplicação dos formulados, realizou-se a inoculação do patógeno através de suspensão contendo 1 x 10^4 esporos mL^{-1} até que ocorresse escorrimento foliar. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmera úmida com auxílio de umidificadores durante 48 horas.

No quarto dia as plantas apresentavam-se sintomáticas e foram realizadas as avaliações. Foram coletadas três folhas do terço médio de cada planta, levados ao laboratório e escaneadas com auxílio de impressora digital. Foram escaneadas 10 folhas por tratamento, e dessa forma, considerou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 39 tratamentos e 10 repetições. Após obtenção das imagens, as áreas sintomáticas das folhas foram selecionadas e quantificadas pelo programa Quant (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003) e os valores expressos em porcentagem de

doença. Análise de fitotoxidez através da escala de (EWRC, 1964). Outros resultados gerados pelo programa QUANT, como área foliar sadia, doente e total foram armazenados e analisados estatisticamente.

3.6.3 Análise estatística das nanoformulações

A análise estatística dos dados foi executada através do software R (Versão 4.0), através de análise de variância e teste de médias por Skott-knott, a 5% de probabilidade de erro. Devido ao fato do experimento gerar um grande quantidade de informações, foi necessário utilizar métodos multivariados para selecionar as melhores formulações, considerando o experimento com fatores biológicos. Dessa forma, utilizou-se o índice MGDI criado por Olivoto e Nardino (2020).

O índice MGIDI foi utilizado para ranquear as formulações, baseado na distância formulação-ideótipo multritraço, com foco na seleção e recomendação de tratamentos baseado em características múltiplas, conforme recomendam os criadores do método (OLIVOTO; NARDINO, 2020). As características requeridas como ideótipo para os experimentos foram as seguintes: (a) Experimentos *in vitro*: (i) maior eficiência de controle na germinação de esporos nas doses de 25, 50 e 75%; e (ii) maior eficiência de controle do crescimento micelial na dose de 50%; e (b) experimentos *in vivo*, nas doses de 50 e 100%: (i) menor severidade da doença, (ii) maior eficiência de controle, (iii) maior área foliar doente, (iv) maior área foliar total, (v) menor área foliar doente e (vi) menor fitotoxidez (escala EWRC).

De acordo com Olivoto e Nardino (2020), a teoria do índice MGIDI está centrada em quatro etapas principais: (i) redimensionar as características de modo que todas as variáveis tenham um intervalo de 0-100; (ii) usar a análise fatorial para contabilizar a estrutura de correlação e a redução de dimensionalidade dos dados; (iii) planejar um ideótipo com base em valores conhecidos/desejados;e características e (iv) calcular a distância entre cada tratamento ao ideótipo planejado. Esta última etapa é calculada da seguinte forma:

$$MDIGI_i = \left[\sum_j^f = 1\left(\gamma_{eu\ j}\gamma_j\right)^2\right]^{0,5} \quad \textbf{(1)}$$

em que MDIGI*i* é o índice de distância do tratamento-ideótipo multi-traço para o *i*º tratamento, yij é a pontuação do i ésimo tratmento no j ésimo fator (i= 1, 2,..., t; j= 1, 2,..., f), sendo t e f o número de tratamentos e fatores, respectivamente; e yj é a

pontuação j do tratamento ideal e portanto, apresenta os valores desejados para todas as características.

A diferença de seleção para todas as características foi calculada considerando uma intensidade de seleção de ~10%. A proporção do índice MGIDI do i-ésimo tratamento explicado pelo fator j (ωij) foi usado para mostrar os pontos fortes e fracos dos tratamentos, e foi calculado da seguinte forma:

$$\omega ij = \frac{\sqrt{D_{ij}^2}}{\sum_{j=1}^{f} \sqrt{D_{ij}^2}} \quad \textbf{(2)}$$

em que Dij é a distância entre o i ésimo tratamento e o tratamento ideal para o j ésimo fator. Contribuições fracas de um fator indicam que as características dentro de tais fatores estão próximos do tratamento ideal. Todos os procedimentos foram realizados no Software R (verão 4.0), utilizando o pacote metan (OLIVOTO; LÚCIO, 2020).

3.7 Caracterização da estabilidade físico-química

A caracterização e determinação da estabilidade físico-química das formulações foi realizada pela Universidade Estadual Paulista (Unesp), através do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, coordernado pelo prof Dr. Leonardo Fernandes Fraceto. As seis melhores nanoformulações foram escolhidas a partir da análise anterior para serem analisadas estruturalmente.

Realizou-se a caracterização e determinação da estabilidade físico-química das formulações, sendo analisadas algumas propriedades como: o diâmetro hidrodinâmico (tamanho), o índice de polidispersão, potencial zeta e a concentração em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Todas as formulações foram armazenadas em frascos âmbar em duas diferentes condições: ambiente (24ºC) e geladeira (11ºC).

3.7.1 Diâmetro médio e Índice de Polidispersão

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (*Dynamic Light Scattering* - DLS) foi utilizada para determinação do diâmetro hidrodinâmico e da distribuição de tamanho das partículas (índice de polidispersão). Essa avaliação foi realizada diluindo-se (10 vezes) as formulações em água deionizada e utilizando-se um analisador de

partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) a um ângulo fixo de 90º e temperatura de 25ºC. Cada resultado foi expresso como medida de três determinações.

3.7.2 Potencial Zeta

A carga de superfície das partículas foi avaliada através da técnica de microeletroforese, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern). As análises foram realizadas diluindo-se (10 vezes) as formulações em água deionizada e os resultados foram expressos como médias de três determinações.

3.7.3 Rastreamento de nanopartículas

A técnica de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA) foi utilizada para determinar a concentração e o diâmetro médio das formulações. Os dados foram coletados por meio de uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera sCMOS usando software NanoSight (versão 4.2). Para garantir a não contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. As formulações foram diluídas (30 vezes), sendo realizadas análises em triplicata para cada amostra. Para garantir que diferentes partículas fossem analisadas, para cada réplica, 1 mL das amostras foram injetadas na célula volumétrica, com o intuito de deslocar o conteúdo medido anteriormente. Cada repetição foi constituída de vídeos gravados com duração de 60 segundos.

3.8 Alterações bioquímicas em plantas de tomate tratadas com nanoformulações para controle da pinta preta

Para a realização deste experimento, utilizaram-se de plantas de tomate, cultivar Santa Clara, mantidas em casa de vegetação. Para avaliar as combinações de produto x inoculação e seus efeitos isolados foram realizados dois experimentos sequenciais com protocolo igual, sendo o primeiro sem inoculação e o segundo com inoculação. Os experimentos foram planejados separadamente devido a limitações estruturais.

Após 15 dias do transplante, as plantas foram pulverizadas com os tratamentos. Foram utilizadas quatro nanoformulações (F_1, F_9, F_{10} e F_{23}), selecionadas a partir dos experimentos anteriores. Os tratamentos utilizados como possíveis indutores estão

descritos na Tabela 6. Após 72 horas da aplicação dos tratamentos, realizou-se a inoculação nas plantas com o desafiador (isolado III de *Alternaria* spp. – suspensão com 1 x 10^4 [esporos] mL^{-1}) e também com água, a fim de se avaliar as repostas bioquímicas das plantas ao indutor com e sem o inóculo.

As coletas para as análises bioquímicas foram realizadas em seis momentos: no momento da aplicação dos tratamentos (tempo 0), em que se coletou amostras de plantas que não receberam nenhum tratamento. Após 72 horas, coletou-se amostras de plantas que receberam somente os tratamentos indutores e após 12, 24, 48 e 96 horas da inoculação com ou sem patógeno. As coletas consistiram em aproximadamente 3 g de tecido vegetal (em três envelopes separados), sendo as três últimas folhas completamente expandidas para as análises de enzimas e para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos. O tecido coletado foi transferido imediatamente para sacos de papel alumínio identificados e colocados em nitrogênio líquido para paralisar todas as reações, e em seguida manteve-se os mesmos em congelador até a maceração das amostras e preparo dos extratos enzimáticos.

Tabela 6. Descrição dos tratamentos realizados em experimentos com plantas de tomate tratadas apenas com o agente indutor de resistência (F) e água (A) (1º experimento), e tratadas com o agente indutor (-72 horas) e inoculadas (I) a 0 hora com isolado III de *Alternaria* spp. ou com água (2º experimento).

	1º experimento		**2º experimento**	
Tratamento	**-72 h**	**0 h**	**-72 h**	**0 h**
Testemunha [A+A]	Água	Água	Água	Água
Controle [A+I]	-	-	Água	Inóculo
[F_1+A]	F_1	Água	F_1	Inóculo
[F_9+A]	F_9	Água	F_9	Inóculo
[F_{10}+A]	F_{10}	Água	F_{10}	Inóculo
[F_{23}+A]	F_{23}	Água	F_{23}	Inóculo

** Foram denominadas como **Testemunha** as plantas que receberam apenas água como tratamento e água como patógeno e denominadas **Controle** as plantas que receberam água como tratamento e inóculo após 72h.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Todas as análises foram realizadas em duplicata de amostragem.

3.8.1 Preparo do extrato enzimático

As amostras de folhas foram maceradas com auxílio de homogeneizador mecânico (Ultra-turrax), acrescido de 15 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), acrescido de polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) e EDTA 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g durante 20 min a 4ºC, sendo o sobrenadante obtido considerado como o extrato enzimático. O extrato foi transferido em eppendorfs de 1 mL e armazenados em freezer e foi utilizado para a quantificação de proteínas totais e para a determinação da atividade das enzimas: guaiacol peroxidase e β-1,3-glucanase.

3.8.2 Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas através do método de Bradford (1976). Para tanto, a cada 20 µL de amostra adicionou-se 1.000 µL do reagente de Bradford (diluído em água deionizada na proporção de 1:5; v/v). O branco foi lido apenas com o reagente. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi expressa em termos de equivalentes µg de proteína.

3.8.3 Atividade da enzima guaiacol peroxidase

A defesa ativa das plantas contra fitopatógenos pode envolver alterações metabólicas, as quais podem ser correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário da planta hospedeira. Dentre as enzimas, a peroxidase tem como função, por exemplo, a lignificação no tecido da planta hospedeira. A formação de lignina, nesses tecidos, se dá através da união oxidativa de monômetros fenólicos, cuja reação é catalisada pela peroxidase (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Em gelo, realizou-se a mistura composta por 30 µL do extrato proteico e 870 µL da solução de reação em tubos de ensaio. A solução de reação foi composta por 5,68 g de fosfato de potássio dibásico, 4,2 g de ácido cítrico, 0,5 mL de guaiacol comercial e 1 mL de H_2O_2 (30%) para 200 mL, 0,01 M (pH 5,0). Os tubos foram mantidos durante 10 minutos em banho maria na temperatura de 30ºC. Após este período, os tubos retornaram para o gelo e a reação foi parada acrescentando-se 100 µL de H_2S0_4 0,5%. A solução foi diluída acrescentando-se 1.800 µL de H_20 deionizada e 200 µL do tampão

fosfato – citrato. Na cubeta de referência (branco) utilizou-se 870 µL da solução de reação + 30 µL do tampão (KAR; MISHRA, 1976). A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi lida a 470 nm em espectrofotômetro, e sua atividade foi expressa em unidade de absorbância por minuto por mg de proteína.

3.8.4 Atividade da β-1,3-glucanase

As glucanas são polímeros de açúcar que podem ter centenas ou milhares de unidades de polissacarídeos. Vários tipos de glucanas são produzidos por microrganismos, havendo predominância de β-glucanas. A principal função das β-glucanas é auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras.

As β-glucanas podem ser degradadas pelas β-glucanases que são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos. Essas hidrolases podem participar diretamente do processo de controle de fitopatógenos porque hidrolisam as β-glucanas constituintes da parede celular de alguns patógenos.

Para a reação foram utilizados dois tubos para cada tratamento (A e B). Foram adicionados em ambos tubos: 150 µL de laminarina (tampão fosfato de sódio 1,0 mM pH 5,0 + laminarina); 100 µL do extrato proteico. No tubo A adicionou-se ainda 125 µL do reagente ADNS (**Solução A**: 2,5 g de ADNS em 75 mL de água + **Solução B**: 4g de hidróxido de sódio em 50 mL de água + 75g de tartarato de sódio). Todas as reações foram realizadas em gelo. O tubo branco recebeu apenas 100 µL de laminarina + 100 µL de fosfato de potássio 1,0 mM pH 5,0. Os tubos foram transferidos para banho-maria a 40ºC durante 2 horas. Após este período acrescentou-se 125 µL de ADNS nos tubos B e no branco, e a seguir foram aquecidos em banho-maria a 95ºC para reação durante 5 min. Os tubos foram esfriados em gelo, e adicionou-se 1125 µL de água em todos os tubos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959).

A curva de glicose foi realizada utilizando a solução mãe com 0,01 g de glicose em 10 mL de água, com as concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg/mL de glicose. Utilizando a quantificação de proteínas (mg/mL) pelo método de Bradford e a equação gerada na curva de glicose foi possível calcular a enzima, sendo: mg de glicose liberada por hora por mg de proteína (mg [glicose] h^{-1} mg [proteína]$^{-1}$).

3.8.5 Quantificação de fenóis livres

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários vegetais, podendo estar presentes em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. São essenciais no crescimento e reprodução vegetal, além de atuarem contra fitopatógenos, contribuírem na pigmentação, suporte mecânico, atração de polinizadores e proteção contra a radiação ultravioleta.

Para determinação dos fenóis, as folhas congeladas foram liofilizadas durante 48 horas. As amostras foram pesadas em balança de precisão, adicionando-se 50 mg de tecido em tubos Falcon com capacidade de 15 mL. Os tubos receberam 10 mL de etanol 70% e permaneceram em banho maria durante 1,5 horas na temperatura de 70ºC. Os tubos foram mantidos em geladeira até realizar as reações.

Para a quantificação dos fenóis, utilizou-se 200 µL do extrato + 1700 µL de água deionizada + 125 µL do reagente Folin-Ciocalteau em tubos de ensaio. Após agitação adicionou-se 250 µL de Na_2CO_3 anidro (17,5 g em 50 mL) e 375 µL de água deionizada. Para realizar a curva padrão utilizou-se o ácido clorogênico, diluindo-se 5 mg de ácido em 1 mL de água destilada, alcançando a diluição de 5,0 µg μL^{-1} (SWAIN; HILLIS, 1959). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 725 nm após 1 hora, e os resultados obtidos expressos em acúmulo de fenóis livres (µg [equivalente ácido clorogênico] mg^{-1} [tecido]).

3.8.6 Análise estatística das enzimas

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (Anova) e distribuição de normalidade e homogeneidade dos resíduos. Quando a Anova indicou diferença significativa ($p \geq 0,05$), os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A normalidade dos resíduos foi avaliada seguindo o teste de Shapiro-wilk, e quando não apresentou comportamento normal ($p \leq 0,05$), realizou-se a transformação por *Boxcox*. A análise estatística foi realizada por meio do programa R (versão 3.0), com auxílio dos pacotes *Exp.Des* e *Laercio.*

Na análise de componentes principais (ACP), os dados foram padronizados dividindo-se a diferença entre cada amostra e a média aritmética da variável de interesse pelo desvio padrão da variável. Os componentes foram selecionados de acordo com os autovalores provenientes da matriz de correlação e de acordo com a presença de

componentes com autovalores maiores que 1 (KAISER, 1974). Para esta análise foram utilizados os pacotes *Vegan, Ggplot, Metan* e *ExpDes.pt.*

Com base nos dados obtidos foi determinada a área abaixo da curva de progresso da atividade bioquímica (AACPab) através da seguinte fórmula:

$$AACPab = \Sigma[(Ii + Ii+1)/2.(Ti+1-Ti)] \quad \textbf{(3)}$$

em que Ii é a atividade enzimática na época da avaliação i e Ti = tempo de coleta i.

Todas as análises foram realizadas no software R (versão 4.0) e os gráficos foram elaborados pelo software GraphPad Prism (versão 9.0).

3.9 Potencial dos formulados na redução do desenvolvimento da pinta preta de tomateiro

Este experimento foi delineadado em condições e tratamentos semelhantes ao segundo experimento (Tabela 6) (*item 3.8*), com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da doença em tomateiros pulverizados com os formulados F_1, F_9, F_{10}, F_{23} e uma testemunha com água.

Após a inoculação, foram marcadas com fitilho cinco folhas por tratamento e monitoradas durante o desenvolvimento dos sintomas. Para isso, utilizou-se papel cartolina preto com círculo de 2,9 cm de diâmetro e foram fotografadas diariamente as folhas marcadas das plantas de tomate, durante seis dias (momento em que o tamanho das lesões foi estabilizado). Foram utilizadas cinco repetições, sendo cada folha presente em uma planta isolada uma repetição.

As fotografias foram analisadas pelo software QUANT (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), e avaliadas quanto a severidade da pinta preta. A partir dos valores diários de severidade e número de lesões, construiu-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a equação **3.**

A análise estatística foi realizada pelo pacote *Laercio* no software R (versão 4.0). Uma visão geral dos experimentos desenvolvidos neste trabalho podem ser visualizados na Figura 6.

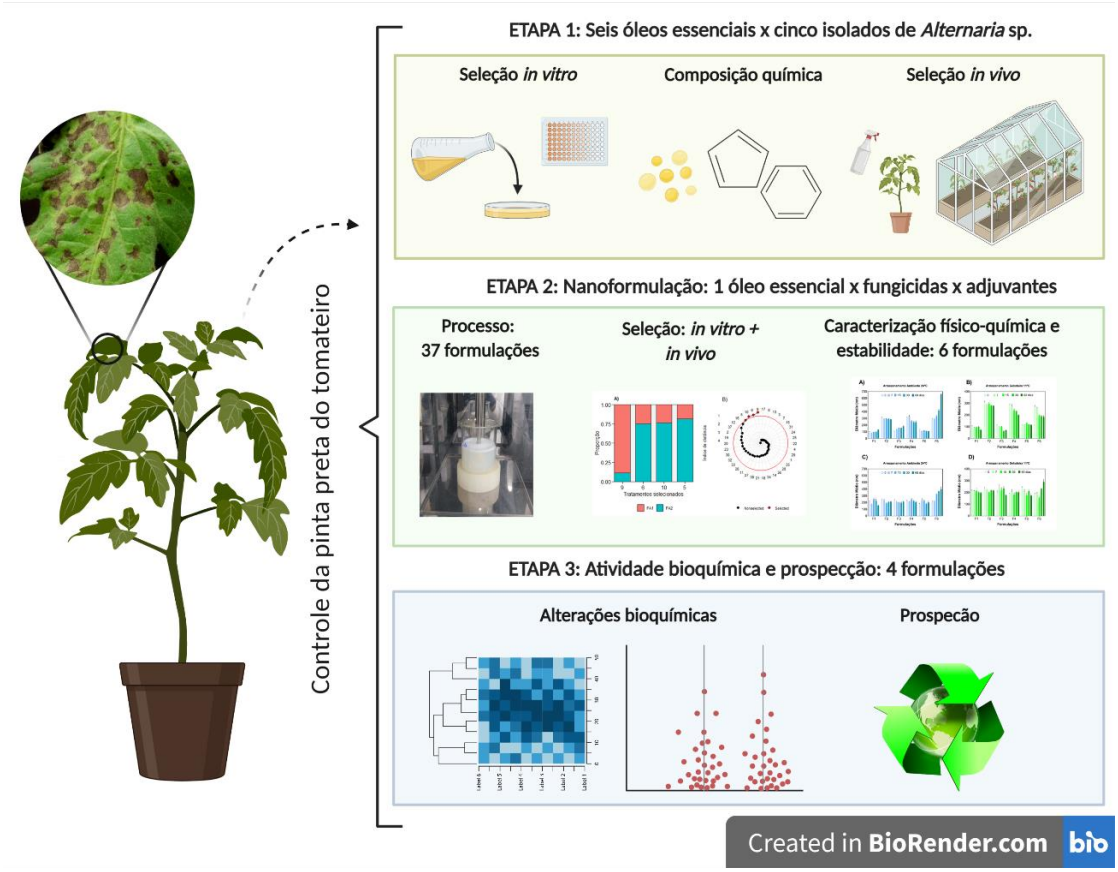

Figura 6. Esquema representativo dos experimentos realizados. Fonte: BioRender.com.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais não será apresentada nesta versão da tese devido a patenteabilidade dos produtos gerados.

4.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de isolados de *Alternaria* spp. *in vitro*.

O crescimento micelial dos isolados I e V de *Alternaria* spp. apresentaram semelhança nos seus resultados quando submetidos ao óleo essencial A, pois seu crescimento foi inibido com 1,6 µL mL^{-1} do óleo. Os isolados III e IV apresentaram inibição do seu crescimento micelial na dose de 2,0 µL mL^{-1} do óleo essencial A. Já o crescimento micelial do isolado II foi inibido apenas na maior dose do óleo essencial A, com 3,2 µL mL^{-1}. Os isolados podem ser classificados de acordo com a concentração de óleo essencial A necessária para inibir o crescimento micelial (da menor dose para a maior): [(I = V) < (III = IV) < II] (Figura 7A).

A concentração efetiva do óleo essencial A para inibir 50% do crescimento micelial (EC_{50}) foi menor para o isolado V, com 0,64 µL mL^{-1} e a maior EC_{50} para o isolado II com 1,93 µL mL^{-1} (Tabela 7).

As doses do óleo essencial B que promoveram controle do crescimento micelial para os isolados I, II e III de *Alternaria* spp. correspondem a 2,0 µL mL^{-1}. A maior EC50 foi observada para o isolado II, com 1,48 µL mL^{-1}. O isolado IV necessitou da menor dose para que ocorresse inibição do seu crescimento, sendo inibido com apenas 0,8 µL mL^{-1} do óleo essencial B, com EC_{50} de 0,52 µL mL^{-1} (Tabela 7). A dose intermediária de controle, como 1,6 µL mL^{-1} do óleo essencial B promoveu inibição do crescimento micelial do isolado V. De maneira geral, os isolados podem ser classificados de acordo com a concentração do óleo essencial B necessária para inibir o crescimento micelial (da menor dose para a maior): [IV < V < (I = II = III)] (Figura 7B).

A dose 2,0 µL mL^{-1} do óleo essencial C foi capaz de inibir o crescimento micelial dos isolados II, IV e V de *Alternaria* spp.. Já o isolado I foi inibido com 1,6 µL mL^{-1} do óleo essencial C, e EC_{50} com 0,80 µL mL^{-1}. Contudo, para inibir o crescimento micelial do isolado III foi necessário uma dose maior, sendo inibido com 3,2 µL mL^{-1}, e EC_{50} de 1,69 µL mL^{-1} (Tabela 7). A classificação dos isolados conforme a concentração do óleo essencial C demandada pra controle, da menor dose para a maior: [I < (II = IV = V) < III)] (Figura 7C).

Os resultados do crescimento micelial dos isolados de *Alternaria* spp. com o óleo essencial D não foram positivos quando comparados com os demais óleos essenciais testados. O óleo essencial D reduziu o crescimento micelial para todos os isolados testados, contudo, seu crescimento não foi inibido na maior dose do óleo essencial D (3,2 µL mL^{-1}). As maiores porcentagens de controle do fungo foram observadas para o isolado II, com aproximadamente 90% de controle, isolado III com 80%, isolado IV com 70%, e isolados I e V com 63% de controle. Dessa forma, a classificação dos isolados de acordo com a concentração do óleo D demandada para controle, da menor para a maior dose é: [II < III < IV < (I = V)] (Figura 7D).

O óleo essencial E apresentou os melhores resultados neste experimento, pois reduziu drasticamente o crescimento micelial dos isolados de *Alternaria* spp., com as menores doses. Todos os isolados de *Alternaria* spp. foram inibidos na dose de 0,8 µL mL^{-1} do óleo essencial E. Este óleo apresentou resultados positivos, pois além de necessitar de doses baixas para inibir o crescimento micelial, seus resultados foram semelhantes para todos os isolados avaliados. A classificação dos isolados frente às doses do óleo essencial E demandadas para inibição de controle ficou semelhante: [I = II = III = IV = V] (Figura 7E). A menor EC_{50} para o óleo essencial E foi verificada para o isolado V, com 0,33 µL mL^{-1} e a maior EC_{50} par ao isolado III, com 0,42 µL mL^{-1} (Tabela 7).

O óleo essencial F não apresentou resultados positivos de redução do crescimento micelial, quando comparado com os demais óleos avaliados. Três das quatro repetições utilizadas no experimento para o isolado II apresentaram inibição do crescimento micelial para a maior dose do óleo essencial F, com 3,2 µL mL^{-1}, sendo este o resultado mais positivo encontrado (Figura 7F). Os isolados I, III e IV apresentaram resultados variáveis para o crescimento (Figura 7F). Na maior dose do óleo essencial, o isolado I apresentou 58% de inibição, isolado IV 55%, isolado III com 40% e na menor porcentagem de inibição, o isolado IV com 7% de controle (Figura 7F). Dessa forma, a classificação dos isolados para o óleo essencial F ficou: [II < I < IV < III < IV].

A EC_{50} do crescimento micelial dos isolados de *Alternaria* spp. com os óleos essenciais testados estão demonstrados na Tabela 7. Os resultados destacam o óleo essencial E, pois apresentou excelente controle do crescimento micelial dos isolados em doses menores. Os óleos essenciais D e F não apresentaram inibição do controle micelial na maior dose testada, com 3,2 µL mL^{-1}, e desta forma, não foi possível realizar o cálculo do EC_{50} para estes óleos essenciais.

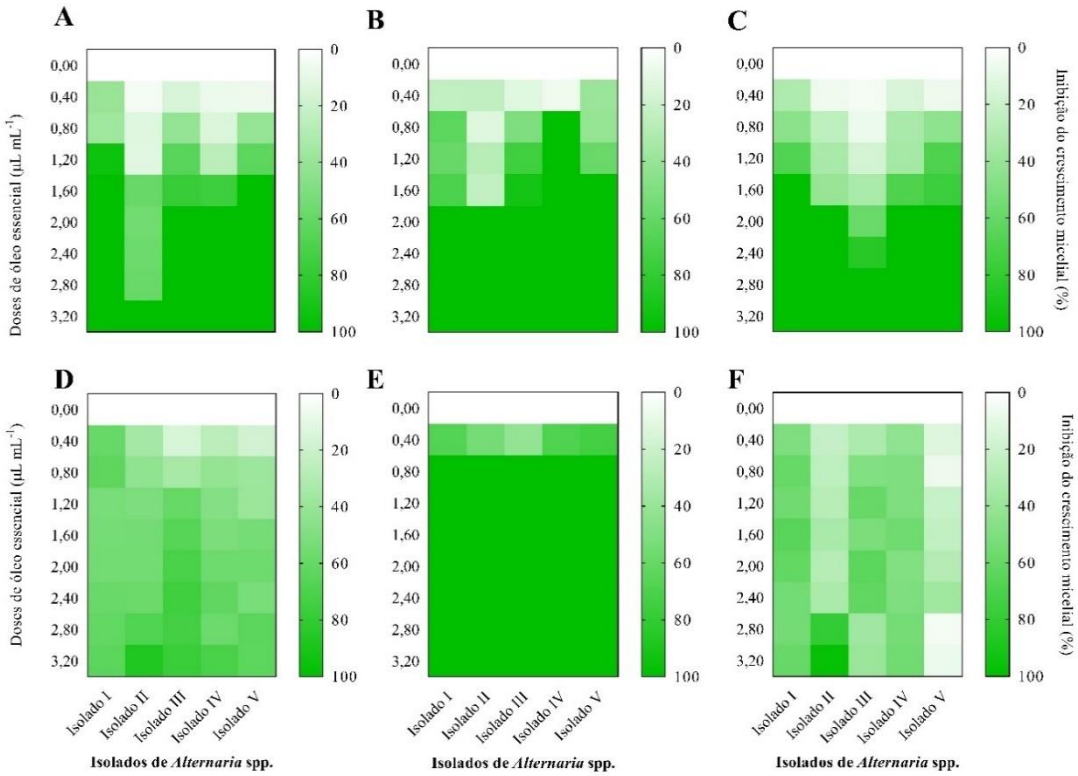

Figura 7. Dose dos óleos essenciais A, B, C, D, E e F necessária para inibir o crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp.

Tabela 7. Concentração efetiva dos óleos essenciais A, B, C, D, E e F para inibir 50% (EC_{50}) do crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp.

Isolados	Dose dos óleos essenciais (µL mL^{-1})					
	A	B	C	D*	E	F*
Isolado I	0,66	0,94	0,80	-	0,35	-
Isolado II	1,93	1,48	0,99	-	0,38	-
Isolado III	0,97	0,98	1,69	-	0,42	-
Isolado IV	1,19	0,52	1,05	-	0,35	-
Isolado V	0,64	0,84	1,10	-	0,33	-

***** Não foi possível calcular o EC_{50} dos óleos essenciais D e F.

O óleo essencial E apresentou os melhores resultados quando comparado com os demais, pois foi necessário baixa concentração (0,8 µL mL^{-1}) de óleo para controlar os isolados de *Alternaria* spp.

Estudos similares corroboram com os resultados obtidos nesse trabalho, onde se tem a total inibição de fitopatógenos *in vitro* com baixas doses de óleo essencial. Em nossos trabalhos anteriores verificamos o potencial fungicida de quatro óleos essenciais para o

controle de *Scleriotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp. (FONTANA et al., 2020), *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Monilinia fructicola* (FONTANA et al., 2021).

Os resultados obtidos concordam com outros trabalhos, que utilizaram óleos essenciais para o controle do fungo *Alternaria* spp., como *Melaleuca alternifolia* (ALVES et al., 2019), *Pinus elliottii* e *P. taeda* (TOMAZONI; PAULETTI, 2014), *Lippia alba* (TOMAZONI et al., 2016), *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* e *Cinnamomum camphora* (TOMAZONI et al., 2017), *Lippia origanoides*, *Lippia citriodora* e *L. alba* (LOZADA et al., 2012), *Sesamum indicum*, *Cocos nucifera*, *Lawsonia inermis* e *Mentha piperita* (GADHI et al., 2020), *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Tetradenia riparia*, *Aloysia gratissima* e *Salvia microphylla* (FRANCIO, 2020).

A concentração de óleo essencial necessária para inibir o crescimento e reprodução de fungos é variável, pois depende do óleo essencial e do isolado fúngico testado. Cada óleo essencial pode apresentar comportamento diferenciado frente aos diferentes isolados (TOMAZONI et al., 2017).

Neste mesmo sentido, a concentração efetiva para o controle de fungos como *Alternaria* spp. tem espectro amplo entre os óleos essenciais e trabalhos, de 3,0 a 5,0 µL mL^{-1} (FENG; ZHENG, 2007), 1,0 a 10,0 µL mL^{-1} (TOMAZONI et al., 2017), 3,1 a 25,0 µL mL^{-1} (FRANCIO, 2020). Por exemplo, para *Eucalyptus staigeriana* e *Eucalyptus globulus* a concentração inibitória mínima (CMI) de isolados de *Alternaria solani* foi de 1,0 e 10,0 µL mL^{-1}, respectivamente (TOMAZONI et al., 2017). Na maior concentração (10,0 µL mL^{-1}), os autores verificaram valores abaixo de 46% de controle na germinação de esporos.

A concentração inibitória mínima (CIM) para controle de *Alternaria alternata* utilizando os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris* foi de 3,12 a 6,25 µL mL^{-1}, respectivamente; e três em concentrações inibitórias mais elevadas com 12,5 µL mL^{-1} e 25 µL mL^{-1}, dos óleos de *Tetradenia riparia*, *Aloysia gratissima* e *Salvia microphylla* (FRANCIO, 2020). Outros óleos essenciais como *Cymbopogon flexuosus* (1000 µg mL^{-1}), *Cinnamomum zeylanicum* (250 µg mL^{-1}) e *Eugenia caryophyllus* (500 µg mL^{-1}) reduziram o crescimento e promoveram ruptura e deformação das hifas de *Alternaria alternata*, causando extravasamento do conteúdo celular (CASTRO et al., 2017).

Devido ao screening realizado no primeiro experimento, não foram verificadas as concentrações de inibição mínima para os óleos D e F *in vitro*. Na maior dose testada (3,2 µL mL^{-1}), o óleo D alcançou 60 a 90% de controle, e o óleo essencial F de 7 a 58% de inibição do crescimento micelial. Alguns autores, por exemplo, testando óleo essencial de *Thymus vulgaris* com esta mesma abordagem, verificaram 62% de controle da *Alternaria*

alternata na concentração de 0,5 µL mL^{-1} (FENG; ZHENG, 2007). Com base nos resultados da literatura citada, observamos que nossos resultados são promissores até mesmo para os óleos em que não determinamos CMI.

Os óleos essenciais de plantas são misturas naturais, geralmente caracterizadas pela presença de dois ou três componentes principais em concentrações elevadas (BAPTISTA et al., 2015). A identificação de compostos antifúngicos em óleos essenciais é um dos métodos alternativos promissores para explorar fungicidas derivados de plantas.

Neste sentido, a variação da atividade biológica dos óleos essenciais é dependente da composição de seus constituintes químicos (SCHUCK et al., 2001). Componentes como o citral e o eugenol, mostram efeito fungicida semelhante a óleos essencial que possuem em sua composição tais compostos (COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011). Já Linalool, é um componente químico de grande valor no mercado, é amplamente testado como acaricida, bactericida e fungicida (DIAS et al., 2017). Contudo, esses componentes majoritários podem apresentar menor atividade em relação ao óleo essencial completo, demonstrando a importância do efeito sinergístico dos elementos-traço (MOUREY; CANILLAC, 2002).

Foi observada a atividade antifúngica do óleo essencial de *Syringa oblata* e seus principais componentes, como eugenol e acetato de eugenol sobre *A. alternata* (JING et al., 2018). O eugenol isoladamente inibiu o crescimento micelial do fungo com 150 µg mL^{-1}. Neste mesmo estudo, os autores comprovaram a ação fungicida do eugenol através da ruptura do micélio e da membrana do esporo, além do aumento da condutividade extracelular. Para condições de campo, a emulsão de eugenol promoveu maior resiliência das plantas de tabaco à infecção da *Alternaria alternata*, reduzindo sua severidade (JING et al., 2018).

Os compostos químicos majoritários presentes nos óleos essenciais testados apresentam ação fungicida comprovada. No entanto, o óleo essencial E demonstrou maior fungitoxidade contra isolados de *Alternaria* spp., e possui em sua composição quatro compostos majoritários, o que pode condicionar maior potencial fungicida ao produto, uma vez que cada composto possa agir de um modo distinto na destruição de hifas e esporos do fungo.

A inibição do crescimento de fungos é um método padrão para reduzir a multiplicação de fungos, pois o micélio desempenha um papel importante no controle da infecção e reprodução do patógeno devido à sua função na reprodução assexuada. Dessa forma, os óleos essenciais A, B, C e E foram eficazes no controle da pinta-preta em condições *in vitro*, sugerindo sua exploração em futuros programas de manejo de doenças em plantas.

4.3 Teste de metodologias

4.3.1 Teste de doses para os experimentos *in vivo*

A análise de variância ($p \leq 0,05$) mostrou sinificância para as variáveis severidade, eficiência de controle, área foliar doente, área foliar sadia e número de folhas.

A [OB1+I] reduziu a severidade da doença apresentando semelhança à testemunha [A+A], que foi nula. No entando, a dose [OB2+I] permitiu 66% de severidade da doença. Os tratamentos [OC1+I] e [OC2+I] apresentaram-se semelhantes entre si, com 27,6 e 36,9% de severidade. Todos os tratamentos inoculados apresentaram eficiência de controle semelhante, devido a variância dos dados, diferindo estatisticamente da testemunha [A+A] (Figura 8A).

A área foliar doente foi semelhante entre os tratamentos com inoculação, diferindo apenas da testemunha [A+A]. Este tratamento também proporcionou a maior área foliar sadia, que foi semelhante apenas ao [OB1+I], e por sua vez superior ao [OB2+I]. Os tratamentos [OC1+I] e [OC2+I] não diferiram entre si, e com o controle [A+I] (Figura 8B).

O menor número de folhas foi observado nos tratamentos com [OB1+I], [OB2+I] e o controle [A+I]. A testemunha [A+A] proporcionou o maior número de folhas, com 10,6 sendo estatisticamente semelhante aos tratamentos [OC1+I] e [OC2+I] (Figura 8C).

O tratamento [OB1 + I], seguido de [OC1 + I] proporcionaram as maiores eficiências, alcançando 45% e 39% de controle da doença. De maneira geral, a menor dose dos óleos essenciais, com 2,5 $\mu L\ mL^{-1}$ apresentou resultados superiores à dose de 5,0 $\mu L\ mL^{-1}$. Valores similares aos encontrados por Francio (2020) com o óleo essencial de *Aloysia gratissima* que alcançou 45,4% no controle de *Alternaria solani*.

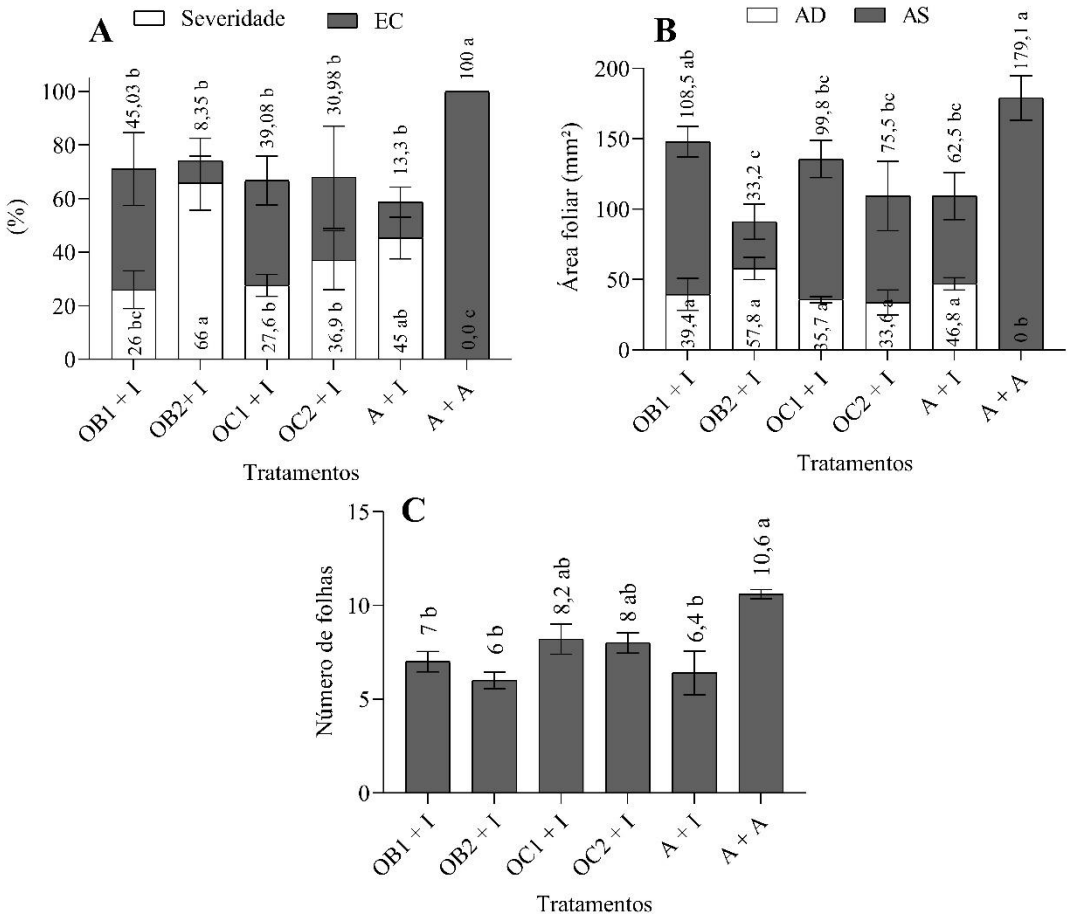

Figura 8. Severidade e eficiência de controle - EC (A), área foliar doente - AD e área foliar sadia - AS (B) e número de folhas (C) de plantas de tomate tratadas com doses de óleo essencial.

*Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

O fato de [OB2 + I] não ter apresentado bom desempenho pode estar relacionado com a dose elevada, promovendo fitotoxidez nos tecidos foliares. Lorenzetti et al. (2018) cita que os resultados de eficiência do uso de óleos essenciais dependem da dose e do método de aplicação, e quando utilizada alta dosagem o resultado pode ser negativo. Por exemplo, alta dosagem do óleo essencial de *C. citratus* para controle de doenças na pós-colheita de morangos, ocasiona a maior incidência da doença, alterando a coloração dos frutos, amarelando-os e facilitando o processo infectivo do fungo (LORENZETTI et al., 2018).

4.4 Eficiência dos óleos essenciais no controle da pinta preta de tomateiro

A partir da análise de variância, verificou-se que os parâmetros analisados foram significativas pelo teste F, e apresentaram diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

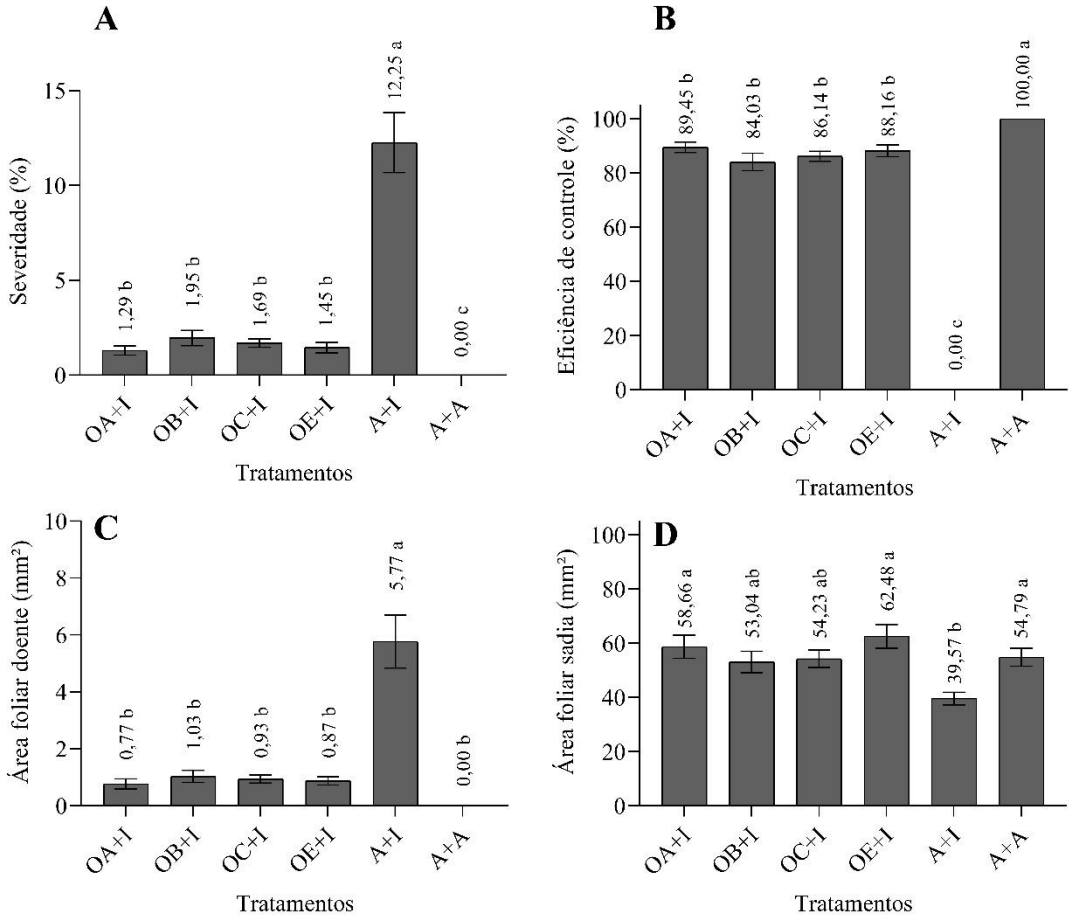

Figura 9. Severidade (A), eficiência de controle (B), área foliar doente (C) e área foliar sadia (D), de plantas de tomate tratadas com óleos essenciais 72 horas antes da inoculação com o isolado III de *Alternaria* spp.

*Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

A severidade da pinta preta nas plantas de tomate foi reduzida através da aplicação dos óleos essenciais, diferindo significativamente do controle. A testemunha apresentou semelhança estatística com os tratamentos de óleo essencial, sendo que na testemunha não foi aplicado o isolado III de *Alternaria* spp., diferentemente dos tratamentos com óleo essencial, os quais receberam inóculo 72 horas após a aplicação dos óleos (Figura 9A). A eficiência de

controle da pinta preta foi acima de 84% para todos os tratamentos com óleo essencial, diferindo significativamente do tratamento controle e da testemunha (Figura 9B).

As plantas controle [A+I] que possuem apenas a pulverização do inóculo sem óleo essencial apresentaram maior área foliar doente, diferindo significativamente dos tratamentos com óleo essencial e da testemunha [A+A] (Figura 9C). Foram observadas diferenças para a área foliar sadia entre os tratamentos, sendo que o controle [A+I] apresentou a menor área foliar, diferindo significativamente do óleo essencial A, E e testemunha [A+A] (Figura 9D).

Foi possível observar diferenças visíveis entre os tratamentos com óleo essencial e o controle nas folhas de tomateiro, quando as plantas controle apresentaram maior severidade da doença (Figuras 10 e 11).

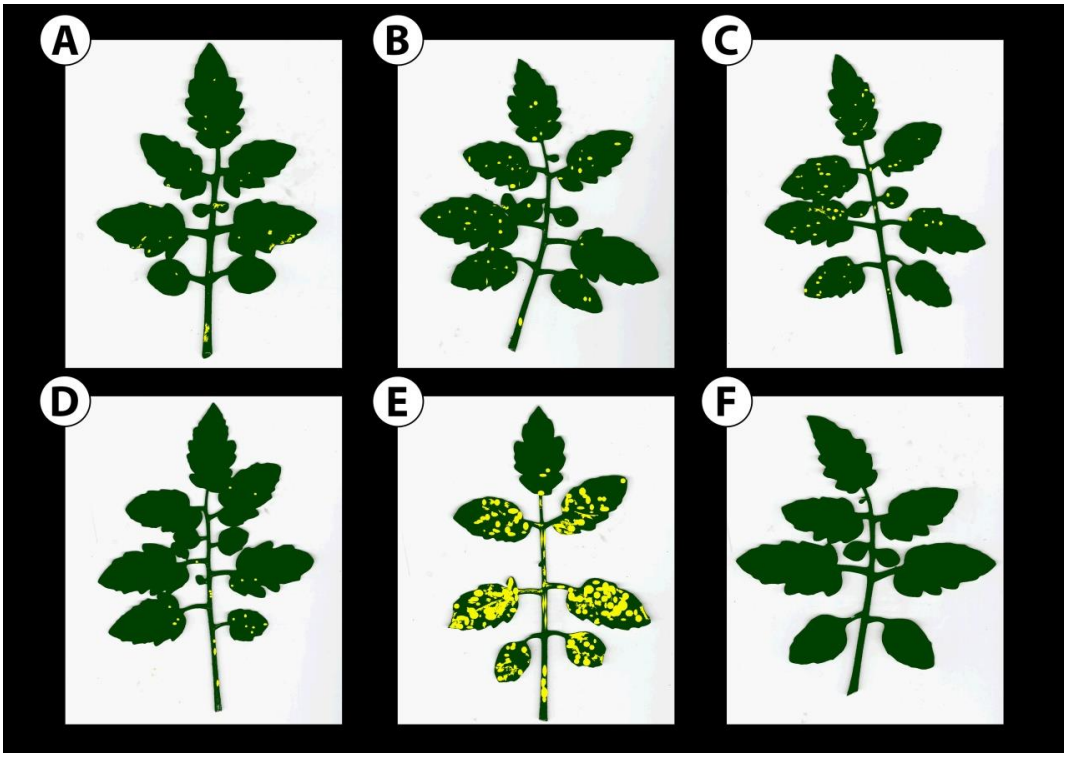

Figura 10. Imagens das folhas de tomateiro escaneadas e analisadas pelo programa QUANT, aos quatro dias após inoculação do isolado III de Alternaria spp., sendo os tratamentos: [OA+I] (A), [OB+I] (B), [OC+I] (C), [OD+I] (D), controle [A+I] (E) e testemunha [A+A] (F).

Todos os óleos essenciais (A, B, C e E) testados apresentaram resultados positivos no controle da doença em plantas de tomate, com eficiência de controle superior a 84% em relação ao controle. Verificamos que o óleo essencial E promoveu maior eficiência de controle e área foliar em plantas de tomate.

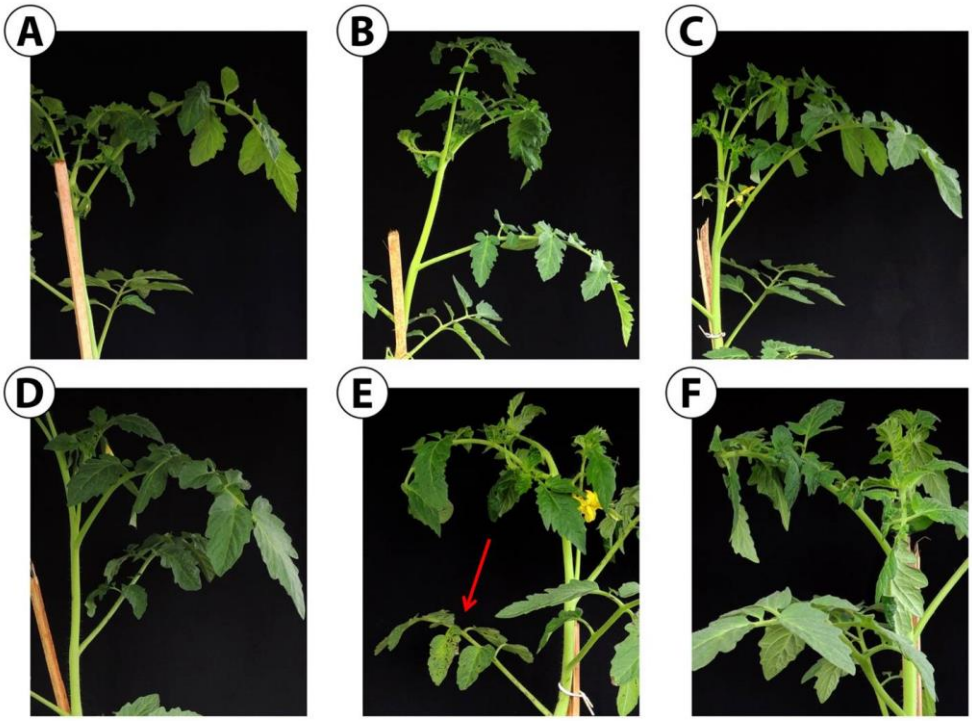

Figura 11. Imagens referentes ao experimento desenvolvido, demonstrando o aspecto visual das plantas de tomate após quatro dias da inoculação do isolado III de Alternaria spp., sendo os tratamentos: [OA+I] (A), [OB+I] (B), [OC+I] (C), [OD+I] (D), controle [A+I] (E) e testemunha [A+A] (F).

Os valores de eficiência de controle observados neste trabalho são superiores a outros trabalhos citados na literatura. Francio (2020), por exemplo, verificou ação fungicida dos óleos essenciais de *T. riparia*, *O. basilicum*, *S. microphylla*, *A. gratissima* e *T. vulgaris* com 66,2%, 54,3%, 50,8%, 45,4% e 32,9% de efetividade de controle da pinta preta em plantas de tomate, respectivamente.

Plantas de tomate tratadas com os óleos essenciais de *E. staigeriana*, *E. globulus* e *C. camphora* reduziram área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a pinta preta de tomateiro, quando comparado com o controle (TOMAZONI et al., 2017).

Quando a eficiência dos óleos essenciais é comparada com fungicidas comerciais, os resultados também são satisfatórios. Por exemplo, os produtos Recop®, acibenzolar-S-metil e óleo essencial de capim-limão aplicados em plantas de tomate para controle da pinta preta de tomateiro apresentaram resultados semelhantes estatisticamente, com 75,5%, 73,5% e 62,2% de controle (LUCAS et al., 2012). Aplicações do óleo essencial de tomilho na pré-colheita de tomate cereja proporcionam maior tempo de armazenamento na pós-colheita através da redução da incidência de podridões, que dentre os fungos causadores está a *Alternaria alternata* (MIGLIORI et al., 2017).

O óleo essencial de *Tetraclinis articulata* aplicado como tratamento preventivo em plantas de tomate em casa-de-vegetação propocionou aumento do crescimento das plantas e redução da infecção por *B. cinerea* para 17,72% em comparação com plantas infectadas e não tratadas (RGUEZ et al., 2020). Nosso estudo também demonstrou maior área foliar de plantas de tomate tratadas com o óleo essencial E. Alguns autores explicam que além do efeito antifúngico direto dos óleos essenciais (OEs), alguns podem promover o crescimento da planta e até estimular os mecanismos de defesa da planta relacionados ao sistema antioxidante, via fenilpropanóide e proteínas relacionadas à patogênese para superar a infecção por patógenos (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2000; LUCAS et al., 2012).

De acordo com Lucas et al. (2012) o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* pode reduzir a severidade de doenças no tomateiro, devido principalmente a seus compostos químicos como eugenol, acetato de eugenol e beta-cariofileno, os quais induzem a planta a ativar rotas secundárias para produzir substâncias antagônicas ao patógeno, e além de agir diretamente no patógeno. Os efeitos sinérgicos dos principais componentes químicos dos óleos essenciais são responsáveis pela atividade antifúngica no controle de *Alternaria alternata* em frutos de tomate (TIAN et al., 2011).

O óleo essencial de *Origanum vulgare* e o composto carvacrol foram eficazes no controle da murcha de Fusarium em casa de vegetação, pois proporcionaram ação antifúngica equivalente a um fungicida comercial. A área sob a curva de progresso da doença de murcha de fusarium (AACPD) também reduziu conforme aumento da dose de 0 para 1.200 $\mu g\ mL^{-1}$ (GONÇALVES et al., 2021). Estas informações merecem atenção, uma vez que existe uma dose ótima para controle sem que ocorra fitotoxidez.

Para condições de campo, os óleos essenciais também apresentam resultados positivos para outros patossistemas, como aplicações do óleo essencial de tomilho que proporcionou 35,0% de redução da AACPD para cercosporiose do cafeeiro (PEREIRA et al., 2008). De maneira geral, nossos óleos essenciais aumentaram a área foliar total das plantas, além de reduzir significativamente a severidade da pinta preta de tomateiro, dando ênfase ao uso da dose de 2,5 $\mu L\ mL^{-1}$ dos óleos essenciais.

Apesar de muitos óleos essenciais e de seus compostos apresentarem atividades biológicas sobre os mais diversos microrganismos, a atuação ainda é variável quanto ao seu mecanismo de ação. A habilidade dos óleos essenciais em se difundir através da parede celular e da membrana plasmática de patógenos é justificada principalmente pela sua constituição hidrofóbica, podendo alterar estruturas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos e com suas propriedades antioxidantes, causando o rompimento da célula

(MENDES et al., 2017). A hidrofobicidade dos óleos essenciais é uma característica importante, pois torna estes produtos capazes de interagir com a camada lipídica das membranas celulares dos patógenos, causando alterações em suas estruturas e tornando-as menos seletivas, podendo ocasionar o extravasamento de íons e outros constituintes celulares (KUMAR et al., 2008).

4.5 Eficiência das nanoformulações desenvolvidas

Grande parte das formulações promoveram eficiência de controle próxima a 100% do crescimento micelial com 50% da dose dos produtos. Já as formulações 8, 17, 18, 23, 24 e 25 apresentaram eficiência em torno de 80%, e as formulações 9 e 7 alcançaram porcentagens de 60 a 70% de controle (Tabela 8).

Para a eficiência de controle da germinação de esporos [75% da dose], com excessão da formulação 34, todas as demais apresentaram controle acima de 67%. Já para o experimento com [50% da dose] apenas as formulações 34, 36 e 17 apresentaram menos de 87% de controle, e as demais com valores acima de 87% de eficiência (Tabela 8).

A eficiência de controle da germinação de esporos com [25% da dose] dos formulados foi reduzida, quando comparado a doses superiores [50 e 75%] das formulações. Com excessão das formulações 7, 17 e 34, todas apresentaram eficiência acima de 58% de controle da germinação de esporos do isolado III de *Alternaria* spp. (Tabela 8).

O experimento com [50% da dose] dos formulados condicionou maior severidade da pinta preta de tomateiro, com valores próximos a 7% para o controle [A+I], quando comparado com o experimento de [100% da dose], com aproximadamente 2% de severidade para o controle [A+I]. Estas diferenças podem estar relacionadas ao período de instalação dos experimentos, que embora tenham sido realizados em casa de vegetação, desenvolveu-se em épocas diferentes e por isso podem ter encontrado condições mais ou menos favoráveis para o desenvolvimento da doença.

Para o experimento com [50% da dose] os maiores valores de severidade, de 7 a 10% foram observados nas formulações 7, 8, 17, 24, 28, 34 e 35 as quais foram estatisticamente semelhantes ao controle [A+I], e apresentaram baixa eficiência de controle, alcançando apenas 27% de controle da pinta preta de tomateiro. A maior eficiência de controle foi observada nas formulações 2 a 6, 10, 12, 15, 16, 18 a 21, 23, 36 e 37, com valores acima de 86% de controle, apresentando semelhança à testemunha [A+A] (Tabela 9).

A análise de fitointoxicação mostrou valores intermediários de sintomas nas plantas de tomate submetidas à pulverização dos formulados [dose 50%], com nota máxima de 5,0 (necrose de algumas folhas, acompanhada de deformação em folhas e brotos). A nota mínima de fitointoxicação foi atribuída para as formulações 1, 7 a 9, 17 a 28, 30, 33 a 35, as quais apresentaram semelhança aos tratamentos controle [A+I] e testemunha [A+A] (Tabela 9; Figura 12).

Todas as formulações do experimento [100% da dose] reduziram significativamente a severidade da pinta preta de tomateiro quando comparado com o controle [A+I]. Com excessão das formulações 7, 9, 14, 25, 26, 28, 33, 34 e 35, todas as demais apresentaram valores acima de 72% de eficiência de controle da pinta preta de tomateiro. As formulações 1, 7, 8, 17 a 24, 29, 31, 33 a 36 promoveram as menores notas de fitotoxidez nas plantas de tomate, apresentando semelhança estatística com os tratamentos [A+I] e [A+A] (Tabela 10; Figura 13).

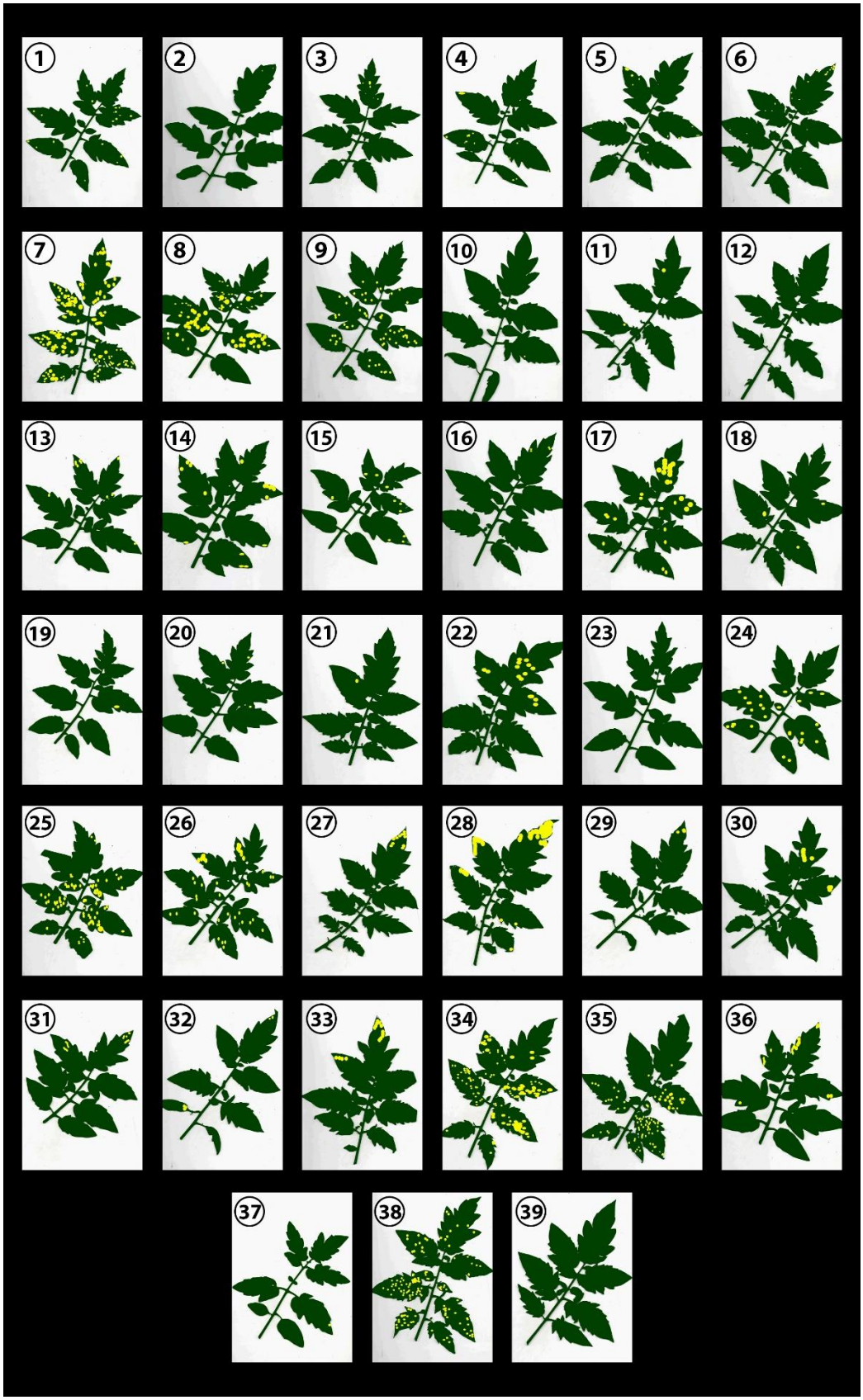

Figura 12. Folhas de plantas de tomate tratadas com 50% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h, escaneadas e tratadas com o software Quant quanto a severidade da pinta preta de tomateiro.

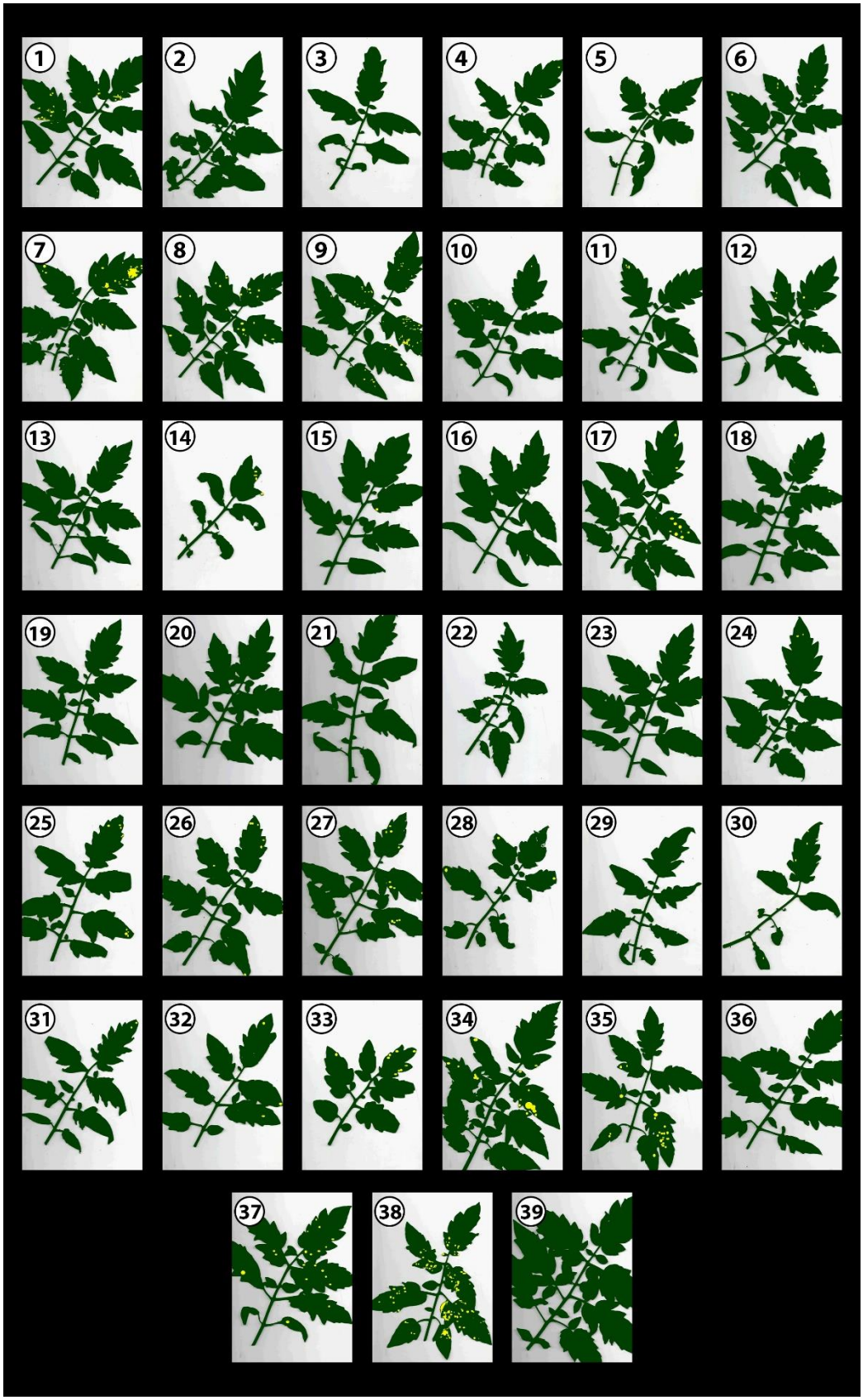

Figura 13. Folhas de plantas de tomate tratadas com 100% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h, escaneadas e tratadas com o software Quant quanto a severidade da pinta preta de tomateiro.

Tabela 8. Eficiência de controle do crescimento micelial (ECCM) e da germinação de esporos (ECG) com 75, 50 e 25% da dose de formulados a partir de óleos essenciais.

Formulação	ECCM 50%	ECG 75%	ECG 50%	ECG 25%
1	93,96 a	89,53 a	89,40 b	84,00 a
2	100,00 a	91,32 a	98,88 a	87,00 a
3	100,00 a	85,53 a	98,88 a	81,00 a
4	100,00 a	89,21 a	100,00 a	76,00 a
5	100,00 a	88,12 a	98,88 a	79,00 a
6	100,00 a	83,79 a	97,77 a	75,00 a
7	61,11 d	88,22 a	98,33 a	48,99 c
8	85,46 b	92,62 a	96,65 a	58,00 b
9	75,24 c	91,41 a	98,33 a	59,00 b
10	100,00 a	89,56 a	97,21 a	79,00 a
11	100,00 a	83,22 a	97,21 a	81,00 a
12	100,00 a	88,84 a	98,33 a	87,00 a
13	100,00 a	81,28 a	97,21 a	74,00 a
14	100,00 a	85,88 a	98,88 a	78,00 a
15	100,00 a	85,79 a	98,33 a	71,00 b
16	100,00 a	83,53 a	96,65 a	75,00 a
17	89,23 b	67,85 a	60,37 c	32,99 d
18	88,72 b	87,51 a	91,67 b	86,00 a
19	100,00 a	84,67 a	91,79 b	82,00 a
20	100,00 a	92,01 a	91,01 b	76,00 a
21	100,00 a	85,61 a	90,14 b	82,00 a
22	100,00 a	88,56 a	88,20 b	77,00 a
23	88,63 b	94,28 a	92,98 b	63,00 b
24	88,44 b	88,33 a	94,70 b	90,00 a
25	89,80 b	88,07 a	93,19 b	70,00 b
26	100,00 a	86,70 a	96,77 a	78,00 a
27	100,00 a	91,93 a	90,61 b	91,00 a
28	96,46 a	89,66 a	93,73 b	77,00 a
29	100,00 a	82,90 a	93,35 b	87,00 a
30	100,00 a	85,25 a	95,25 a	75,00 a
31	100,00 a	85,28 a	96,36 a	85,00 a
32	100,00 a	89,13 a	99,44 a	77,00 a
33	100,00 a	84,87 a	99,44 a	86,00 a
34	100,00 a	33,51 b	31,38 d	32,99 d
35	100,00 a	75,48 a	94,56 b	70,00 b
36	100,00 a	85,12 a	55,80 c	66,00 b
37	100,00 a	92,08 a	96,79 a	75,00 a
38	0,00 e	0,00 c	0,00 e	0,00 e

Teste de médias por Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, pacote Laercio (R versão 3.0).

Tabela 9. Teste de comparação de médias para o experimento de plantas de tomate pulverizadas com 50% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h.

Formulação	Sev (%)	Área foliar (cm²)			EC (%)	EWRC
		Doente	Sadia	Total		
1	2,57 b	4,71 c	176,32 d	181,03 d	63,04 b	1,00 b
2	0,31 b	0,86 c	251,45 b	252,31 b	95,43 a	5,00 a
3	0,53 b	0,75 c	157,83 d	158,58 d	92,32 a	5,00 a
4	0,34 b	0,58 c	187,51 c	188,09 d	95,02 a	5,00 a
5	0,73 b	2,99 c	288,20 a	291,2 a	89,45 a	5,00 a
6	0,65 b	2,05 c	299,66 a	301,72 a	90,55 a	5,00 a
7	10,36 a	22,45 a	175,84 d	198,29 c	10,06 d	1,00 b
8	6,14 a	10,78 b	148,01 d	158,78 d	26,50 d	1,66 b
9	1,52 b	5,53 c	332,65 a	338,18 a	78,18 b	1,00 b
10	0,70 b	2,08 c	299,01 a	301,09 a	89,83 a	5,00 a
11	1,32 b	2,96 c	215,27 c	218,23 c	81,05 b	5,00 a
12	0,11 b	0,31 c	279,27 a	279,58 a	98,34 a	5,00 a
13	1,85 b	2,94 c	152,07 d	155,02 d	73,37 b	5,00 a
14	4,07 b	7,42 c	198,605 c	206,02 c	47,71 c	5,00 a
15	0,53 b	0,96 c	162,99 d	163,95 d	92,27 a	5,00 a
16	0,30 b	0,80 c	285,60 a	286,40 a	95,69 a	5,00 a
17	9,08 a	13,79 b	134,07 d	147,86 d	16,10 d	1,00 b
18	0,53 b	1,06 c	201,71 c	202,77 c	92,29 a	1,00 b
19	0,13 b	0,32 c	242,42 b	242,74 b	98,01 a	1,00 b
20	0,34 b	0,89 c	234,82 b	235,71 b	95,09 a	1,00 b
21	0,11 b	0,27 c	209,49 c	209,77 c	98,32 a	1,00 b
22	1,17 b	2,23 c	168,99 d	171,22 d	83,20 b	1,00 b
23	0,21 b	0,36 c	234,64 b	235,01 b	96,89 a	1,00 b
24	9,10 a	18,41 b	172,83 d	191,24 c	27,08 d	1,00 b
25	4,19 b	6,99 c	161,59 d	168,59 d	39,77 c	1,00 b
26	1,29 b	2,6 c	215,78 c	218,38 c	81,43 b	1,00 b
27	2,98 b	6,37 c	208,61 c	214,99 c	57,23 b	1,66 b
28	7,31 a	14,89 b	198,31 c	213,20 c	20,62 d	4,00 a
29	1,79 b	2,97 c	181,28 d	184,26 d	74,24 b	5,00 a
30	2,13 b	5,21 c	226,18 b	231,39 b	69,33 b	2,33 b
31	1,36 b	1,90 c	163,75 d	165,65 d	80,43 b	5,00 a
32	2,23 b	4,94 c	223,85 b	228,80 c	67,95 b	5,00 a
33	1,84 b	4,17 c	215,69 c	219,86 c	73,59 b	1,00 b
34	9,60 a	24,12 a	250,53 b	274,65 a	37,31 c	1,00 b
35	6,86 a	14,86 b	199,67 c	214,53 c	24,23 d	1,00 b
36	0,91 b	1,97 c	203,03 c	205,00 c	86,91 a	5,00 a
37	0,68 b	1,92 c	253,16 b	255,08 b	90,14 a	5,00 a
[A + I]	6,96 a	17,61 b	239,53 b	257,15 b	16,01 d	1,00 b
[A + A]	0,00 b	0 c	173,03 d	173,03 d	100 a	1,00 b

Teste de médias por Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, pacote Laercio (R versão 3.0).

Tabela 70. Teste de comparação de médias para o experimento de plantas de tomate pulverizadas com 100% da dose dos formulados às -72 h e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp. a 0 h.

Formulação	Sev (%)	Área foliar (cm²)			EC (%)	EWRC
		Doente	Sadia	Total		
1	0,22 c	0,39 d	157,13 b	157,52 b	87,47 a	1,33 c
2	0,08 c	0,09 d	127,34 c	127,43 c	95,48 a	5,00 a
3	0,05 c	0,08 d	123,80 c	123,88 c	96,70 a	5,00 a
4	0,10 c	0,13 d	125,11 c	125,24 c	94,35 a	5,00 a
5	0,04 c	0,04 d	92,41 d	92,46 d	97,36 a	5,00 a
6	0,11 c	0,15 d	142,58 b	142,73 b	93,59 a	5,00 a
7	0,58 b	1,00 c	168,76 b	169,77 b	67,23 b	1,33 c
8	0,33 c	0,46 d	115,73 c	116,19 c	81,26 a	1,33 c
9	0,53 b	0,89 c	148,89 b	149,79 b	70,05 b	5,00 a
10	0,10 c	0,11 d	92,31 d	92,43 d	94,16 a	5,00 a
11	0,26 c	0,30 d	119,20 c	119,50 c	85,21 a	5,00 a
12	0,10 c	0,12 d	113,04 c	113,17 c	94,25 a	5,00 a
13	0,05 c	0,05 d	108,14 c	108,19 c	96,70 a	5,00 a
14	0,49 b	0,33 d	73,58 d	73,91 d	72,31 b	5,00 a
15	0,12 c	0,13 d	115,80 c	115,94 c	92,74 a	5,00 a
16	0,08 c	0,05 d	74,69 d	74,75 d	95,29 a	5,00 a
17	0,17 c	0,31 d	93,33 d	93,64 d	89,92 a	1,66 c
18	0,05 c	0,09 d	152,86 b	152,96 b	96,79 a	2,00 b
19	0,02 c	0,02 d	129,32 c	129,35 c	98,68 a	2,00 b
20	0,078 c	0,06 d	124,07 c	124,14 c	95,76 a	2,00 b
21	0,09 c	0,10 d	128,56 c	128,66 c	94,44 a	2,00 b
22	0,31 c	0,19 d	85,31 d	85,50 d	82,39 a	2,00 b
23	0,016 c	0,02 d	148,20 b	148,22 b	99,05 a	2,00 b
24	0,37 c	0,44 d	136,22 c	136,67 c	79,09 a	1,33 c
25	0,52 b	0,73 c	155,27 b	156,01 b	70,62 b	4,00 a
26	0,62 b	0,80 c	145,35 b	146,16 b	64,87 b	4,00 a
27	0,37 c	0,63 c	166,60 b	167,23 b	78,81 a	5,00 a
28	0,61 b	0,58 c	112,27 c	112,85 c	65,06 b	5,00 a
29	0,02 c	0,01 d	106,98 c	107,00 c	98,96 a	2,66 b
30	0,24 c	0,18 d	79,37 d	79,55 d	86,06 a	5,00 a
31	0,22 c	0,30 d	122,84 c	123,15 c	87,09 a	3,00 b
32	0,23 c	0,30 d	134,76 c	135,07 c	86,53 a	5,00 a
33	0,56 b	0,74 c	112,60 c	113,35 c	68,17 b	2,00 b
34	0,75 b	1,51 b	190,23 a	191,74 a	57,34 b	1,00 c
35	0,85 b	1,4 b	175,44 a	176,84 a	51,69 b	1,00 c
36	0,19 c	0,23 d	134,05 c	134,29 c	89,07 a	3,00 b
37	0,42 c	0,59 c	125,28 c	125,88 c	75,98 a	5,00 a
[A + I]	1,77 a	3,47 a	199,21 a	202,69 a	0 c	1,00 c
[A + A]	0 c	0 d	207,39 a	207,39 a	100 a	1,00 c

Teste de médias por Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, pacote Laercio (R versão 3.0).

A partir da seleção pelo índice MGIDI foi possível observar as formulações que proporcionaram os melhores resultados para os experimentos executados, levando em consideração parâmetros ideiais como: menor severidade, maior eficiência de controle, maior índice de área foliar sadia/total, menor área foliar doente e menor fitotoxidez (Figura 14).

Com seleção de 10% dos melhores tratamentos para o experimento *in vivo* [50% da dose], determinou-se que as formulações mais promissoras foram, em ordem decrescente: 9, 6, 10 e 5 (Figura 14A). Para o experimento com [100% da dose], foram selecionadas as formulações: 18, 23, 1 e 19 (Figura 14C). Considerando os experimentos *in vitro* (crescimento micelial e germinação de esporos) foram selecionados as formulações 2, 33, 12 e 27 (Figura 14E). Uma visão geral do ideótipo para todas as variáveis agrupadas pode ser observada na Figura 14G, que selecionou os tratamentos 23, 18, 19 e 20 como as melhores formulações.

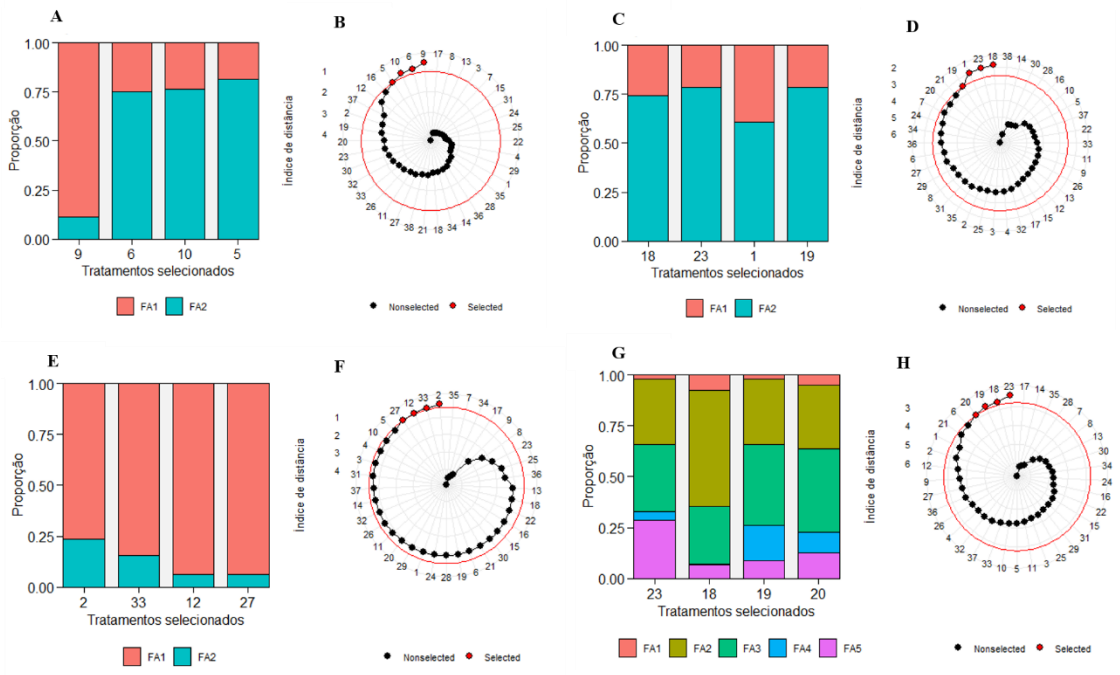

Figura 14. Contribuição dos fatores para cada experimento e a classificação dos tratamentos em ordem crescente para o índice MGIDI; os tratamentos selecionados são mostrados na cor vermelha e o círculo vermelho representa o ponto de corte de 10% para os experimentos com 50% (A, B) e 100% dose dos formulados (C, D), *in vitro* (D, E) e todas as variáveis agrupadas (E, F), respectivamente. O tratamento controle [A+I] foi retirada da seleção nesta etapa para não influenciar nos resultados.

Utilizando o índice MGIDI como parâmetro estatístico e com base na composição de cada formulação, considerando o uso da menor quantidade de i.a. e aditivos foram escolhidas as seguintes formulações: 1, 5, 9, 10, 18 e 23.

O experimento com [50% da dose] proporcionou menores níveis de fitotoxidez nas plantas de tomate, quando comparado com o experimento [100% da dose]. Estas diferenças entre os tratamentos podem ser observadas claramente nas Figuras 12 e 13, com redução da área foliar e encarquilhamento das folhas nos tratamentos 3, 5, 14, 22, 28 e 30 [100% da dose].

Nossos resultados corroboram com outros autores que verificaram eficácia no controle de doenças em tomateiro utilizando formulação a base de óleos essenciais. Gonçalves et al. (2021), por exemplo, formularam produtos contendo óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, e estes forneceram 42,4% de eficiência no controle da murcha de Fusarium, sem ocasionar sintomas de fitotoxidez nas plantas de tomate tratadas.

Em condições de casa de vegetação, uma nanoformulação com óleo essencial de *Mentha piperita* promoveu 87% de eficiência de controle da pinta preta de tomateiro, com superioridade ao fungicida carbendazim (PANDEY et al., 2020). Os autores ainda verificaram redução no teor de prolina e peroxidação de lipídios em plantas de tomate, além da expressão de genes responsivos a defesa, promovendo atenuação dos sintomas da doença.

Cruz et al. (2018) verificaram alta eficiência de controle do fungo *Thielaviopis paradoxa* em plantas de coqueiro, com a utilização de nanoemulsão do óleo essencial de *Lippia gracilis.* Uma das formulações desenvolvidas apresentava pH ácido e partículas com 15 nm de diâmetro, e com apenas 0,6 mg mL^{-1} garantiu controle satisfatório da doença, além de não apresentar fitotoxidez nas plantas.

Nanoemulsões com os óleos essencias de *Syzygium aromaticum* e *Nigella sativa* promoveram redução significativa do crescimento micelial de fungos pós-colheita de pepino, utilizando 5,0 µL mL^{-1} destas formulações (MOSSA et al., 2021). Quando utilizada a mistura de 2:1 (v/v) destas nanoemulsões, os autores observaram redução da esporulação e mortalidade de plantas de pepino. Para utilizar como tratamento de imersão, esta formulação na concentração de 2% reduziu completamente a podridão pós-colheita de pepinos (MOSSA et al., 2021).

Nanoemulsões não iônicas com os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum Cymbopogon* sp. também podem suprimir o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* A nanoemulsão com estes óleos essenciais demonstrou sinergismo

entre eles, com diâmetro médio de partículas de 76,73 nm, inibindo o crescimento do fungo na dose de 4000 mg L^{-1} do produto. A rápida inibição do crescimento micelial foi explicada pelo rompimento da integridade da membrana fúngica. Já em condições *in vivo*, a nanoformulação reduziu a incidência da murcha de Fusarium em até 70% quando comparado com o controle não tratado, sem promover fitotoxidez nas plantas de tomate (SHARMA et al., 2017).

Yang et al. (2021) citam que nanoemulsões de compostos como cinamaldeído, carvacrol e eugenol com boa estabilidade apresentam partículas uniformes, e alcançara CMI de 0,125 mg mL^{-1} para o fungo *Penicillium digitatum*. A germinação e morfologia de esporos e a permeabilidade do micélio foi alterada com as nanoemulsões. Além disso, o revestimento de frutas com filmes contendo nanoemulsão de óleos essenciais pode reduzir potencialmente a taxa de decomposição de frutas cítricas (YANG et al., 2021). Outras abordagens utilizando nanoemulsão com timol em filmes de revestimento de frutos de tomate possibilitam maior vida útil na prateleira, reduzindo significativamente o crescimento de *Botrytis cinerea* (ROBLEDO et al., 2018).

Para patógenos de solo como *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* também são observados resultados promissores na literatura com nanoemulsões do óleo essencial do gênero *Cymbopogon* (OSMAN MOHAMED ALI et al., 2017).

Contaminantes de alimentos tem sido alvo da nanotecnologia com óleos essenciais. O óleo essencial de *Ocimum basilicum*, por exemplo, foi utilizado como ingrediente ativo em nanoemulsão contra os fungos *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus flavus.* Esta nanoemulsão apresentou boa estabilidade, com 78 nm como tamanho médio de partículas, e em experimentos *in vitro* na dose de 1000 ppm promoveu em elevada atividade fungicida, com aproximadamente 65% de eficiência de controle quando comparado ao fungicida Carbendazim (GUNDEWADI et al., 2018).

A seleção de formulações a partir do índice MGIDI fornece uma visão abrangente e inovadora na seleção de tratamentos. Está sendo utilizada para experimentos com plantas, a fim de determinar parâmetros ideais de qualidade para cultivares de morangueiro (OLIVOTO et al., 2021). Para a seleção do nosso estudo, escolhemos as formulações 1, 5, 9, 10, 18 e 23. As formulações 1 e 9 correspondem a formulações desenvolvidas com o óleo essencial E + aditivos, já as formulações 5 e 10 apresentam óleo essencial + fungicidas + aditivos. As formulações 18 e 23 são semelhantes às formulações 5 e 10, com adição de um fungicida multissítio, tornando-as misturas triplas (óleo essencial + fungicida sítio-específico + fungicida multissítio).

A severidade da pinta preta conforme a formulação pode ser facilmente identificada nas formulações 7, 8 e 9, que correspondem a mesma composição, somente com incremento do adjuvante utilizado [100, 200 e 500% da dose].

De maneira geral, as nanoformulações responderam positivamente ao objetivo inicial para a redução da severidade da pinta preta de tomateiro. Contudo, a fitotoxidez que formulações desenvolvidas promove em plantas ainda deve ser melhor ajustada, pois um dos pilares da tecnologia nano, na redução da toxicidade (BONIFÁCIO et al., 2014; WANG et al., 2014).

4.6 Caracterização da estabilidade físico-química

Inúmeros são os parâmetros que podem influenciar no tamanho e polidispersão de diferentes sistemas nanoparticulados como: a composição da formulação, método de preparo e armazenamento. A tendência à precipitação e sedimentação dessas suspensões coloidais pode ser monitorada através das medidas de tamanho e polidispersão (PHAN; HAES, 2019).

A Figura 15 traz os valores de diâmetro hidrodinâmico (nm) para as formulações armazenadas em condição ambiente e geladeira analisadas por duas diferentes técnicas: DLS (Figura 15AB) e NTA (Figura 15CD). De maneira geral, podemos observar que os resultados para a técnica de DLS mostraram maiores alterações para os valores de tamanho das formulações em função do tempo em comparação aos resultados pela técnica de NTA. Inicialmente as formulações 1, 9, 5, 10, 18 e 23 armazenadas em temperatura ambiente e analisadas por DLS apresentaram um diâmetro médio de 107,5 ± 0,7 nm, 319,7 ± 0,5 nm, 121,7 ± 1,4 nm, 307,9 ± 16,1 nm, 133,4 ±1,0 nm e 289,9 ± 8,1 nm, respectivamente.

Quando as mesmas formulações foram analisadas pela técnica de NTA observou-se que os valores de diâmetro médio inicial foram mais homogêneos sendo de 219,3 ± 8 nm, 239,8 ± 5,4 nm, 217,3 ± 29 nm, 220,6 ± 20,2 nm, 177,2 ±11,8 nm e 211,4 ± 9,6 nm, respectivamente. Tais diferenças estão relacionadas a peculiaridade de cada técnica. A técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) é muito semelhante à técnica de espectroscopia de correlação de fótons, no entanto devido utilização de uma câmera é possível detectar partículas individualmente, fazendo também determinação da concentração dessas partículas.

Podemos observar que todas as formulações apresentaram alterações nos valores de diâmetro médio em função do tempo de armazenamento, no entanto a formulação 23 foi a que apresentou maiores alterações nestes valores. Quando armazenada em temperatura ambiente, esta formulação atingiu valores de 693,2 ± 9,9 nm com 150 dias quando analisada por DLS, já por NTA podemos observar também a mesma tendência de aumento atingindo um diâmetro médio de 440,7 ± 32,2 nm.

A maioria das formulações se encontra dentro da escala de nanoemulsão padrão, variando de 20 a 500 nm (PEY et al., 2006). Para controle da pinta preta de tomateiro, Pandey et al. (2020) observaram eficiência da nanoemulsão do óleo essencial de *Mentha piperita*, a qual continha partículas menores que 100 nm de diâmetro. Como parâmetro de estabilidade, o tamanho de partícula é relevante e de grande importância para sistemas emulsificados (LI et al., 2010).

Para controle de podridões pós-colheita em frutos de pepino, Mossa et al. (2021) desenvolveram nanoemulsões com os óleos essencias de *Syzygium aromaticum* (cravo) e *Nigella sativa* (sementes pretas) e verificaram o menor tamanho de partícula após 10 minutos de sonicação em aparelhos do tipo ultrassom, com uma proporção de óleo e adjuvante de 1:1 e 1:2 para os óleos de cravo e sementes pretas, respectivamente.

Alterações nos valores de diâmetro médio em função do tempo estão relacionados principalmente a fatores de agregação (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Em relação as condições de armazenamento não foram observadas grandes alterações nos valores de diâmetro médio das formulações em relação ao armazenamento em temperatura ambiente, sendo que a 23 analisada pela técnica de NTA (Figura 15D) também apresentou tendência de aumento.

Wan et al. (2019) observaram poucas alterações na estrutura física das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento em condições de temperatura ambiente (25ºC) e geladeira (4ºC). As diferenças observadas são entre as emulsões, as quais foram desenvolvidas por óleos essenciais diferentes e estes possuem compostos químicos diferenciados. Compostos como eugenol apresentam solubilidade em água relativamente alta, o que seria responsável pelo aumento no diâmetro das partículas durante o armazenamento à temperatura ambiente (WAN et al., 2019). Limoneno também possui alta solubilização e pode agregar mais rapidamente em condições de temperatura ambiente (LIEW et al., 2020).

Outro parâmetro avaliado foi o índice de polidispersão (IP), o qual indica a distribuição de tamanho das nanopartículas em função da distribuição de tamanho

médio, sendo que índices menores indicam uma estreita faixa de tamanho para as nanopartículas. Em literatura, encontram-se trabalhos que preconizam valores de IP inferiores a 0,2 como indicadores de boa dispersão do sistema (DANAEI et al., 2018; RAVAL et al., 2018).

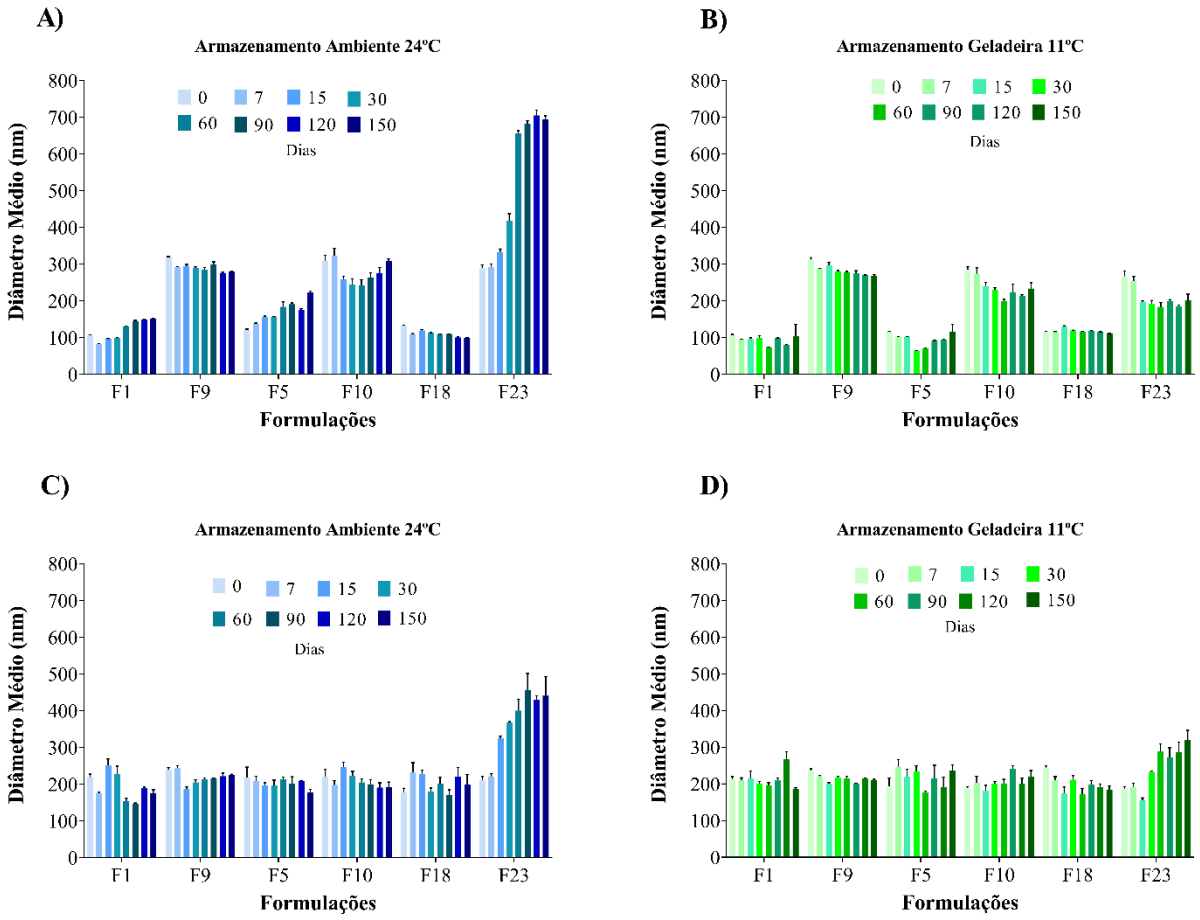

Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das formulações armazenadas em temperatura ambiente e geladeira, em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em ambiente analisadas por DLS (A); Formulações armazenadas em geladeira analisadas por DLS (B); Formulações armazenadas em ambiente analisadas por NTA (C); Formulações armazenadas em geladeira analisadas por NTA (D). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

A Figura 16 apresenta os valores de índice de polidispersão para as formulações nas condições de armazenamento. É possível observar que quando armazenadas em temperatura ambiente as formulações apresentaram menores valores de IP em comparação as formulações armazenadas em geladeira. É possível ainda observar que as formulações armazenadas em geladeira também sofreram maiores alterações nesses

valores em função do tempo. Podemos observar que quando armazenadas em temperatura ambiente, as formulações 10 e 23 foram as que apresentaram maiores valores de IP com valores superiores a 0,5. Já no armazenamento em geladeira vemos que as formulações 1 e 5, também apresentaram elevados valores de índice de polidispersão nos tempos finais.

Apesar das alterações nos valores de IP para as formulações, podemos observar que pelas análises de tamanho apresentadas anteriormente, apenas a formulação 23 também apresentou grandes alterações nos parâmetros de tamanho, demonstrando uma forte tendência de aglomeração.

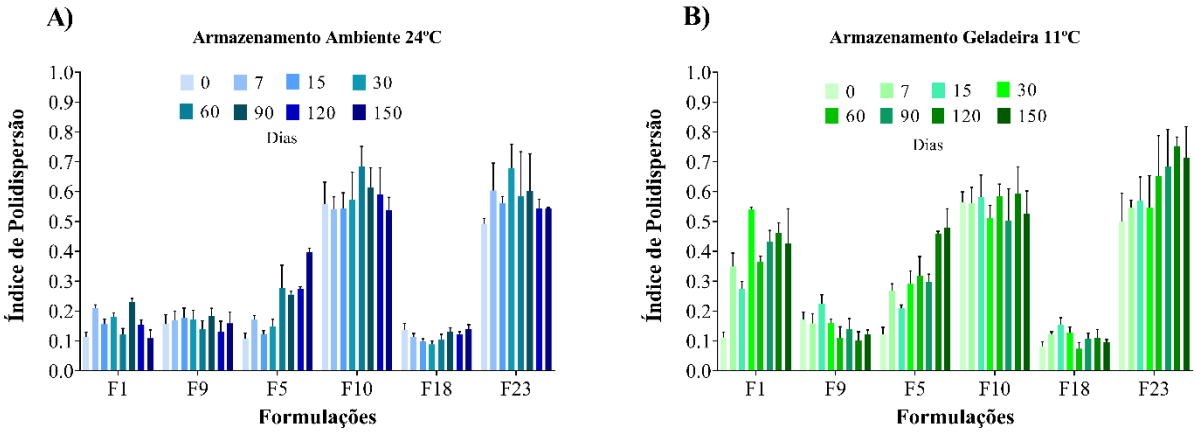

Figura 16. Índice de polidispersão das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

A Figura 17 apresenta os gráficos de distribuição de tamanho das formulações analisadas através das técnicas de DLS e NTA armazenadas em temperatura ambiente. Através desses gráficos é possível visualizar melhor os resultados de IP apresentados na Figura 16. Podemos observar a faixa de tamanho semelhante entre as técnicas de DLS e NTA para todas as formulações. Assim como mostrado na Figura 16, as formulações 10 e 23 foram as que apresentaram maiores valores de IP, o que podemos observar na Figura 17, onde em ambas a técnicas são observadas diferentes populações, indicando maior heterogeneidade dessas formulações.

O potencial zeta também foi utilizado como parâmetro para medir a estabilidade das formulações. Este parâmetro indica a carga superficial da partícula, e é influenciado principalmente pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Isto pode ser

devido a composição da partícula e/ou meio dispersante, pH e força iônica. O valor de potencial zeta está diretamente relacionado com a repulsão eletrostática e a estabilidade da suspensão, sendo que em módulo, um valor relativamente alto de potencial zeta representa uma boa estabilidade da suspensão coloidal (RAVAL et al., 2018).

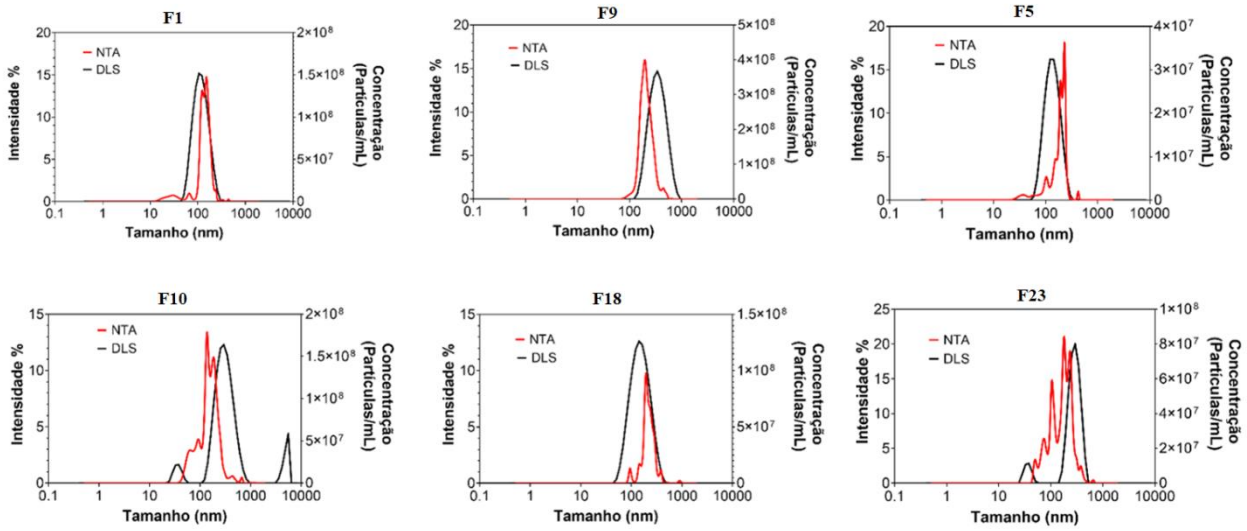

Figura 17. Distribuição de tamanho das formulações analisadas por DLS e NTA e armazenadas em temperatura ambiente. Determinação em triplicata (n=3).

Todas as formulações apresentaram valores negativos de potencial zeta, sendo também observados valores semelhantes para ambas as condições de armazenamento (Figura 18). A formulação que apresentou maior valor de potencial zeta foi a 9 com valores superiores a -40 mV. Destaca-se que as formulações não sofreram grandes alterações nos valores de potencial zeta em função do tempo, exceto para a formulação 23 armazenada em temperatura ambiente que apresentou no tempo inicial um potencial zeta de -28,5 ± 0,3 mV e com 150 dias atingiu um valor de -6,5 ± 3,5 mV. Esses resultados corroboram com os apresentados na Figura 16 e Figura 17, onde foi observado valores elevados de índice polidispersão e um grande aumento no diâmetro médio, sendo um alto indicativo de agregação do sistema.

Como já mencionado anteriormente, através das análises pela técnica de NTA é possível determinar a concentração de nanopartículas nas formulações, uma vez que estas partículas são analisadas individualmente.

As formulações apresentaram valores similares para a concentração de partículas, independente da maneira de armazenamento (Figura 19). A maior

concentração de partículas foi observada para a formulação 9 que apresentou valores médios de 4 x 10^{10} [partículas] mL^{-1}. A grande maioria das formulações apresentou valores de concentração inferiores a 2 x 10^{10} [partículas] mL^{-1}. Destaca-se que em função do tempo não foram observadas grandes alterações nos valores de concentração que indicassem instabilidade dos sistemas para a maioria das formulações avaliadas. Exceto para a formulação 23 que apresentou um expressivo aumento de concentração em função do tempo. Tais resultados corroboram com os demais parâmetros já mostrados que indicam a instabilidade da formulação, com aumento de tamanho polidispersão além de diminuição nos valores de potencial zeta.

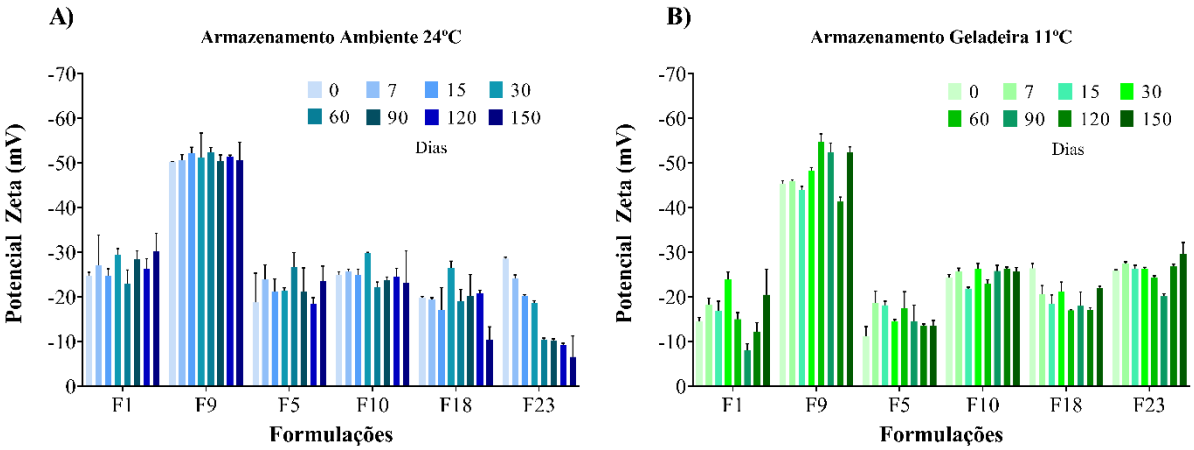

Figura 18. Potencial Zeta das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

Não foram verificadas grandes alterações para esta variável ao longo do período de armazenamento, nem sob as condições a que foram submetidas. O maior pH foi observado na formulação 9, tanto em condições de temperatura ambiente quanto na geladeira, variando de 6,70 até 8,47 (Figura 20).

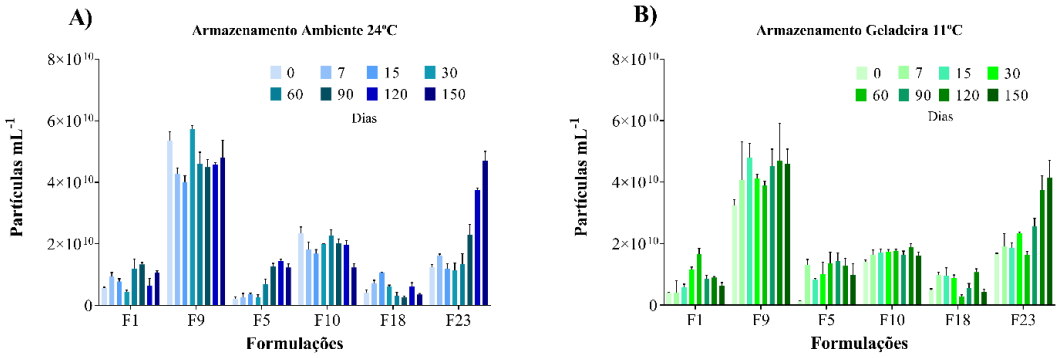

Figura 19. Concentração de partículas das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 160 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

Trabalho semelhante foi realizado por Cruz et al. (2018), desenvolvendo protóticos de nanoformulação com óleo essencial de *Lippia gracilis* para controle de um fungo do coqueiro. As formulações apresentaram tamanho de 15 e 87,8 nm, pH ácido entre 5,49 e 6,50, e índice de polidispersão variando de 0,260 e 0,340. O potencial zeta destas formulações variou de -5,27 a -4,42, indicando rápida agregação com o surfactante, gerando boa estabilidade (CRUZ et al., 2018).

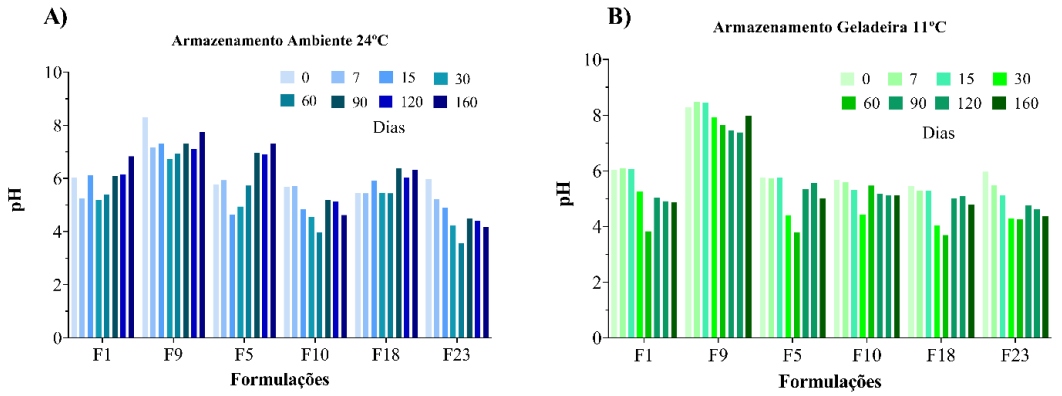

Figura 20. pH das formulações em função do tempo de armazenamento (0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Formulações armazenadas em temperatura ambiente (A) e formulações armazenadas em geladeira (B).

Outras formulações utilizando óleos essenciais e Tween, produziram partículas com tamanho médio de 21 a 60 nm, índice de polidispersão de 0,44 a 0,55 (LIEW et al., 2020). Alguns autores também citam a importância de desenvolver emulsificações de baixa energia, a fim de que compostos dos óleos essenciais não sejam prejudicados em

métodos de alta temperatura durante o processo de homogeneização (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016).

A absorção de nanopesticidas ocorre quando uma partícula penetra nas paredes celulares das plantas após a aplicação. Geralmente, o diâmetro médio das partículas é menor que o tamanho dos estômatos e células de entrada, o que facilita sua entrada na planta rapidamente (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009). Contudo, a composição destas partículas pode alterar a interação com a folha e deve ser bem estudada.

As nanoemulsões são veículos de entrega potentes e promissores de substâncias antimicrobianas lipofílicas. As vantagens potenciais das nanoemulsões são tamanho pequeno (geralmente <100 nm), baixa polidispersidade, liberação lenta de compostos bioativos e uso comparativamente baixo de surfactantes e i.a. Estas perspectivas tem crescido entre os cientistas que buscam soluções mais sustentáveis com o emprego de óleos essenciais na agricultura (OSMAN MOHAMED ALI et al., 2017).

A maior superfície de contato das nanoemulsões melhora o contato entre o produto e a superfície da planta (epiderme de folhas e caules), e pode ser o principal fator de eficiência de nanopesticidas em comparação com a forma livre de agrotóxicos (PEREIRA et al., 2014). Para produtos hidrofóbicos, como é o caso de óleos essenciais, a redução do tamanho de partículas melhora a interação com a cutícula da folha, e ao mesmo tempo reduz a perda do elemento ativo para o meio ambiente (DE OLIVEIRA et al., 2014). Alguns autores relatam os pontos positivos de reduzir tamanho de partículas de agrotóxicos já existentes no mercado, pois garantem rápida absorção e ação (BOMBO et al., 2019).

O uso de baixas quantidades de produto na formulação e na aplicação são condições atrativas do ponto de vista econômico, e por isso, os nanopesticidas são relatados como “mais potentes” quando comparados com os análogos, pois reduzem os custos finais da produção (KAH; HOFMANN, 2014; ADISA et al., 2019).

4.7 Alterações bioquímicas em plantas de tomate tratadas com nanoformulações para controle da pinta preta

A análise de variância demonstrou significância ($p \leq 0,05$) para algumas épocas de coleta, e as letras correspondentes à semelhança estatística pelo teste de Tukey apresentada nos tratamentos.

No primeiro experimento, o tratamento [F1+A] elevou a atividade da enzima peroxidase às 12, 24 e 48 horas, diferindo do tratamento [A+A] (Figura 21A). A atividade da enzima β-1,3 glucanase foi elevada a 0, 12 e 24 horas com o tratamento [F1+A], demonstrando rápida resposta ao produto (Figura 21C). O acúmulo de compostos fenólicos foi reduzido no tratamento [F1+A] às 24 horas, diferindo estaticamente de [A+A] (Figura 21E).

Para o experimento com inoculação, a atividade enzimática da peroxidase foi elevada apenas às 96 horas após inoculação (hai) nos tratamentos [F1+I] e [A+I], diferindo estatisticamente da testemunha [A+A] (Figura 21B). A atividade da enzima β-1,3 glucanase foi alterada entre os tratamentos, quando [F1+I] promoveu os maiores valores, diferindo do controle [A+I] (Figura 21D). O acúmulo de compostos fenólicos não foi alterado durante os períodos de análise (Figura 21F).

Atividade da enzima peroxidase foi elevada às 12 e 48 h com o tratamento [F9+I] no primeiro experimento, diferindo estatisticamente de [A+A] (Figura 22A). Diferenças significativas foram observadas a 0 e 12 h para a atividade da enzima β-1,3 glucanase no tratamento [F9+A] (Figura 22C). Alterações significativas para compostos fenólicos foram observadas às 12 h, quando este tratamento reduziu o acúmulo em comparação com a testemunha [A+A] (Figura 22E).

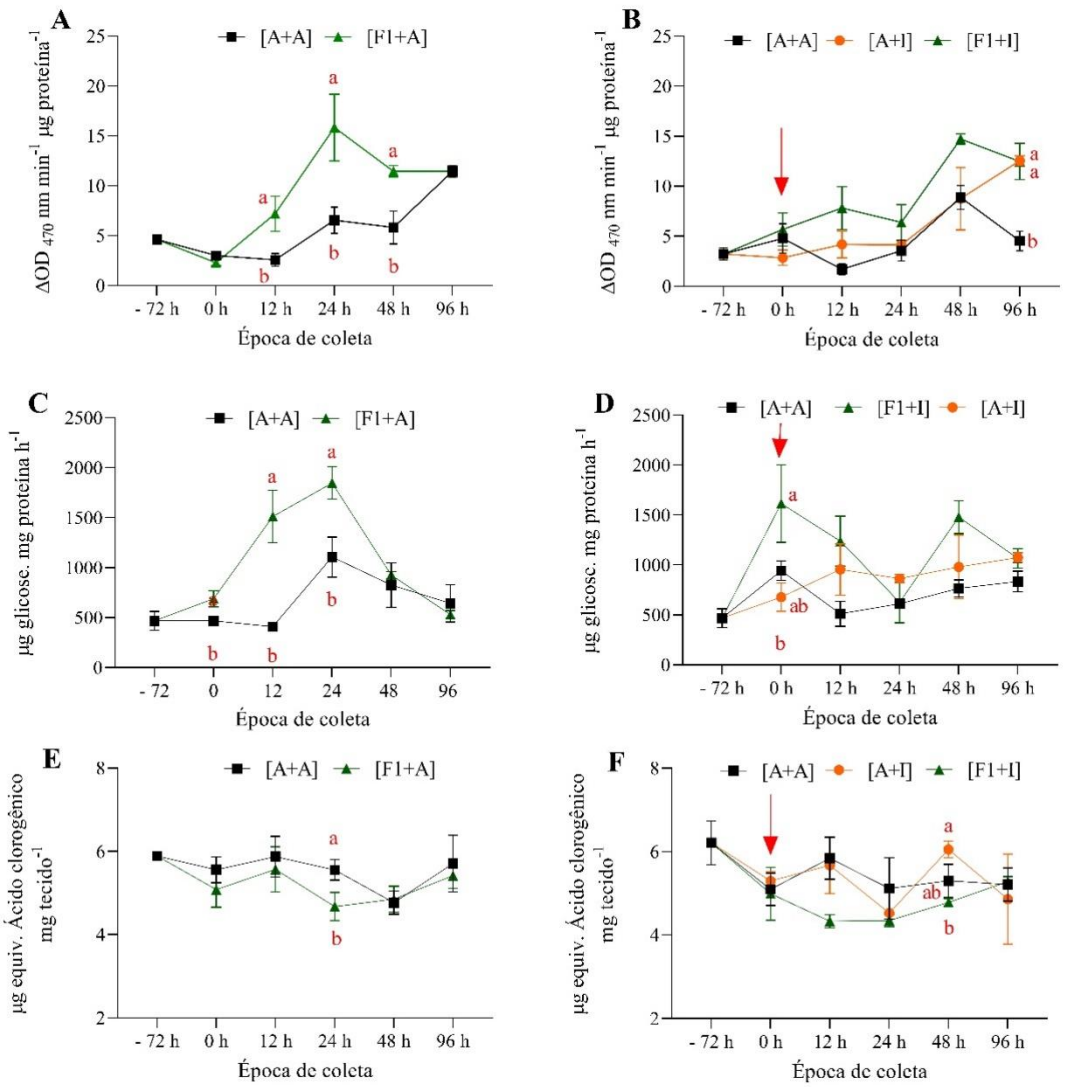

Figura 21. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β-1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F1, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna.

[1] Setas indicam momento da inoculação no experimento II.
[2] Barras representam o erro padrão da média (n=3).
[3] Letras minúsculas comparam entre tratamentos no horário indicado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No experimento com inoculação, o tratamento [F9+I] proporcionou maior atividade da enzima peroxidase, sendo que às 12 hai diferiu estatisticamente de [A+A], e às 24 hai diferindo de ambos os tratamentos. Às 96 hai o tratamento [F9+I] promoveu outro pico de atividade da enzima peroxidase, permanecendo igual ao controle [A+I] e diferindo da testemunha [A+A] (Figura 22B). Embora sem diferença estatística, a atividade da enzima β-1,3 glucanase foi superior para o tratamento [F9+I], que após a inoculação, foi superior ao controle [A+I], que por sua vez superior à testemunha [A+A]

(Figura 22D). Os tratamentos não influenciaram significativamente o conteúdo de compostos fenólicos livres (Figura 22F).

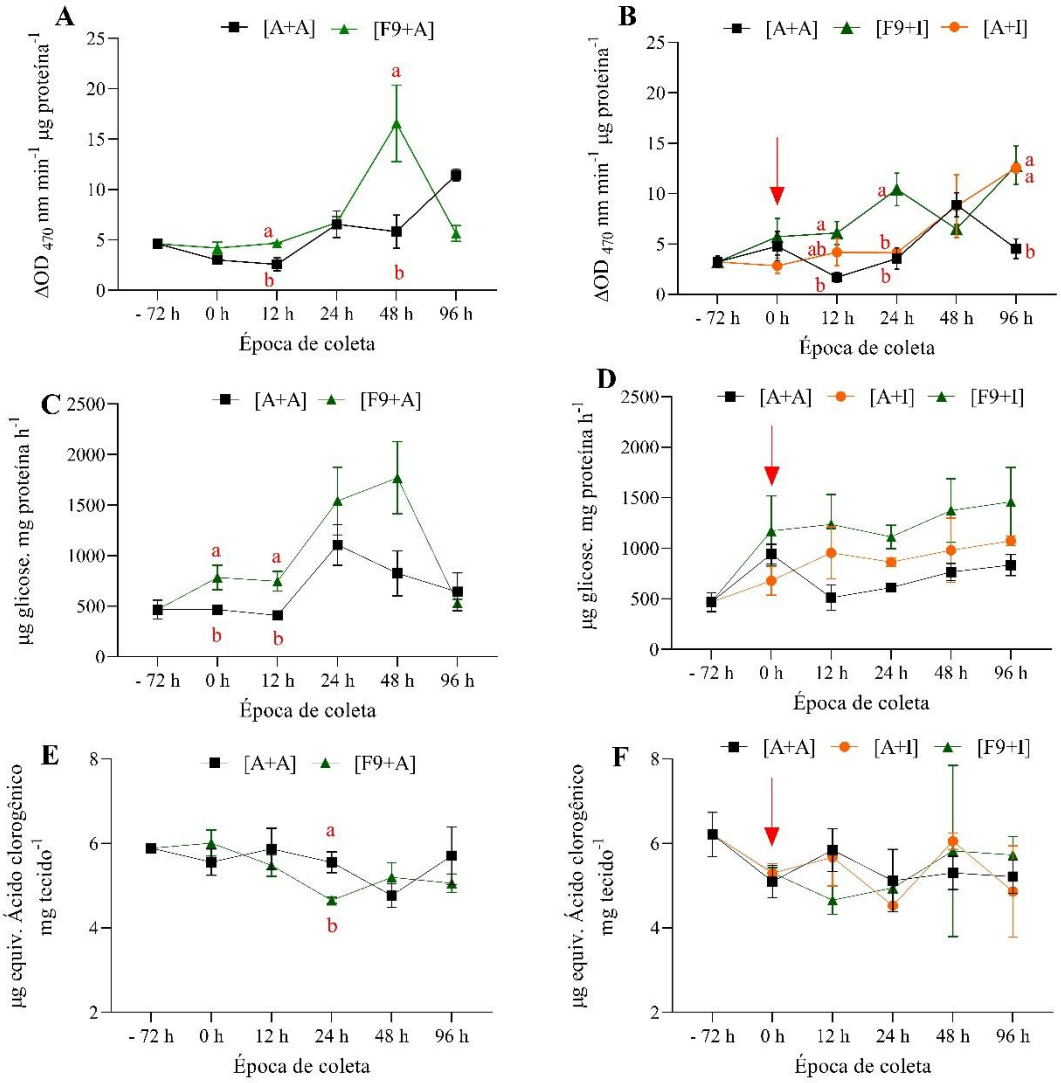

Figura 22. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β -1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F9, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna.

[1] Setas indicam momento da inoculação no experimento II;
[2] Barras representam o erro padrão da média (n=3);
[3] Letras minúsculas comparam entre tratamentos no horário indicado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A atividade da enzima peroxidase de plantas tratadas com [F10+A] foi superior à testemunha [A+A] às 48 horas, para o primeiro experimento (Figura 23A). Já a atividade da enzima β-1,3 glucanase foi rapidamente ativada, 0 e 12 horas, diferindo

estatisticamente do outro tratamento (Figura 23C). O acúmulo de compostos fenólicos livres foi reduzido com o tratamento [F10+A] a 0 h (Figura 23A).

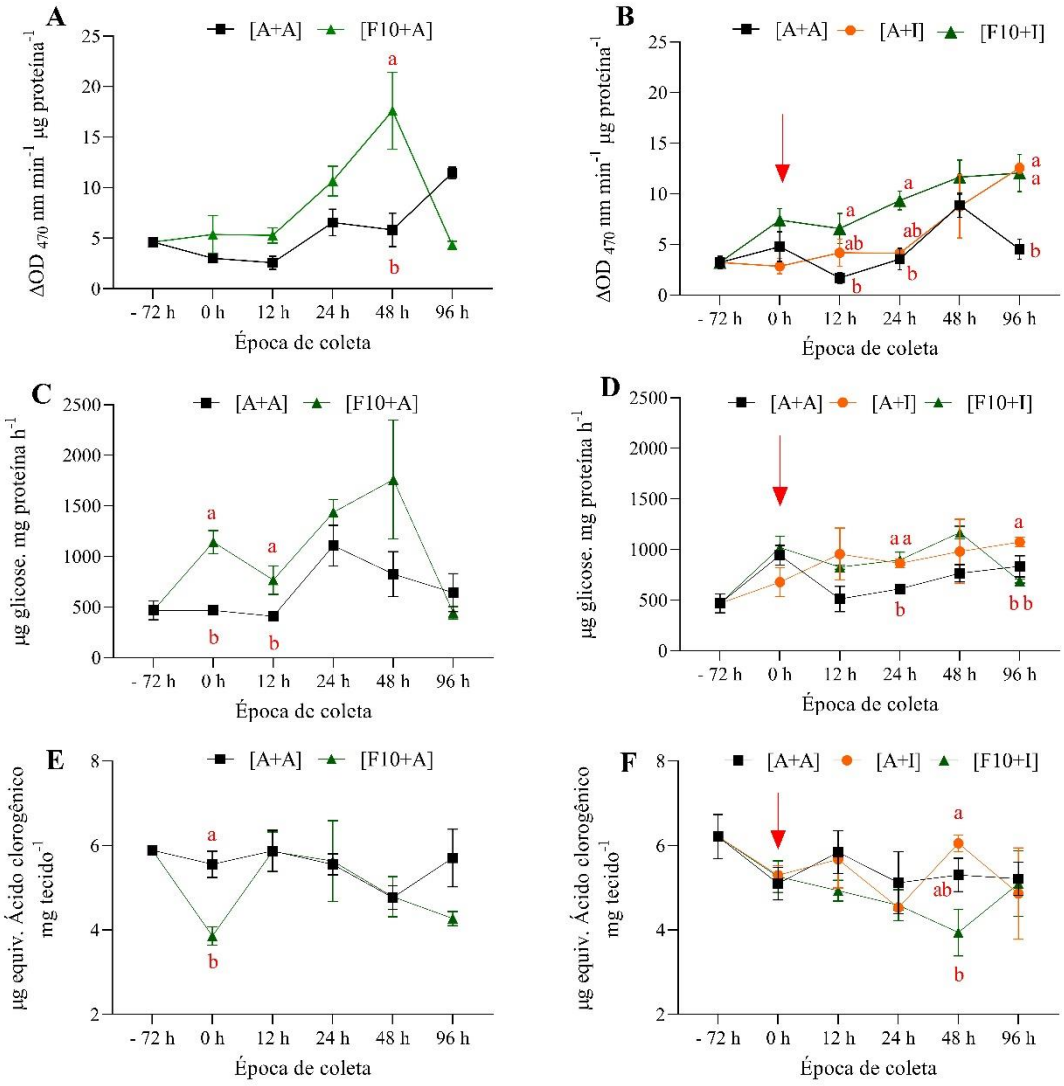

Figura 23. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β -1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F10, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna.

[1] Setas indicam momento da inoculação no experimento II.
[2] Barras representam o erro padrão da média (n=3).
[3] Letras minúsculas comparam entre tratamentos no horário indicado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No experimento com inoculação, o tratamento [F10+I] promoveu maior atividade da enzima peroxidase às 12 e 24 hai, diferindo estatisticamente da testemunha [A+A]. Às 96 hai os tratamentos [F10+I] e [A+I] foram superiores à testemunha [A+A], demonstrando a resposta das plantas quando inoculadas (Figura 23B). Para a enzima β-1,3 glucanase foi verificado diferenças na atividade às 24 hai quando as plantas

receberam [F10+I] e [A+I], diferindo da testemunha [A+A]. Já às 96 hai o tratamento com [A+I] proporcionou os maiores valores desta enzima (Figura 23D).

O acúmulo de compostos fenólicos foi alterado às 48 hai, quando o tratamento [F10+I] reduziu os valores, diferindo estatisticamente do controle [A+I] (Figura 23F).

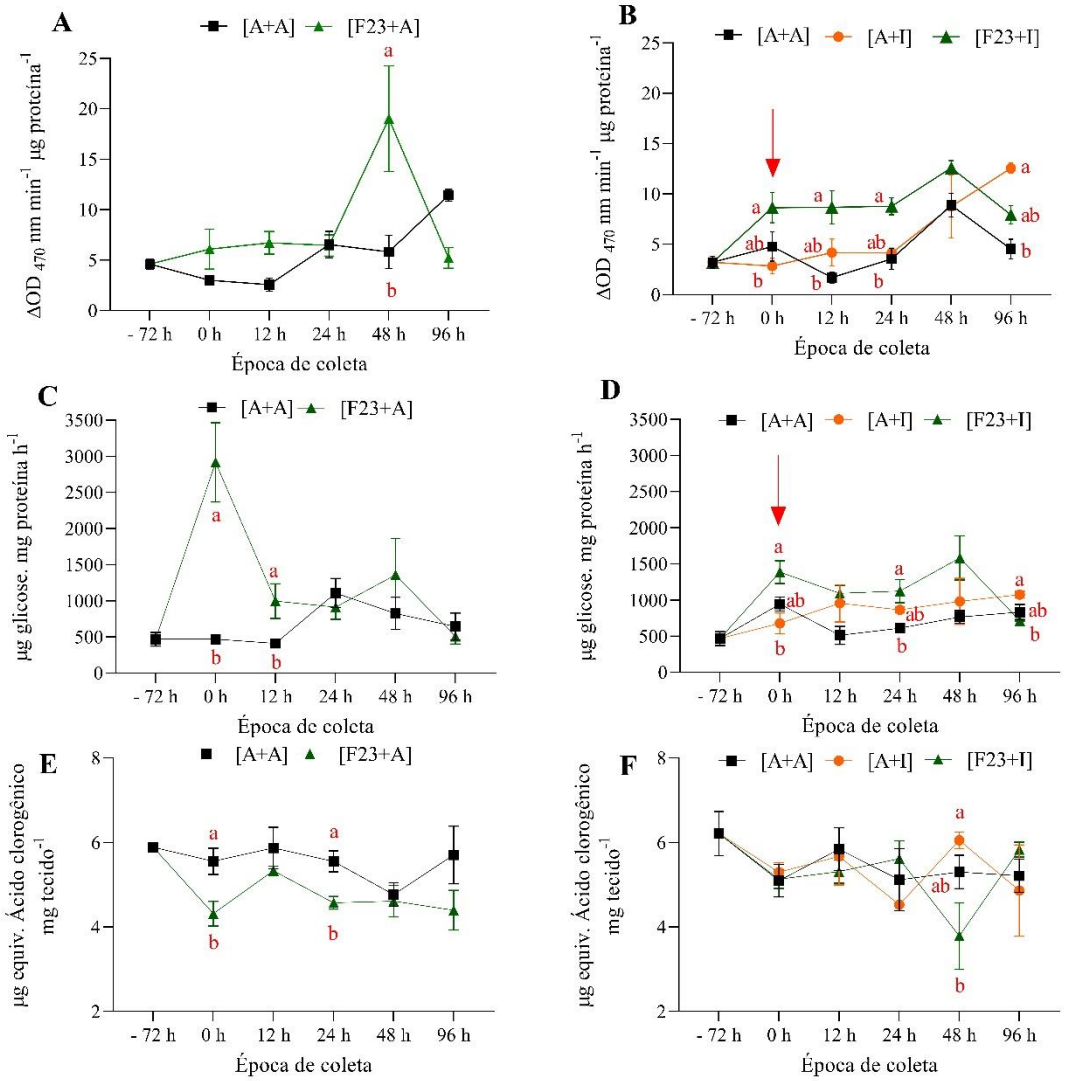

Figura 24. Atividade das enzimas guaiacol peroxidase (A, B) β-1,3 glucanase (C, D), e acúmulo de fenóis livres (E, F) em folhas de tomate submetidas a pulverização com o produto F23, nos experimentos I e II, sem e com inoculação, respectivamente conforme a coluna.

[1] Setas indicam momento da inoculação no experimento II;
[2] Barras representam o erro padrão da média (n=3);
[3] Letras minúsculas comparam entre tratamentos no horário indicado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A atividade da enzima peroxidase foi elevada às 48 horas quando as plantas foram tratadas com [F23+A], diferindo estatisticamente da testemunha [A+A] (Figura

24A). Este tratamento também elevou a atividade da enzima β-1,3 glucanase a 0 e 12 horas, diferindo de [A+A] (Figura 24C). O tratamento [F23+A] promoveu redução de compostos fenólicos a 0 e 24 horas, diferindo da testemunha [A+A] (Figura 24E).

O tratamento [F23+I] promoveu maiores alterações bioquímicas no experimento com inoculação, elevando a atividade da enzima peroxidase a 0, 12 e 24 hai. Às 96 hai, as plantas que receberam o tratamento com [A+I] apresentaram elevada atividade da enzima peroxidase, diferindo de [A+A] (Figura 24B). A atividade da enzima β-1,3 glucanase também foi elevada pelo tratamento [F23+I] a 0 e 24 hai, diferindo dos demais tratamentos. Da mesma forma como para peroxidase, às 96 hai houve um incremento da atividade de β-1,3 glucanase no tratamento água+inóculo, diferindo estatisticamente do [F23+I] (Figura 24D). Os compostos fenólicos livres também foram reduzidos com [F23+I] às 48 hai (Figura 24F).

A área abaixo da curva do progresso da atividade bioquímica (AACPab) foi superior no tratamento [F23+A] para as enzimas peroxidase e β-1,3 glucanase, no experimento I. O acúmulo de compostos fenólicos livres foi elevado no tratamento [A+A], embora sem grandes diferenças entre os tratamentos. Para o experimento II, o tratamento [F1+I] proporcionou a maior AACPab para as enzimas peroxidase e β-1,3 glucanase. O acúmulo de compostos fenólicos livres foi superior no tratamento [F9+I], quando comparado com os demais (Tabela 11).

Tabela 8. Área abaixo da curva do progresso da atividade bioquímica (AACPab) em folhas de tomate submetidas a pulverização com os indutores + água (A) ou inoculação (I), nos experimentos I e II, respectivamente.

	Experimento I		
	Peroxidase	β-1,3 glucanase	Compostos fenólicos livres
A+A	806,48	99859,58	**924,17**
F_1+A	1160,29	143202,40	880,94
F_9+A	1263,66	164657,15	922,22
F_{10}+A	1384,29	173891,11	820,49
F_{23}+A	**1428,79**	**228648,74**	811,00
	Experimento II		
	Peroxidase	β-1,3 glucanase	Compostos fenólicos livres
A+A	829,66	125454,30	904,17
A+I	976,75	137691,36	918,32
F_1+I	**1400,21**	**196078,17**	850,64
F_9+I	1157,32	189752,08	**926,52**
F_{10}+I	1388,43	148596,16	840,74
F_{23}+I	1392,49	186831,46	879,73

A redução dos compostos fenólicos nos chamou atenção, e por isso analisamos os resultados conjuntamente através da análise de componentes principais (PCA), a fim de entender as alterações bioquímicas que os tratamentos promoveram e como elas se comportam após aplicação/inoculação. Na PCA foram selecionados os dois componentes principais para os experimentos I e II, explicando 58,02% e 45,64% da variação dos dados, respectivamente (Figura 25).

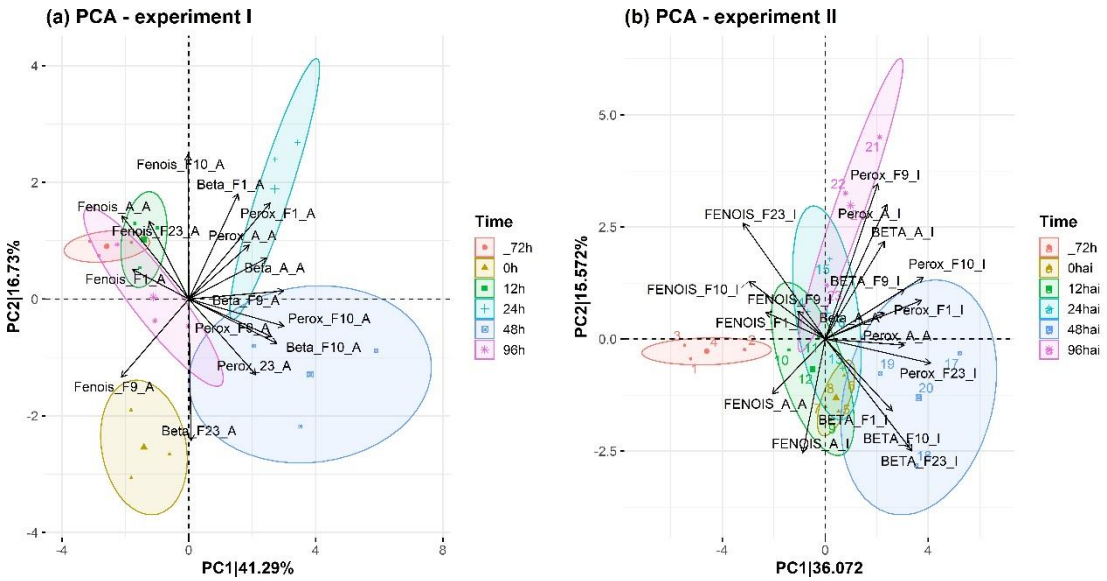

Figura 25. Análise de componentes principais para as análises bioquímicas realizadas nos experimentos I e II, sendo as variáveis: peroxidase (Perox), β, 1-3 glucanase (Beta), compostos fenólicos (Fenois), e os tratamentos: [A_A], [F_1_A], [F_9_A], [F_{10}_A] e [F_{23}_A]. Os contornos foram classificados em função dos horários de avaliação. Traço entre os caracteres representa a aplicação prévia + inoculação ou não.

O primeiro componente principal explicou 41,29% da variância dos dados no experimento I. A atividade das enzimas peroxidase [F10+A], [F9+A], [F23+A] e β, 1-3 glucanase [F10+A], [F9+A] foram agrupadas principalmente em função das 48 horas. Às 24 horas verificou-se o agrupamento das enzimas peroxidase e β, 1-3 glucanase com os tratamentos [F1+A] e [A+A] (Figura 25A).

O componente principal 2 explicou 16,73% da variância dos dados. O tratamento [F23+A] apresentou maior atividade da enzima β, 1-3 glucanase a 0 h. Para fenóis este tratamento foi agrupado às 12 horas. Verificou-se relação negativa entre compostos fenólicos e as enzimas analisadas (Figura 25A).

O primeiro componente principal explicou 36,07% da variância dos dados no experimento II. A atividade das enzimas peroxidase [F1+I], [F23+I], [A+A] e β, 1-3 glucanase [F1+I], [F10+I] e [F23+I] foram agrupadas às 48 horas (Figura 25B). O segundo componente principal explicou 15,57% da variância encontrada no experimento.

Neste experimento também foram observadas relações inversas entre compostos fenólicos e atividade enzimática (Figura 25B).

Nossos resultados demonstraram que fungicidas formulados a partir do óleo essencial E são capazes de induzir resistência em plantas, através do aumento da

atividade enzimática de peroxidases e β-1,3 glucanases, suprimindo a pinta preta de tomateiro. Aparentemente, as plantas de tomate respondem às formulações e alteram seu metabolismo, e alguns parâmetros tem relação direta com a defesa do hospedeiro e outros sugerem indicativo de defesa.

O experimento sem inoculação (experimento I) comprovou o potencial dos formulados em alterar o metabolismo da planta, promovendo a indução de resistência. Quando as plantas foram inoculadas (experimento II), os formulados continuaram promovendo resultados satisfatórios, quando ativaram a ação das enzimas em níveis superiores ao tratamento controle [A+I].

De forma ampla, a enzima peroxidase foi ativada quando as plantas receberam os formulados a partir de óleos essenciais. Contudo, não sabemos qual a contribuição de cada isoenzima do tipo peroxidase na defesa da planta neste patossistema, pois as plantas produzem diversos tipos de peroxidases, que por sua vez estão envolvidas em vários processos metabólicos.

Produtos naturais podem promover estas alterações bioquímicas em plantas, como por exemplo a atividade da enzima peroxidase, pelo uso do extrato de *Salvia rosmarinus* em plântulas de soja para o controle de *Macrophomina phaseolina* (LORENZETTI et al., 2018). Freddo et al. 2016) observaram que o uso de óleo essencial de *Aloysia citriodora* para o tratamento de sementes de pepino elevou a atividade da enzima peroxidase linearmente, conforme se aumentava a dose do óleo essencial. Já Hendges (2019) verificou incremento da atividade da enzima peroxidase em plantas de tomate com o uso dos óleos essenciais de *Citrus aurantium*, *Cymbopogon nardus* e *Melaleuca alternifolia* com o intuito de indução a resistência contra a pinta preta de tomateiro.

A indução de resistência também já foi relatada para o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* no patossistema tomate x mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* (LUCAS et al., 2012). Os autores verificaram resultados satisfatórios na resposta induzida da planta, ocorrendo aumento das enzimas β-1,3-glucanase, quitinase e peroxidase nas primeiras horas após a pulverização, que se manteve elevada até 12 dias após a aplicação (LUCAS et al., 2012). A enzima peroxidase é uma das mais estudadas e ativadas quando se trata de defesa induzida contra a pinta preta de tomateiro. Alencar et al. (2020), por exemplo, verificaram aumento de 74% desta enzima às 120 hai em plantas de tomateiro que receberam tratamento com filtrado de *Stachylidium bicolor* e após inoculação de *Alternaria* sp.

Com o recente avanço da pesquisa no campo da nanotecnologia, muitos estudos também relatam o papel das nanopartículas como eliciadoras da resistência sistêmica induzida (QUITERIO-GUTIÉRREZ et al., 2019). Neste sentido, emulsões oleosas com *Cymbopogon martinii* e *Melaleuca alternifolia* promoveram o aumento da atividade de enzimas oxidativas e proteínas envolvidas na defesa vegetal (LUIZ et al., 2017).

Frutas cítricas revestidas com filmes contendo nanoemulsão de compostos como cinamaldeído, eugenol e carvacrol também apresentaram maior atividade de enzimas detoxificantes como a peroxidase, catalase e superóxido dismutase, com 51,49%, 22,29% e 18,12% maior atividade quando comparado ao tratamento controle (YANG et al., 2021). Estes resultados demonstram a rápida atividade antioxidante promovida pelos revestimentos com óleo essencial para eliminar os radicais livres acumulados; como já é sabido pela literatura (SINGH et al., 2013).

A peroxidase está associada ao mecanismo de defesa da planta, pois a mesma tem como uma de suas principais funções a lignificação no tecido da planta, oxidação do peróxido de H_2O_2 em água e a polimerização de álcool hidroxicinamico (STANGARLIN et al., 2011). Nos tratamentos [A+I] também ocorreu aumento da atividade da enzima peroxidase, demonstrando que na presença de um agente estressor (inóculo) as plantas ativam rapidamente seu metabolismo secundário para lutar contra eles.

Nossos formulados promovem esta ativação de enzimas defensivas mesmo sem a presença do patógeno, mantendo a planta em “estado de alerta”. Nestes casos é importante considerar que se não houver processo infeccioso a planta poderá prover de um gasto energético desnecessário. Da mesma forma, atuação positiva de enzimas no início do processo infeccioso é o desejado para que estas consigam impedir o desenvolvimento da doença, pois a atividade enzimática desencadeada após colonização avançada dos tecidos dificulta a defesa da planta.

Alguns autores citam que nanomateriais promovem a regulação positiva de enzimas de defesa contra doenças rapidamente, como a ocorrência do fenômeno de “*primming*” (QUITERIO-GUTIÉRREZ et al., 2019; NANDINI et al., 2020). Diante disso, a bioestimulação de respostas inatas de defesa antes do desafio patogênico se destaca como uma abordagem ecológia e econômica, com isumos minimizados por utilizar nanotecnologia na proteção de plantas.

De maneira geral, a atividade da enzima β-1,3 glucanase foi desencadeada rapidamente após receber a pulverização dos formulados, apresentando o primeiro pico

de atividade às 72 horas após a aplicação (época 0 h). Analisando conjuntamente os dados através da PCA, verificamos maior atividade bioquímica às 48 horas, ocorrendo cinco dias após aplicação dos formulados.

As enzimas β-1,3-glucanase e quitinase apresentam maior atividade em genótipos de tomate resistentes contra *A. alternata* (MOGHADDAM et al., 2019). Os achados do nosso trabalho sugerem que a aplicação das formulações desenvolvidas com óleos essenciais induzem o aumento da atividade de enzimas como a peroxidase e β-1,3-glucanase como enzimas-chave para resistência de plantas de tomate à pinta preta.

A enzima β-1,3-glucanase possui ação direta sobre componentes estruturais de alguns fungos em que as paredes celulares são constituídas por β-glucanas (STANGARLIN et al., 2011). Como a principal função dessa estrutura é auxiliar na manutenção da rigidez e integridade das paredes celulares do fungo, plantas que expressam essa enzima conseguem se defender e reduzir o processo infectivo. Dessa forma, a rápida atividade desta enzima a partir das pulverizações, comprova sua ação na supressão da doença.

A análise da atividade enzimática das proteínas PR2 e PR3 (β-1,3-glucanase e quitinase) nos genótipos testados sugeriu possível contribuição da proteção vegetal e resposta de defesa de ambas as enzimas na resistência à pinta preta do tomate. A maior atividade enzimática das proteínas PR2 e PR3 observada em genótipos resistentes inoculados pode sugerir seu papel principal na infecção fúngica (MOGHADDAM et al., 2019). Muitos estudos mostraram que o acúmulo de quitinase e glucanase como produtos hidrolíticos de genes constitutivos e induzidos afeta a viabilidade fúngica e promove respostas de imunidade das plantas (EL-HADARY; TAYEL, 2013; KUMAR et al., 2018; PUSZTAHELYI, 2018).

Com a entrada do patógeno na planta hospedeira, rápidas mudanças celulares ocorrem como a primeira linha de defesa contra o patógeno, através da formação de lignina e depósitos calosos (BACETE et al., 2017). Além disso, o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) desempenha um papel crucial na interação patógeno-hospedeiro que está comprovadamente envolvida na indução da expressão gênica. A nível bioquímico, a lipoxigenase (LOX), fenil alanina liase (PAL), β-1,3-glucanase (GLU) e superóxido dismutase (SOD) neutralizam o processo de infecção pela formação de fitoalexinas, hidrólise de β-glucanas na parede celular fúngica (BELKHADIR; SUBRAMANIAM; DANGL, 2004). Essas mudanças são reflexos da regulação que ocorre durante o processo de transcrição.

Os compostos fenólicos também foram relatados como eliminadores de ROS de baixo peso molecular. Além disso, a indução de compostos fenólicos pode ser de crucial importância para a restrição da expansão do fungo patogênico constituindo outro mecanismo de defesa (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Estes compostos podem induzir a síntese de proteínas relacionadas à patogênese do hospedeiro (PR) (quitinase, 1,3-glucanase ou taumatina) (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

O trabalho de AWAN, SHOAIB; KHAN (2018) mostra que plantas de tomate resistentes à pinta preta de tomateiro aumentam seus compostos fenólicos totais aos 15 dias após inoculação, o que está positivamente correlacionado com a atividade de enzimas antioxidantes. No entanto, plantas suscetíveis à doença não foram resilientes o suficiente para minimizar a produção de ROS, produzindo menor quantidade de enzimas antioxidantes e compostos fenólicos, sem que haja correlação positiva entre elas (AWAN; SHOAIB; KHAN, 2018). Nossos formulados reduziram o acúmulo de compostos fenólicos livres quando comparados com plantas controle e testemunha. Neste sentido, é importante entender qual a rota metabólica para resistência/suscetibilidade de cada cultura e híbrido, doença e cada indutor, e da mesma forma, entender que isso pode ser variável no tempo e no ambiente.

Aparentemente, o acúmulo de compostos fenólicos livres foi relacionado de forma negativa com a atividade enzimática em nossos estudos. Esta relação negativa poderia ser justificada para a enzima peroxidase *versus* compostos fenólicos livres, visto que ambos participam da rota metabólica do ácido shiquímico, e por algum motivo ter ocorrido desvio da rota. Outra hipótese aceita é a oxidação do ácido clorogênico por enzimas do tipo polifenoloxidase, por exemplo, usando O_2 como aceptor de elétrons, dando origem a quinonas altamente tóxicas aos microrganismos. De forma geral, compostos fenólicos livres como o ácido clorogênico estão envolvidos na defesa das células vegetais, produzindo substâncias com efeito biocida, e também eliminadoras de peróxido de hidrogênio (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Conjuntamente, a análise de compostos fenólicos ligados poderia nos mostrar se o fenol produzido estaria fortemente ligado à parede celular, e não dentro de vacúolos, como forma “livre” no tecido foliar. Caso tenha ocorrido acúmulo de compostos fenólicos na parede celular, reforçaria a lignificação como forma de defesa da planta.

Existem diversos tipos de fenois que atuam nos processos de defesa de plantas, e para esta análise utilizamos o ácido clorogênico como padrão para comparação. Dessa forma, também acreditamos que poderia haver outros fenois envolvidos, e apenas a

abordagem do ácido clorogênico não tenha sido suficiente para explicar seu envolvimento com enzimas. Além disso, discussões sobre compostos fenólicos envolvem questões sobre o local de formação destes e o tempo de resposta do hospedeiro e eventual síntese de compostos, considerando o estágio de desenvolvimento do patógeno dentro do hospedeiro e a extensão do progresso da doença (LO; NICHOLSON; TREMACOLDI, 2008). Será que estes compostos são sintetizados suficientemente rápido e em quantidades suficientes para limitar o crescimento e o desenvolvimento do patógeno?

De antemão, conseguimos verificar que não é através do "*pool*" de fenóis livres que os formulados induzem resistência em plantas de tomate à pinta preta. A redução de compostos fenólicos em alguns períodos promovida por nossos formulados necessita de maiores estudos, uma vez que estudamos apenas enzimas-chave de defesa de plantas não conseguimos afirmar com exatidão o ocorrido. Sugere-se estudos metabolômicos e de expressão gênica para provar a regulação positiva dos formulados no metabolismo vegetal.

Com os resultados obtidos, podemos supor que os formulados possam ter proporcionado um estado de *primming* na planta, que é um dos fenômenos mais desejados na indução de resistência. Somente quando a planta se encontra potencialmente em perigo estes mecanismos são ativados e se dá o aumento de tais enzimas. Cenário positivo pode ser observado, uma vez que a planta não gaste sua energia em defesa na presença apenas na presença do indutor, e consiga destiná-la para o crescimento e desenvolvimento.

4.8 Potencial dos formulados na redução do desenvolvimento da pinta preta de tomateiro

De acordo com a análise de variância realizada, os tratamentos diferiram entre si para as características avaliadas. As formulações 1, 9 e 10 reduziram significativamente a severidade da pinta preta de tomateiro, quando comparado com o controle [A+I]. A formulação 23 condicionou 6,3% de severidade da doença, e embora tenha reduzido a porcentagem da doença apresentou semelhança estatística com ao controle [A+I].

Valor próximo a 90% de eficiência de controle (EC) foi promovido pela formulação 1, devido a menor severidade da pinta preta, com 2% aproximadamente. Valores acima de 80% de EC foram verificados nas formulações 9 e 10. A formulação

23 promoveu 66% de EC em relação aos valores de severidade do controle [A+I] (Tabela 12). Estes resultados concordam com (PANDEY et al., 2020), que alcançaram controle acima de 80% de controle da pinta preta de tomateiro.

Para a evolução da doença ao longo do tempo, descrita pela variável AACP da severidade, a formulação 9 proporcionou maior redução da doença, diferindo significativamente do controle [A+I]. Os demais tratamentos reduziram o desenvolvimento da severidade da doença no tomateiro, porém mantiveram valores semelhantes ao controle [A+I] (Tabela 12).

Os formulados 10 e 23 reduziram significativamente o número de lesões provocadas pelo isolado III de *Alternaria* spp., diferindo do controle [A+I]. Ambos produtos são compostos por fungicidas multssítios e sítio-específico, portanto, acredita-se que estes podem ter protegido a folha da penetração do fungo, reduzindo número de lesões. Os formulados 1 e 9 reduziram o número de lesões, contudo permaneceram estatisticamente semelhantes ao controle [A+I] (Tabela 12).

A evolução do número de lesões durante os dias de avaliação, representada pela variável AACPL destacou a redução do número de lesões promovida pelo tratamento 9. Os demais tratamentos, embora tenham reduzido a AACPL, apresentaram valores semelhantes ao controle [A+I] (Tabela 12).

O formulado 9 se destacou por reduzir a severidade da doença ao longo do tempo, ou seja, conseguiu frear o processo infectivo principalmente nos primeiros dias. Este tratamento reduziu 7x no desenvolvimento da área lesionada (AACPS) e 3x o desenvolvimento do número de lesões da pinta preta (AACPL).

Tabela 9. Severidade (S), eficiência de controle (EC), área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), número de lesões (NL) e área abaixo da curva de progresso das lesões (AACPL) para plantas de tomate pulverizadas com os formulados (F) e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp.

Tratamentos	S (%)	EC (%)	AACPS	NL	AACPL
[F_1+I]	2,06 b	89,13 a	155,66 ab	7,4 ab	568,8 ab
[F_9+I]	3,11 b	83,57 ab	107,49 b	7,6 ab	412,8 b
[F_{10}+I]	2,56 b	86,45 ab	195,26 ab	6,2 b	703,2 ab
[F_{23}+I]	6,31 ab	66,72 b	385,99 ab	5,8 b	583,2 ab
Controle [A+I]	18,96 a	0,00 c	762,24 a	17,4 a	1317,6 a

*Letras minúsculas iguais entre tratamentos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os produtos formulados frearam visivelmente o progresso da pinta preta de tomateiro quando comparado com o controle [A+I]. Uma visão geral dos sintomas da pinta preta de tomateiro pode ser observada na Figura 26.

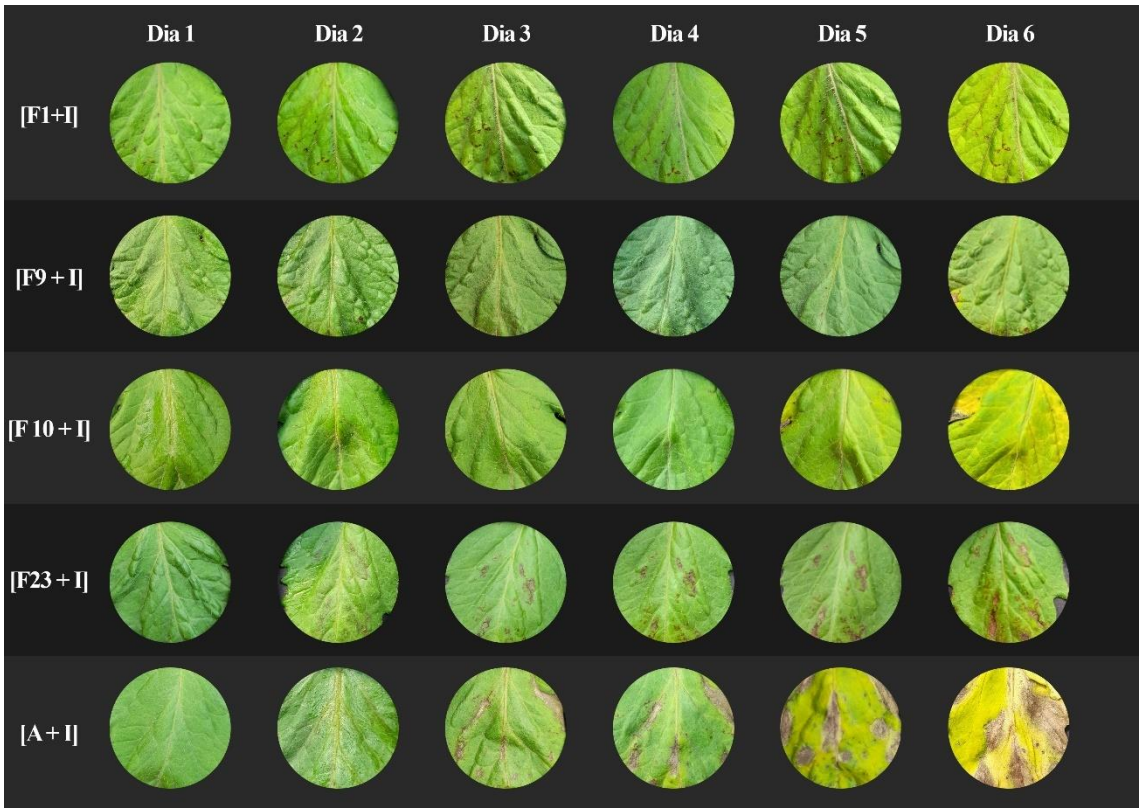

Figura 26. Acompanhamento da sintomatologia da pinta preta de tomateiro em plantas tratadas previamente com os formulados (F) ou água (A) e inoculadas (I) com o isolado III de *Alternaria* spp.

A infecção tem início com a penetração das hifas através dos estômatos ou diretamente por meio da cutícula após a formação de apressórios (Figura 27). A colonização ocorre intercelularmente, ou seja, entre as células, invadindo tecidos do hospedeiro, e provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas. Normalmente, em condições de campo os sintomas são visíveis de três a cinco dias após a infecção (PEREIRA et al., 2013), já nas condições experimentais controladas, verificou-se início dos sintomas aos dois dias após inoculação (Figuras 26 e 27).

Mishra et al. (2018) observaram que plantas infectadas reduziram os atributos fisiológicos durante a infecção foliar de *Alternaria* spp. Alterações fisiológicas em plantas de tomate controle, como amarelecimento foram perceptíveis quando inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp., e promovidas a partir da redução do teor de

clorofila, que impactam no processo fotossintético (Figuras 26 e 27). Aplicações de formulados a partir do óleo essencial de *Mentha piperita* foram capazes de manter plantas de tomate com os teores de clorofila “a” e “b” aumentados, quando comparado com o tratamento controle (PANDEY et al., 2020).

Figura 27. Acompanhamento da sintomatologia da pinta preta de tomateiro em plantas controle, as quais foram tratadas previamente às 72 horas com água e inoculadas com o isolado III de *Alternaria* spp.

Embora sem quantificar a produção de esporos por lesão, em condições favoráveis ao progresso da doença, vários ciclos secundários do patógeno podem ocorrer durante o ciclo da cultura, levando a epidemias mais severas. Com pequenas observações realizadas, verificamos variação ampla na produção de esporos por lesão e o produto aplicado às 72 horas antes da inoculação dificilmente influenciaria a esporulação do fungo que conseguiu penetrar. Contudo, as infecções secundárias podem acontecer através da disseminação de esporos, e dessa forma, as formulações 10 e 23 apresentaram redução do NL, que também pode ser explicado pelo caráter protetor dos fungicidas multissítios.

De acordo com Pereira et al. (2013), o controle químico da pinta-preta deve ser realizado por meio de aplicações preventivas de fungicidas protetores (mancozebe, metiram, propinebe e clorotalonil) ou cúpricos (oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso) no início do período vegetativo. Estes formam uma película protetora na superfície da planta e atuam sobre múltiplos sítios do metabolismo do fungo,

impedindo a infecção do patógeno, e consequentemente o surgimento de raças resistentes. Entretanto, devem ser aplicados frequentemente, pois a planta emite novas folhas que ficam desprotegidas, além de serem removidos pelas chuvas.

Em condições ambientais favoráveis, a taxa de progresso da pinta preta de tomateiro é maior do que em condições não propícias. Molhamento foliar é um fator determinante na infecção de fungos. Em condições de campo, precipitações elevadas condicionam umidade relativa, além de lavar a camada de fungicidas protetores presentes na superfície, e dessa forma, fungicidas sistêmicos forneceriam uma maior proteção. Dessa forma, condições ambientais com pouca precipitação favorecem o controle da pinta preta com produtos protetores (BATISTA, 2006).

De acordo com (RAY et al., 2015), produtos indutores de resistência em tomate contra *Alternaria* spp. produzem uma cascata de sinalização de defesa na planta, que envolve a geração de ânion superóxido, acúmulo de peróxido de hidrogênio, seguido de reforço da parede celular por meio de deposição de compostos fenólicos e reticulação de proteínas. Enzimas de eliminação e antioxidantes, incluindo polifenol oxidase e peroxidases também são produzidas durante a defesa do tomateiro contra infecção por *Alternaria* spp. Estes compostos, além de sinalizar outros processos fisiológicos, também são tóxicos ao fungo, destruindo-o. Neste mesmo sentido, é importante considerar que estes compostos estejam presentes na planta logo nos primeiros momentos do processo infectivo, a fim de frear o desenvolvimento da lesão.

Nos últimos tempos vem sendo descobertos novos compostos de diferentes plantas capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos (DA SILVA et al., 2009). Além disso, as estratégias de manejo somente químicas foram desencorajadas devido às crescentes preocupações com a toxicidade humana, resistência antifúngica e problemas ambientais (RIBES et al., 2017). Portanto, muita atenção está sendo dada aos fungicidas naturais, seguros e biodegradáveis (TAO; JIA; ZHOU, 2014) como novas ferramentas para auxiliar o controle de doenças.

Os nanoformulados desenvolvidos neste trabalho apresentam-se como promissores no mercado de biodefensivos, por atuar eficientemente no controle da pinta preta de tomateiro, através de seu controle direto e também pela indução de resistência em plantas. As formulações contendo apenas i.a com óleos essenciais e adjuvantes podem alavancar o uso de óleos essenciais para uso na agricultura orgânica, trazendo novas opões para uso sustentável e com menor resíduos químicos.

As nanoformulações contendo misturas com fungicidas e com multisítios podem contribuir substancialmente para o manejo de resistência de fungos, pois conta com amplo espectro de ação, além de impulsionar o uso de óleos essenciais para a formulação de produtos menos tóxicos ao meio ambiente e ser humano, por permitir menor dose de fungicidas convencionais na formulação.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais A, B, C e E apresentam controle do crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. em baixas doses. Os óleos essenciais possuem satisfatório controle da pinta preta de tomateiro em condições de casa-de-vegetação na dose de 2,5 µL mL^{-1}.

As nanoformulações a partir do óleo essencial E controlam eficientemente o isolado III de *Alternaria* spp. em condições *in vitro,* e a doença na planta. As formulações 1, 5, 9, 10 e 18 apresentam tamanho médio inferior a 300 nm, sem que ocorram grandes alterações na sua composição físico-química até 150 dias de armazenamento, demonstrando estabilidade de prateleira. A formulação 9 se destaca devido às suas características de tamanho, polidispersão, potencial zeta e concentração de partículas. As formulações 1, 9, 10 e 23 induzem resistência em plantas de tomateiro, auxiliando na ativação inerente da planta contra a pinta preta de tomateiro.

As formulações desenvolvidas a partir dos óleos essenciais recebem destaque, pois os óleos são considerados como fonte de origem natural para o desenvolvimento de biofungicidas, atuando tanto na defesa direta do hospedeiro quanto na indução de resistência. Diante do exposto, todas as hipóteses foram aceitas e acredita-se fielmente na prospecção destas tecnologias, colaborando para a sustentabilidade do sistema de produção.

REFERÊNCIAS

ABD EL-GAWAD, A. M. Chemical constituents, antioxidant and potential allelopathic effect of the essential oil from the aerial parts of *Cullen plicata*. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 36-41, 2016.

ABU KHALAF, R. Exploring Natural Products as a Source for Antidiabetic Lead Compounds and Possible Lead Optimization. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, P. 2549-2561, 2016.

ADISA, I. O. *et al.* Recent advances in nano-enabled fertilizers and pesticides: a critical review of mechanisms of action. **Environmental Science Nano**, v. 6, n. 7, p. 2002-2030, 2019.

ALENCAR, M. S. R. *et al.* Induction of defense mechanisms in tomato plants by saprobic fungi filtrates against early blight disease. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 671-678, 2020.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e hidroponia.** 2ª ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2013. 457 p.

ALVES, F. M. DE F. *et al.* Control of *Alternaria alternata* using melaleuca essential oil (*Melaleuca alternifolia*). **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 40, n. 3, p. 1-10, 2019.

AWAN, Z. A.; SHOAIB, A.; KHAN, K. A. Variations in total phenolics and antioxidant enzymes cause phenotypic variability and differential resistant response in tomato genotypes against early blight disease. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 216-223, 2018.

BACETE, L. *et al.* Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. **The Plant Journal,** v. 93, n. 4, p. 614-636, 2018.

BAPTISTA, E. B. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 746–752, 2015.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASHIR, Z. *et al.* Tomato plant proteins actively responding to fungal applications and their role in cell physiology. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 257, 2016.

BATISTA, D. D. C. **Dinâmica de inóculo de *Alternaria solani*, efeito da densidade de plantio na intensidade da pinta preta e requeima e previsão dessas doenças em tomateiro e batateira**. 2006. 120p. Tese (Doutorado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 391-399, 2004.

BLACK SOLIS, J. *et al.* Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*. **Revista Mexicana de Fitopatología,** v. 35, n. 2, p. 204-226, 2017.

BOMBO, A. B. *et al.* A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 16, p. 4453-4462, 2019.

BONIFÁCIO, B. V. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines : a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BRAVO CADENA, M. *et al.* Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 755-764, 2018.

BURGESS, D. R.; LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. NIST Chemistry WebBook. **NIST Standard Reference Database,** n. 69, p. 20899, 2016.

CAMÓ, C. *et al.* Antimicrobial peptide KSL-W and analogues: Promising agents to control plant diseases. **Peptides**, v. 112, p. 85-95, 2019.

CARMONA, M. A.; SAUTUA, F. J.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, O. Copper phosphite enhances efficacy of a strobilurin-triazole fungicide in controlling late season foliar diseases of soybean. **Crop Protection**, v. 115, p. 130-134, 2019.

CASTRO, J. C. *et al*. Bioactivity of essential oils in the control of Alternaria alternata in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101-109, 2017.

CIURA, J.; KRUK, J. Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 32-40, 2018.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2011.

COYAGO-CRUZ, E. *et al.* Study of commercial quality parameters, sugars, phenolics, carotenoids and plastids in different tomato varieties. **Food Chemistry**, v. 277, p. 480-489, 2019.

CRUZ, E. M. O. *et al. Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopis paradoxa*. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p. 245-251, 2018.

DA SILVA, A. C. *et al. In vitro* effect of plant compounds on the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolated from passion fruit. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33 (especial), p. 1853-1860, 2009.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics,** v. 10, n. 57, 2018.

DE OLIVEIRA, J. L. *et al.* Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, 2014.

DE QUEIROZ, V. T. *et al.* Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 219, p. 18–27, 2018.

DIAS, I. J. *et al.* Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 368-374, 2017.

EL-HADARY, M. H.; TAYEL, A. A. Differential expression of tomato chitinases upon Alternaria solani inoculation with special reference to a modified purification zymogram. **Egyptian Journal of Experimental Biology**, v. 9, p. 9-17, 2013.

EWRC - EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL. Report of the 3th and 4th meetings of EWRC - Committee of methods in weed research. Weed Res., Oxford, **Anais...** v.4, p.88, 1964.

FDA. Food and Drug Administration. **GRAS Notice inventory.** Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>. Acesso em: 21/06/2021.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126-1130, 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª ed. Lavras: UFLA, 2008, 421 p.

FONTANA, D. C. *et al.* Fungicidal potential of essential oils in control of *Fusarium* spp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. 1-10, 2020.

FONTANA, D. C. *et al.* Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021.

FOODNEWS. **2020 an excellent year for Greek processed tomatoes.** Disponível em: <https://greekfoodnews.com/2020-an-excellent-year-for-greek-processed-tomatoes/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

FRACETO, L. F. *et al.* **Nanopesticides: From Research and Development to Mechanisms of Action and Sustainable Use in Agriculture**. 1ª ed. Springer Nature. 2020. 360 p.

FRANCIO, I. E. **Atividade antioxidante e antifúngica de óleos essenciais frente *Alternaria alternata***. 2020. 70 p. Tese (Doutorado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2020.

FREDDO, A. R. *et al.* Potencial do óleo essencial de erva-luísa (*Aloysia citriodora* Palau) no controle de *Fusarium* sp. *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 558–562, 2016.

FREITAS FILHO, A. M. *et al*. Controle da pinta preta (*Alternaria solani*) por meio de fungicidas na cultura do tomate. **Horticultura Brasileira,** v. 26, n. 2, p. 2922–2926, 2008.

GADHI, M. A. *et al*. *In vitro* efficacy of bio-control agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. **Acta Ecologica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 166-171, 2020.

GAUR, R. B.; SHARMA, R. N. Biocontrol of root rot in cotton and compatibility of potential bioagents with fungicides. **Indian Journal of plant protection**, v. 38, n. 2, p. 176-182, 2010.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 78, 2002.

GONÇALVES, D. C. *et al.* Reduction of Fusarium wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Crop Protection**, v. 141, p. 105487, 2021.

GUNDEWADI, G. *et al.* Preparation of basil oil nanoemulsion using Sapindus mukorossi pericarp extract: Physico-chemical properties and antifungal activity against food spoilage pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 95-104, 2018.

HENDGES, C. **Atividade antifúngica, controle da pinta preta e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro por óleos essenciais**. 2019. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2019.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>. Acesso em: 10 jan. 2021.

JING, C. *et al.* Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104, p. 41-46, 1 fev. 2018.

JOSHI, S. M.; DE BRITTO, S.; JOGAIAH, S. Myco-engineered selenium nanoparticles elicit resistance against tomato late blight disease by regulating differential expression of cellular, biochemical and defense responsive genes. **Journal of Biotechnology**, v. 325, p. 196-206, 2021.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: current trends and future priorities**. Environment International,** v. 63, p. 224-235, 2014.

KAISER, H. F. An index of factorial simplicity. **Psychometrika**, v; 39, n. 1, p. 31-36, 1974.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331-352, 2016.

KUMAR, A. *et al.* Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2008.

KUMAR, M. *et al.* Chitinases-Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 88, 2018.

LI, C. *et al.* Formation and properties of paraffin wax submicron emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 356, p. 71-77, 2010.

LI, Z. H. *et al.* Kinetic study of d-limonene release from finger citron essential oil loaded nanoemulsions during simulated digestion in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 67-73, 2019.

LIEW, S. N. *et al.* Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. **LWT**, v. 128, p. 109388, 2020.

LILJEROTH, E. *et al.* Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. **Crop Protection**, v. 86, p. 42-55, 2016.

LO, S. C. C.; NICHOLSON, R. L.; TREMACOLDI, C. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: PASCHOLATI, SF; LEITE, B.; STANGARLIN, JR; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: Fealq, 2008. p. 285-303.

LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortalizças, Circular técnica**, v. 100, n. 1, p. 26, 2011.

LORENZETTI, E. *et al.* Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LOZADA, B. S. *et al.* Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de lippia sobre *Moniliopthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronomica**, v. 61, n. 2, p. 102-110, 2012.

LUCAS, G. C. et al. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of plant pathology**, v. 94, n. 1, p. 45–51, 2012.

LUIZ, C. **Nanoemulsões de Óleos essenciais.** 2017. 97 p. Tese (Doutorado em Recursos genéticos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LUIZ, C. *et al.* Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragaria*e. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 370-381, 2017.

MAPA. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.

MCKNIGHT, T. E. *et al.* Intracellular integration of synthetic nanostructures with viable cells for controlled biochemical manipulation. **Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 551-556, 2003.

MELO, N. C. *et al.* Cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) hidropônico sob diferentes níveis de fósforo e potássio em solução nutritiva. **Revista Agroecossistemas**, v. 6, n. 1, p. 10, 2014.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, 2017.

MIGLIORI, C. A. *et al.* Effects of preharvest applications of natural antimicrobial products on tomato fruit decay and quality during long-term storage. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 193-202, 2017.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, A. *et al*. Endophyte-Mediated Modulation of Defense-Related Genes and Systemic Resistance in *Withania somnifera* (L.) Dunal under *Alternaria alternata* Stress. v. 84, n. 8, p. 1-13, 2018.

MOGHADDAM, G. A. *et al.* Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata.* **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 142, p. 500-509, 2019.

MOSSA, A. T. H. *et al.* Development of eco-friendly nanoemulsions of some natural oils and evaluating of its efficiency against postharvest fruit rot fungi of cucumber. **Industrial Crops and Products**, v. 159, p. 113049, 2021.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 289-292, 2002.

MURPHY, M. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum Cell Metabolism. **Cell Press**, v. 18, 2013.

NANDINI, B. *et al.* Elicitation of Novel Trichogenic-Lipid Nanoemulsion Signaling Resistance Against Pearl Millet Downy Mildew Disease. **Biomolecules,** v. 10, n. 1, p. 25, 2020.

NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108–113, 2007.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, L. J. E. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 1-6, 2009.

OLIVOTO, T. *et al.* Multivariate analysis of strawberry experiments: where are we now and where can we go? **Preprint submitted to Elsevier,** 2021.

OLIVOTO, T.; LÚCIO, A. D. C. metan: An R package for multi-environment trial analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 783-789, 2020.

OLIVOTO, T.; NARDINO, M. MGIDI: towards an effective multivariate selection in biological experiments. **Preprint submitted to bioRxiv**, 2020.

OOTANI, M. A. *et al.* Toxicity of essential oils of eucalyptus and citronella on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, p. 609-618, 2011.

OSMAN MOHAMED ALI, E. *et al.* Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solan*i and *Sclerotium rolfsii*. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 379-387, 2017.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954-970, 2013.

PANDEY, S. *et al.* Early blight disease management by herbal nanoemulsion in *Solanum lycopersicum* with bio-protective manner. **Industrial Crops and Products**, v. 150, p. 112421, 2020.

PASCHOLATI, S.; DALIO, R. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, R. J. **Manual de Fitopatologia Volume I: Princípios e Conceitos**. 5. ed. [s.l.] Agronômica Ceres, São Paulo, 2018. p. 424-450.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, 2014.

PEREIRA, R. B. *et al.* Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, n. 10, p. 1287-1296, 2008.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto.** Comunicado Técnico 95 – Embrapa Hortaliças, Brasília, p. 1-5, 2013.

PEY, C. M. *et al.* Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144-150, 2006.

PHAN, H. T.; HAES, A. J. What Does Nanoparticle Stability Mean? **Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 27, p. 16495-16507, 2019.

PIETROBELLI, S. R. Eficiência De Preparados Vegetais No Controle De Doenças Fúngicas E Na Indução De Mecanismos De Defesa Em Tomateiro. 2019. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) Universidade Federal Fronteira Sul, campus Laranjeira do Sul, 2019.

PUSZTAHELYI, T. Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions. **Mycology An International Journal on Fungal Biology**, v. 9, n. 3, p. 189-201, 2018.

QUITERIO-GUTIÉRREZ, T. *et al.* The Application of Selenium and Copper Nanoparticles Modifies the Biochemical Responses of Tomato Plants under Stress by *Alternaria solani*. **International Journal of Molecular Sciences Article**, v. 20, n. 8, p. 1950, 2019.

RAVAL, N. *et al.* **Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development.** In: Basic Fundamentals of Drug Delivery. Elsevier: Academic Press, 2018. p. 369-400.

RAY, S. *et al.* Differential responses of resistant and susceptible tomato varieties to inoculation with *Alternaria solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 90, p. 78-88, 2015.

RGUEZ, S. *et al. Tetraclinis articulata* essential oil reduces *Botrytis cinerea* infections on tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 266, p. 109291, 2020.

RIBES, S. *et al.* Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, v. 73, p. 784-795, 2017.

ROBLEDO, N. et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, p. 211-219, 2018.

RODRIGUES, L. E. **Tomaticultura: valioso segmento do agronegócio nacional.** Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas – ABCSM, 2012. Disponível em: <http://abcsem.com.br/releases/2420/tomaticultura-valioso-segmento-doagronegocio-nacional>. Acesso em: 1 out. 2014.

RODRIGUES, T. T. M. *et al.* In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 203-212, 2010.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity.** St. Paul: American Phytopathological Society. 1994. 326 p.

ROZWALKA, L. C. *et al.* Chemical components of essential oils as a base to control two grape pathogens: *Sphaceloma ampelinum* and *Pseudocercopora vitis*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 6, p. 342–352, 2020.

SCHUCK, V. J. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SHARMA, A. *et al.* Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 308-313, 2017.

SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Volume 1. Princípios e conceitos.** Editora Ceres LTDA: Piracicaba, 2018.

SINGH, P. *et al.* Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part-74. **Food Bioscience**, v. 3, p. 42-48, 2013.

SOARES, C. S. A. *et al.* Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides* l.) sobre o pulgão *Macrosiphum euphorbiae* (thomas, 1878), (hemiptera: aphididae) em roseira. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável,** v. 6, n. 5, p. 21-24, 2011.

STANGARLIN, J. R. *et al.* Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex**, v. 2, p. 1033-1042, 2011.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β-1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265-271, 2014.

TIAN, J. *et al.* In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1992-1999, 2011.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporeaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, n. 2, p. 999-1010, 2016.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from Eucalyptus staigeriana, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 72-77, 2017.

TOMAZONI, E. Z.; PAULETTI, G. F. Atividade antifúngica in vitro dos óleos sobre o fungo patógeno de tomateiro in vitro antifungal activity of *Pinus elliottii* and *Pinus taeda* essential oils against *Alternaria solani* tomato. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2014.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. **QUANT - A software for disease plant severity assessment.** Christchurch, New Zealand: 8th International congress of Plant Pathology, 2003.

WAN, J. *et al.* Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, p. 199-206, 2019.

WANG, D. *et al.* Laboratory assessment of the mobility of water-dispersed engineered nanoparticles in a red soil (Ultisol). **Journal of Hydrology**, v. 519, p. 1677-1687, 2014.

WOUDENBERG, J. H. C. *et al.* Large-spored Alternaria pathogens in section Porri disentangled. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 1-47, 1 set. 2014.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, R. *et al.* Antifungal effect of cinnamaldehyde, eugenol and carvacrol nanoemulsion against *Penicillium digitatum* and application in postharvest preservation of citrus fruit. **LWT**, v. 141, p. 110924, 2021.

ZAIDI, S. S. E. A.; MUKHTAR, M. S.; MANSOOR, S. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 898-906, 2018.