



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOTECNIA
DOUTORADO EM FITOTECNIA

FABIANA RODRIGUES DA SILVA

**ANÁLISE PÓS-GENÔMICA, DESENVOLVIMENTO DE NANOFUNGICIDAS E
AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOPARTÍCULAS
FUNCIONALIZADAS VISANDO O CONTROLE DE *Monosporascus cannonballus* e
Macrophomina phaseolina EM MELOEIRO**

MOSSORÓ

2022

FABIANA RODRIGUES DA SILVA

**ANÁLISE PÓS-GENÔMICA, DESENVOLVIMENTO DE NANOFUNGICIDAS E
AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOPARTÍCULAS
FUNCIONALIZADAS VISANDO O CONTROLE DE *Monosporascus cannonballus* e
Macrophomina phaseolina EM MELOEIRO**

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

Orientador: Rui Sales Júnior, Prof. Dr.

Coorientadores: Andréia Mitsa Paiva Negreiros, Fernando Antonio Souza de Aragão e Natália Florêncio Martins

MOSSORÓ

2022

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

S586a SILVA, FABIANA RODRIGUES DA.
ANÁLISE PÓS-GENÔMICA, DESENVOLVIMENTO DE
NANOFUNGICIDAS E AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS VISANDO O CONTROLE
DE... / FABIANA RODRIGUES DA SILVA. - 2022.
100 f. : il.

Orientador: RUI SALES JÚNIOR.
Coorientador: FERNANDO ANTONIO SOUZA DE ARAGÃO.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em --
Selecione um Curso ou Programa--, 2022.

1. Nanotecnologia na agricultura. 2. Meloeiro.
3. Modelagem D de proteínas. 4. *Monosporascus
cannonballus*. 5. *Macrophomina phaseolina*. I.
SALES JÚNIOR, RUI, orient. II. ARAGÃO, FERNANDO
ANTONIO SOUZA DE, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

FABIANA RODRIGUES DA SILVA

**ANÁLISE PÓS-GENÔMICA, DESENVOLVIMENTO DE NANOFUNGICIDAS E
AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOPARTÍCULAS
FUNCIONALIZADAS VISANDO O CONTROLE DE *Monosporascus cannonballus* e
Macrophomina phaseolina EM MELOEIRO**

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia
do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

Defendida em: 29 / 07 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

RUI SALES

JUNIOR:87634325449

Assinado de forma digital por RUI
SALES JUNIOR:87634325449
Dados: 2022.07.30 21:48:40 -03'00'

Rui Sales Júnior, Prof. Dr. (UFERSA)

Presidente



Cléberon de Freitas Fernandes, Prof. Dr. (EMBRAPA/UFC)

Membro Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
Marcelo Oliveira Rodrigues
Data: 02/08/2022 13:33:32-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Marcelo Oliveira Rodrigues, Prof. Dr. (UNB)

Membro Examinador Externo



Edy Sousa de Brito, Prof. Dr. (EMBRAPA/UFC)

Membro Examinador Externo

Andréia Mitsa
Paiva Negreiros

Assinado de forma digital por
Andréia Mitsa Paiva Negreiros
Dados: 2022.07.30 21:52:34 -03'00'

Andréia Mitsa Paiva Negreiros, Prof.^a Dra. (UFERSA)

Membro Examinador

*Dedico aos meus pais, Zuila e Costa Neto, que
me proporcionaram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, minha saúde e por me conceder tamanha resiliência para finalizar esse ciclo. A Nossa Senhora de Fátima e a São Francisco de Assis, meus amigos e intercessores no céu, que estavam comigo em todas as etapas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, à coordenação, professores e funcionários pelo apoio. E a CAPES pela concessão da bolsa no último ano.

Agradeço aos meus pais, Zuila e Costa Neto, que me ajudaram de todas as formas a trilhar esse caminho.

Agradeço ao meu esposo, Ticiano Tavi, e à minha filha, Ticiania Liz, pelo amor e apoio constante. Diariamente vocês foram o motivo do ânimo para jamais desistir desse projeto.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Sales Júnior, pelo amparo incondicional e pela compreensão durante toda essa jornada.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Fernando, que me recebeu de braços abertos na EMBRAPA para realização dos experimentos e mais agradecida ainda por ter sido o responsável por cruzar meu caminho com o da maravilhosa Dra. Natália Martins, que me coorientou incansavelmente, um dos seres humanos mais ímpares que já conheci no meio acadêmico, uma mulher cheia competência e empatia.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora por dedicarem seu valioso tempo para contribuir com esse trabalho.

Agradeço aos meus familiares, a todas as minhas amigas da vida, em especial meu melhor amigo e irmão Felipe Rodrigues, pelo apoio, torcida e por me encorajar na busca dos meus sonhos. Aos amigos que ajudaram de alguma forma durante os experimentos: Samara, Regimara, Cláudio, Wallyson, Elaine, Karla, Ítalo, Lorena, Marcos.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente para que esse dia chegasse, porque a verdade é que ninguém faz nada sozinho e não seria diferente comigo. A todos, minha eterna gratidão.

“Ó Senhor, eu cantarei eternamente o Vosso amor”. Salmo 88 (89)

RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) apresenta importância socioeconômica nacional, sendo produzidas mais de 600 mil toneladas em aproximadamente 24 mil hectares, gerando divisas anuais superiores aos US\$ 150 milhões, com destaque para a região Nordeste. O Rio Grande do Norte e o Ceará têm sido responsáveis por mais de 80% da produção e por quase a totalidade das exportações brasileiras de melões. Contudo, apesar de contribuir para o Agronegócio, essa produção cada vez mais intensa tem agravado os problemas fitossanitários da cultura no Semiárido. Nesse contexto, os fungos são os patógenos de maior ocorrência nessa cultura, apresentando ampla gama de plantas hospedeiras. Dentre os patógenos mais importantes estão *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*, agentes causais da “podridão de raízes e declínio de ramos” em meloeiro. Para ambos os patógenos, o manejo cultural prevalece, já que o uso de agrotóxicos, além de contribuir negativamente para os impactos ambientais, é pouco eficiente no controle desses patógenos. A utilização da biotecnologia para fins agrícolas se destaca como mais uma estratégia no controle de doenças de plantas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver ferramentas para controle do *M. cannonballus* e *M. phaseolina* em meloeiro a partir da biotecnologia com o uso da bioinformática e nanotecnologia. No primeiro ensaio, foi realizada análise genômica de ambos os fungos a fim de selecionar novas proteínas alvos como base para o desenvolvimento de fungicidas. A partir da experimentação *in silico*, foi possível selecionar 13 alvos candidatos para *M. cannonballus* e 10 proteínas como potenciais alvos para *M. phaseolina*. No segundo experimento, foram realizados bioensaios *in vitro* utilizando nanopartículas (NP) associadas a compostos comerciais, nanoformulações (NF), a fim de controlar os patógenos. Foi possível identificar que a NP tem potencial como facilitador da ação dos compostos, inclusive diminuindo a concentração deles em mais de 200 mil vezes, portanto no estudo *in vitro* trata-se NF com capacidade de agir como novos nanofungicidas. No último experimento, o objetivo foi avaliar a eficiência de três óleos essenciais (OE): capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) no controle *in vitro* dos fungos e avaliar associação dos OEs a NP. Os três OEs apresentaram efeito inibitório sobre ambos os fungos, e a associação dos OEs com a NP não inviabilizou a inibição do crescimento micelial, demonstrando que a NP funcionalizada pode ser desenvolvida com ferramenta de entrega de compostos fungicidas. Esse trabalho abre perspectivas para a geração de novas formas de controle desses patógenos.

Palavra-chave: Modelagem D de proteínas; Nanotecnologia na agricultura; Podridão de raízes e declínio de ramos; Melão.

ABSTRACT

The melon tree (*Cucumis melo* L.) is of national socioeconomic importance, with more than 600 thousand tons being produced in approximately 24 thousand hectares, generating annual foreign exchange in excess of US\$ 150 million, especially in the Northeast region. Rio Grande do Norte and Ceará have been responsible for more than 80% of production and for almost all Brazilian melon exports. However, despite contributing to Agribusiness, this increasingly intense production has aggravated the phytosanitary problems of the culture in the semiarid region. In this context, fungi are the most common pathogens in this crop, which has a wide range of host plants. Among the most important pathogens are *Monosporascus cannonballus* and *Macrophomina phaseolina*, causal agents of “root rot and vine decline” in melon. For both pathogens, cultural management prevails, since the use of pesticides, in addition to contributing negatively to environmental impacts, is inefficient in controlling these pathogens. The use of biotechnology for agricultural purposes is highlighted as another strategy in the control of plant diseases. Therefore, the objective of this work was to develop tools to control *M. cannonballus* and *M. phaseolina* in melon from biotechnology with the use of bioinformatics and nanotechnology. In the first assay, the genomic analysis of both fungi was performed in order to select new target proteins as a basis for the development of fungicides from *in silico* experimentation. It was possible to select 13 candidate targets for *M. cannonballus* and 10 proteins as potential targets for *M. phaseolin*. In the second experiment, *in vitro* bioassays were carried out using nanoparticles (NP) associated with commercial compounds, nanoformulations (NF), in order to control pathogens. It was possible to identify that NP has potential as a facilitator of the action of compounds, including reducing their concentration more than 200,000 times, so in the *in vitro* study it is NF with the ability to act as new nanofungicides. In the last experiment, the objective was to evaluate the efficiency of three essential oils (EO): lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), peppermint (*Mentha piperita*) and basil (*Ocimum basilicum*) in the *in vitro* control of fungi and to evaluate the association of OEs to NP. The three OEs showed an inhibitory effect on both fungi and the association of OEs with NP made unfeasible to the inhibition of mycelial growth, demonstrating that functionalized NP can be developed as a delivery tool for fungicidal compounds. This work opens perspectives for the generation of new ways of controlling these pathogens.

Keywords: Modeling D of proteins; Nanotechnology in agriculture; Root rot and vine decline; Melon.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Estrutura química da azoxistrobina [methyl (E)-2-{2-(6-(2cyanophenoxy) pyrimidin-4-yloxy) phenyl}-3-methoxyacrylate]22

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Esquema representativo da metodologia de análise genômica.....36
- Figura 2 – Anotação automática do genoma de *Monosporascus. cannonballus* em termos de superfamílias identificadas pelo BLASTp contra InterproSCAN 39
- Figura 3 – Esquema representativo dos resultados da seleção de potenciais alvos moleculares do genoma de *Macrophomina. phaseolina*..... 42

CAPÍTULO III

- Figura 1 – Imagem da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da nanopartícula na concentração de 20mg/L.....63
- Figura 2 – Gráfico do potencial Zeta da nanopartícula na concentração de 20 mg/L.....64
- Figura 3 – Tamanho estimado das nanopartículas em solução aquosa na concentração de 20 mg/L..... 64
- Figura 4 – Avaliação do Maxim a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Monosporascus cannonballus*.....66
- Figura 5 – Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Monosporascus cannonballus*. NP- nanopartícula. MX- Maxim.....68
- Figura 6 – Avaliação da dose resposta do fungicida Graduate partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Macrophomina phaseolina*. .GD- Graduate.....69
- Figura 7 – Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Macrophomona phaseolina*. NP- nanopartícula. GD- Graduate..70

CAPÍTULO IV

Figura 1	–	Cromatograma do óleo essencial de capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)...85
Figura 2	–	Cromatograma do óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>).....86
Figura 3	–	Cromatograma do óleo essencial de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>).....88

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO III

- Gráfico 1 – Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial-ICM (%) do *Monosporascus cannonballus* *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1 (T1): 1.620 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 2 (T2): 540 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 3 (T3): 180 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 4 (T4): 60 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 5 (T5): 20 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 6 (T6): 1.620 mg/L Nanopartícula; Tratamento 7(T7): 540 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8(T8): 180 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 60 mg/L Nanopartícula; Tratamento 10(T10): 20 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11(T11): 0,1 ppm Maxim; Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, testemunha, apenas o fungo.....68
- Gráfico 2 – Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial-ICM (%) do *Macrophomina phaseolina* *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1 (T1): 1.600 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 2 (T2): 1,200 mg/L Nanopartícula +1 ppm Graduate A+; Tratamento 3 (T3): 800 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 4 (T4): 400 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 5 (T5): 100 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 6 (T6): 1 ppm Graduate A+; Tratamento 7 (T7): 1.600 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8 (T8): 1.200 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 800 mg/L Nanopartícula; Tratamento 10 (10): 400 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11 (T11): 400 mg/L Nanopartícula e Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, Testemunha, apenas o fungo.....71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	– Anotação funcional das sequências de <i>Monosporascus cannonballus</i>	38
Tabela 2	– Elenco de proteínas candidatas a partir da busca por BLAST de 7630 sequências proteicas de <i>Monosporascus cannonbalus</i> contra o banco de dados de genes essenciais (ABADIO et al., 2011) Blast evaluate e-100, low complexity filtered.....	40
Tabela 3	– Potenciais proteínas alvo selecionados do genoma de <i>Macrophomina phaseolina</i>	43
Tabela 4	– Modelagem molecular de alguns dos alvos <i>Macrophomina phaseolina e Monosporascus cannonballus</i>	37
Tabela 5	– Fator de impacto de XYZ.....	46

CAPÍTULO III

Tabela 1	– Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Padronização da dose-resposta do Fludioxonil no controle de <i>Monosporascus cannonballus</i> . CV: Causa de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado Médio; F: Teste F de significância.....	65
Tabela 2	– Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Validação da ação do nano formulado na inibição do <i>Monosporascus cannonballus</i> . CV: Causa de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado Médio; F: Teste F de significância.....	65
Tabela 3	– Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Padronização da dose resposta do Azoxistrobina + Fludioxonil no controle de <i>Macrophomina phaseolina</i> . CV: Causa de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado Médio; F: Teste F de significância.....	65
Tabela 4	– Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial	

	(ICM) e repetição do experimento de Validação da ação do nano formulado na inibição do <i>Macrophomina phaseolina</i> . CV: Causa de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado Médio; F: Teste F de significância.....	58
Tabela 5	– Efeito da dose-resposta do Maxim® na Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do <i>Monosporascus cannonballus</i>	46
Tabela 6	– Efeito da dose resposta do fungicida Graduate na Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do <i>Macrophomina phaseolina</i>	62

CAPÍTULO IV

Tabela 1	– Composição do óleo essencial de capim limão com os respectivos parâmetros de identificação: tempo de retenção (Tr em min); índice de kovats (ki) experimental e referenciado na literatura; taxa de similaridade (%); m/z do principal fragmento e área relativa (%).....	84
Tabela 2	– Valores de potencial zeta e tamanho das nanopartículas funcionalizadas com óleo essencial. NOEH1 1mL/L OE hortelã pimenta + 400mg/L Nanopartícula; NOEM1: 1mL/L OE manjeriço + 400mg/L Nanopartícula; NOEC1: 1mL/L OE Capim-limão + 400mg/L Nanopartícula.....	88
Tabela 3	– Taxa de Inibição do Crescimento Micelial (ICM) de <i>Monosporascus cannonballus</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizando do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>), hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>), manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>) e nanopartícula funcionalizada com cada óleo. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	89

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1	Aspectos gerais da cultura do melão.....	18
1.2	Podridão de raízes e declínio de ramas (MRRVD) (<i>Monosporascus cannonballus</i>).....	18
1.3	Podridão do colo do meloeiro (<i>Macrophomina phaseolina</i>).....	20
2	AGROTÓXICOS.....	20
2.1	Azoxistrobina.....	21
2.2	Fludioxonil.....	23
3	NANOTECNOLOGIA.....	24
4	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
5	ANÁLISE GENÔMICA E PÓS-GENÔMICA.....	26
	REFERÊNCIAS.....	28

CAPÍTULO II

Análise pós-genômica dos fungos fitopatogênicos *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*

	RESUMO.....	33
	ABSTRACT.....	33
1	INTRODUÇÃO	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Configuração do conjunto de dados.....	35
2.2	Estratégia de Seleção de Alvos.....	36
2.3	Modelagem Molecular das proteínas alvo.....	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1	Seleção de alvos no genoma de <i>Monosporascus cannonballus</i>	37
3.2	Seleção de alvos no genoma de <i>Macrophomina phaseolina</i>	41
3.3	Modelagem Molecular das proteínas alvo.....	44
4	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	50

CAPÍTULO III

Nanotecnologia e desenvolvimento de novos fungicidas para controle de *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina* em

	meloeiro	
	RESUMO.....	55
	ABSTRACT.....	55
1	INTRODUÇÃO.....	56
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3	RESULTADOS.....	62
4	DISCUSSÃO.....	71
5	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

CAPÍTULO IV

	RESUMO.....	77
	ABSTRACT.....	77
1	INTRODUÇÃO	78
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1	Isolados fúngicos.....	80
2.2	Óleos Essenciais.....	80
2.3	Nanopartículas.....	81
2.4	Potencial Zeta e Tamanho Nanopartículas Funcionalizadas.....	81
2.5	Bioensaios <i>in vitro</i>.....	81
2.5.1	Ação do OE de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) no controle do <i>Monosporascus cannonballus</i>	82
2.5.2	Ação do OE de hortelã pimenta (<i>Mentha piperita</i>) no controle do <i>Monosporascus cannonballus</i>	82
2.5.3	Ação do OE de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>) no controle do <i>Monosporascus cannonballus</i>	82
2.5.4	Ação do OE de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) no controle do <i>Macrophomina phaseolina</i>	83
2.5.5	Ação do OE de hortelã pimenta (<i>Mentha piperita</i>) no controle do <i>Macrophomina phaseolina</i>	83
2.5.6	Ação do OE de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>) no controle do <i>Macrophomina phaseolina</i>	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
3.1	Cromatografia Gasosa dos Óleos Essenciais.....	83

3.2	Potencial Zeta e Tamanho Nanopartículas Funcionalizadas.....	87
3.3	Bioensaios <i>in vitro</i> - Ação dos óleos essenciais no controle do <i>Monosporascus cannonballus</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i>.....	88
	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXOS	94

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais da cultura do melão

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) representa o Brasil na posição de 13º produtor, com 2% da produção (SOUZA, 2022). As projeções de 2020 a 2030 indicam que o melão passará de 621 mil toneladas em 2020 para 818 mil toneladas em 2030, sendo esses os maiores incrementos de produção no período (BRASIL, 2020). Na produção nacional, a região Nordeste se destaca com percentual de 96,8% de melão, sendo os estados do Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE) responsáveis por 73,19% dessa produção (IBGE, 2020).

A aplicação de modernas tecnologias de cultivo aliadas às condições edafoclimáticas da região Nordeste resultam em alta produtividade e qualidade dos frutos, ao longo de todo o ano. O cultivo consecutivo permite colher até três safras por ano em uma mesma área, contribuindo para a alta produtividade da cultura (MOURA et al., 2011). Outra vantagem estratégica dessa região é que o pico da produção ocorre no período de entressafra dos principais países produtores dessa fruta, embora a maior produção ocorra de julho a janeiro, esse contexto possibilita ao Brasil importante janela internacional de exportação, o que impulsiona a produção nacional, fazendo com que o melão seja cada vez mais cultivado durante todos os meses do ano.

Por outro lado, esse plantio intenso e consecutivo favorece o aparecimento de problemas fitossanitários. Essas condições têm sido cada vez mais prevalentes, após anos consecutivos de seca no Nordeste, o que afeta a produção e a qualidade dos frutos e também favorece a incidência de pragas e doenças (FIGUERÊDO et al., 2017; BRUTON et al., 1998; SALES JÚNIOR et al., 2018). Vale ressaltar que os problemas fitossanitários, além de limitar o potencial produtivo e a qualidade dos frutos, propiciam maior uso de defensivos agrícolas e aumento dos custos de produção, o que confere riscos econômicos à cultura, principalmente para os pequenos agricultores (FIGUERÊDO et al., 2017; BRUTON et al., 1998; SALES JÚNIOR et al., 2018).

1.2 Podridão de raízes e declínio de ramos (MRRVD) (*Monosporascus cannonballus*)

Podridão de raízes e declínio de ramos (MRRVD) do meloeiro, doença no sistema radicular da cultura, tem como o agente causal o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker 1974, que foi descrito a partir de um espécime obtido de raízes necróticas de melão

no Arizona (EUA) (POLLACK; UECKER,1974). Esse é um dos principais agentes fitopatógenos associados à podridão de raízes por *Monosporascus* e declínio de ramas (PRMDR) em meloeiro, sendo relatado, até o presente momento, em 22 países, causando grandes perdas e reduzindo a produção do meloeiro (SALES JÚNIOR et al., 2004; YAN et al., 2016; MARKAKIS et al., 2018; NEGREIROS et al., 2019).

Os sintomas do seu ataque em meloeiro incluem amarelecimento e morte das folhas mais velhas, com gradual declínio das ramas, seguidos de murcha e morte das plantas, na época próxima à formação dos frutos, podendo, em alguns casos, provocar perda total da cultura (MARTYN; MILLER, 1996). Com o ataque, as raízes apresentam coloração marrom que evolui para podridão, ocasionando necrose do sistema radicular e perda de raízes secundárias e terciárias, tornando-se incapazes de absorver água e nutrientes (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000).

Segundo Martyn; Miller (1996), *M. cannonballus* é um fungo termófilo (termotolerante) bem adaptado às condições semiáridas e áridas, com temperatura ótima de crescimento variando entre 25 a 35 °C, sendo, no entanto, inibido em temperaturas acima de 40 °C e abaixo de 15 °C. Entretanto, um isolado de *M. cannonballus*, oriundo da Líbia, obteve seu ótimo de crescimento a 45 °C, tornando-se, dessa forma, termotolerante (BRUTON et al., 1998; WOLFF, 1998; PIVONIA, 2002). De acordo com Pivonia et al. (2002), este caráter termotolerante pode indicar que este fungo é patogênico apenas em regiões quentes e saprofítico em regiões mais frias. Assim, levando em conta essa característica, a região Nordeste do Brasil se mostra como excelente ambiente para o desenvolvimento deste patógeno (SALES JÚNIOR et al., 2010; 2018).

Estudos filogenéticos e de caracteres morfológicos realizados em isolados de *Monosporascus*, provenientes de raízes de plantas daninhas (brejo - *Trianthema portulacastrum* L. e pega-pinto - *Boerhavia diffusa* L.), prevalentes em áreas de cultivo de cucurbitáceas, nos estados do Rio Grande do Norte – RN e Ceará – CE (Brasil), identificaram cinco novas espécies de *Monosporascus*: *M. brasiliensis* A. Negreiros, M. León, J. Armengol & R. Sales Júnior; *M. caatinguensis* A. Negreiros, M. León, J. Armengol & R. Sales Júnior; *M. mossoroensis* A. Negreiros, M. León, J. Armengol & R. Sales Júnior; *M. nordestinus* A. Negreiros, M. León, J. Armengol & R. Sales Júnior; e, *M. semiaridus* A. Negreiros, M. León, J. Armengol & R. Sales Júnior (NEGREIROS et al., 2019).

Considerando as condições edafoclimáticas da região Nordeste, maior produtora de meloeiro, e as características do patógeno, temos as condições favoráveis para o desenvolvimento e estabelecimento do patógeno nos campos de produção. São poucos os

métodos de controle, sendo mais comuns os de base química, com o agravante de que são altamente letais ao meio ambiente e ao homem, por isso é de extrema importância o desenvolvimento de métodos de controle eficientes e mais sustentáveis para o controle do *M. cannonballus*.

1.3 Podridão do colo do meloeiro (*Macrophomina phaseolina*)

Macrophomina phaseolina Tassi (Goid) é um fitopatógeno que apresenta mais de 500 espécies botânicas como hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2018) e possui maior importância econômica devido à patogenicidade causada em plantas cultivadas, tais como feijão, algodão, sorgo, soja, beterraba, amendoim e especialmente o melão (LINHARES, 2018). Além das plantas cultivadas, podem ser consideradas como hospedeiras treze espécies de plantas daninhas, aumentando consideravelmente o volume de inóculo após safras sucessivas (NEGREIROS et al., 2019; SALES JÚNIOR et al., 2012).

As perdas se dão por meio de podridão de raízes, podridão do colo e tombamentos de plântulas, além de infectar sementes. *M. phaseolina* caracteriza-se por produzir microescleródios, estruturas de resistência que permitem sua sobrevivência no solo por longos períodos, atuando como principal fonte de inóculo (GUPTA et al., 2012). Este patógeno está distribuído em diferentes zonas climáticas do mundo, porém em áreas tropicais e subtropicais sua incidência é mais acentuada. Em regiões semiáridas, como é o caso dos campos produtivos de meloeiro no Nordeste brasileiro, este patógeno se torna ainda mais importante, pois os danos causados por ele aumentam durante períodos de seca, incluindo estresse hídrico e altas temperaturas, que favorecem sua sobrevivência e desenvolvimento (RADWAN et al., 2014).

Como forma de controle, o uso de variedades resistentes representa um mecanismo crucial no manejo de doenças fitopatogênicas. O controle químico ainda é o mais utilizado entre os produtores (PEREIRA et al., 2012), porém para esse patógeno na cultura do meloeiro não existe nenhum produto registrado, sendo esse outro fator preocupante, pois o produtor pode ser tentado a utilizar algum fungicida no cultivo. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos de controle eficientes e sustentáveis é fundamental para o cultivo do meloeiro no Nordeste brasileiro.

2 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos têm sua definição pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, e pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que considera agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Embora a aplicação de agrotóxicos tenha como principal objetivo aumentar a produtividade agrícola, seu uso intensivo e inadequado, a alta toxicidade de certos produtos e a falta de utilização de equipamentos de segurança individual geram um conjunto de ações negativas documentadas, que vão desde impactos sobre a saúde humana até impactos ambientais, incluindo contaminação da água, plantas e solo, diminuição do número de organismos vivos e aumento da resistência de pestes (MORAIS, 2019; TAVARES et al., 2020). Durante o processo de regulação dos agrotóxicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) realizam a investigação relativa à periculosidade dos produtos, de forma que todo agrotóxico apresenta em sua bula as classificações do risco à saúde humana e ao meio ambiente, sendo possível observar o quanto perigoso é o uso dessas substâncias, havendo um apelo da sociedade para que os cultivos diminuam seu uso, porém o produtor depende dos agrotóxicos, criando-se um ciclo infinito, por isso os controles alternativos que auxiliem o cultivo do meloeiro são de extrema importância.

O Brasil detém o rótulo de maior usuário de produtos químicos do mundo, somente entre 1978 a 1998 houve o crescimento de 540% em consumo de agrotóxicos e o gasto com seu uso supera 2,7 bilhões de dólares por ano. No cultivo do meloeiro, essa realidade não é diferente: estima-se que 70% dos gastos no cultivo estejam ligados ao uso dos agrotóxicos, sendo necessárias, portanto, alternativas para o cultivo que sejam eficientes e seguras aos humanos e ao meio ambiente, ou seja, alternativas mais sustentáveis (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016; MORAIS, 2019; TAVARES et al., 2020).

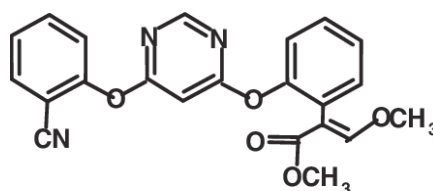
2.1 Azoxistrobina

Azoxistrobina é um fungicida sistêmico de amplo espectro que foi introduzido pela primeira vez em 1998, inibindo a germinação de esporos, sendo usado em videiras, cereais, batatas, maçãs, bananas, cítricos, tomates e outras culturas (JOSEPH, 1999). Os maiores usos de culturas conhecidas se dão em amêndoas, arroz, pistache, uvas para vinho, passas e alho. Dentre as doenças que a azoxistrobina controla estão ferrugem, míldio e míldio, brusone do arroz e sarna da macieira, sendo ele um pesticida de uso restrito da Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) (JOSEPH, 1999).

Pertence ao grupo químico: azoxistrobina: estrobilurina; ciproconazol: triazol; tendo tipo de formulação em forma de suspensão concentrada; classe toxicológica: III - medianamente tóxico, doenças controladas: Soja: ferrugem asiática, crestamento-foliar, mancha-parda, oídio (Informações do fabricante- SYNGENTA) A azoxistrobina comercial foi selecionada pela metodologia de química combinatória de análogos de produtos naturais, seguida de extensa caracterização biológica, tendo sido selecionada para desenvolvimento como um novo fungicida com propriedades físicas adequadas para um fungicida agrícola (JOSEPH, 1999).

O produto fungicida Azoxistrobina CCAB 250 SC é composto por Azoxistrobina, que apresenta mecanismo de ação dos Inibidores do complexo III: Citocromo bcl (ubiquinol oxidase) no sítio Qo, pertencente ao Grupo C3, segundo classificação internacional do Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas -FRAC) (JOSEPH, 1999; RODRIGUES et al., 2013).

A azoxistrobina compartilha seu modo de ação bioquímico com as estrobilurinas naturais, mostrando espectro de atividade muito amplo, sendo ativo contra patógenos fúngicos de todos os quatro grupos taxonômicos: os Oomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes, tendo como sítio de ação a mitocôndria do fungo, onde se liga ao complexo citocromo bc, impedindo o transporte de elétrons e a produção de energia via fosforilação oxidativa (RODRIGUES et al., 2013).



Azoxystrobin

Figura 1: Estrutura química da azoxistrobina [methyl (E)-2-{2-(6-(2cyanophenoxy) pyrimidin-4-yloxy) phenyl}-3-methoxyacrylate] (Fonte: JOSEPH, 1999).

A azoxistrobina inibe a respiração mitocondrial e a produção de energia, bloqueando a transferência de elétrons no sítio de quinona “fora” do complexo citocromo bc1 entre o citocromo b e o citocromo c1 referido como o sítio de oxidação do ubiquinol ou Qo e, assim, em última análise, impede a geração de ATP (LUSHCHAK, et al., 2018; MATSUZAKI et al., 2021).

O metabolismo da azoxistrobina foi estudado em trigo, uvas e amendoim, em todos os três estudos, as três formas radiomarcadas de azoxistrobina, formuladas como concentrados de suspensão, foram aplicadas como múltiplas pulverizações foliares em parcelas separadas. Os três estudos foram conduzidos em condições de campo para levar em consideração todos os fatores biocinéticos que podem influenciar a natureza do resíduo terminal na cultura, por exemplo, absorção, translocação, metabolismo, fotodegradação foliar, lavagem foliar e absorção pelo solo; em cada um dos estudos, a azoxistrobina foi aplicada em taxas iguais ou superiores às taxas de uso rotuladas como segue (LUSHCHAK et al., 2018).

2.2 Fludioxonil

Uma das classes de fungicidas mais populares e bem-sucedidas é o fungicida fenilpirrol; quase nenhum caso de resistência de campo foi relatado em aproximadamente 30 anos de uso intensivo na proteção de plantas agrícolas, o que torna o princípio ativo dessa classe de fungicidas um dos mecanismos moleculares de ação mais interessantes na pesquisa em proteção de plantas (BERSCHING; JACOB, 2021). O fenilpirrol fludioxonil (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrila) é um fungicida não sistêmico que mostra notável atividade ampla em todas as espécies de fungos (exceto Oomycetes), particularmente contra os gêneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Aspergillus*, *Monilinia* e *Penicillium* (BERSCHING; JACOB, 2021).

A alta eficácia contra diferentes fungos também o torna adequado para tratamentos pré e pós-colheita. No entanto, apesar dessa atividade e do uso bem sucedido como fungicida agrícola em todo o mundo, o mecanismo de ação do fludioxonil na via HOG ainda não foi esclarecido em detalhes (JAMPILEK, 2016). Berscing; Jacob (2021) indicaram a histidina quinases híbridas do grupo III (HK) como principal alvo do fungicida, sendo capaz de hiperativar o sinal de glicerol de alta osmolaridade (HOG), sinalizado por meio de histidina quinases híbridas do grupo III (HK). As HKs do Grupo III fazem parte de sistemas de fosforelay multietapas (MSP) e, portanto, são requisitos para a variabilidade da transdução de sinal celular em organismos eucarióticos. Esses sistemas de sinalização modulam seu estado

fisiológico para manter a homeostase celular (BERSCHING; JACOB, 2021). Nos estudos recentes, os autores demonstram que: a mutação da histidina 736 é necessária, mas não essencial para a sensibilidade do estresse osmótico; o mutante MoHik1pH736A é resistente ao fludioxonil e insensível ao estresse osmótico e, portanto, esse aminoácido, H736, participa do modo de ação do fludioxonil, mas não é essencial para o sensor de estresse osmótico (LAWRY et al., 2017).

3 NANOTECNOLOGIA

Segundo Sahoo et al. (2007), a nanotecnologia visa à caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (10^{-9} metro). O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. A importância das estruturas nessa escala está ligada às suas propriedades funcionais únicas, que não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Nanotecnologia é uma nova tendência da ciência que está sendo utilizada mundialmente para solucionar problemas em diversas áreas, inclusive na agricultura (LIMA, 2020).

Adicionalmente, associadas a moléculas ativas, as nanopartículas apresentam funcionalidades antifúngicas e antibacterianas e, portanto, essas são potenciais ativos para o controle de doenças/pragas em plantas (CASTAÑEDA et al., 2017). Para o controle de uma doença em planta, as nanopartículas podem ser incorporadas e combinadas como um facilitador de moléculas ativas (de origem natural ou artificiais) como um dos componentes da gestão integrada da doença (SHAH; WANI, 2016).

Recentemente, Bui et al. (2021) elaboraram uma nanoformulação com óleo de cúrcuma que aumentou a eficiência do óleo essencial em 6 vezes. Kutawa et al. (2021) revisaram o estado da arte do desenvolvimento de nanofungicidas e destacaram os potenciais benefícios das nanoformulações e a oportunidade de estudos de campo para a inovação de nanofungicidas. Nanopartículas servem como transportadores de compostos fungicidas e apresentam as vantagens de incremento de solubilidade, aumento de vida de prateleira, aumento da especificidade e redução da toxicidade (KUTAWA et al., 2021).

Kumar et al. (2017) relataram a utilização de nanopartículas combinadas a validamicina e carbendazin, observando que *in vitro* a nanopartícula teve maior eficácia e menores concentrações comparadas à aplicação dos compostos puros em testes contra as

espécies-alvo *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus parasiticus*, ao passo que para os organismos não alvo as nanoformulações foram atóxicas.

Os impactos sociais e econômicos da adoção da tecnologia são: contribuir para a segurança alimentar por meio de uma agricultura altamente produtiva e sustentável; mitigar riscos ambientais e à saúde humana, causados pelas atividades agrícolas convencionais; auxiliar o desenvolvimento de insumos agroquímicos de alto desempenho para produção de alimentos em condições adversas causadas por mudanças climáticas; contribuir para a eliminação do impacto adverso da transferência trófica de nanopartículas convencionais na cadeia alimentar; exibir um paradigma disruptivo necessário à inovação na produtividade e proteção de cultivos baseada em nanomateriais verdes (LIMA, 2020).

Outra vantagem do sistema nanotransportador é o aumento da eficácia da estabilidade e atividade dos nanofungicidas sob diferentes fatores ecológicos, reduzindo essencialmente o número e a quantidade de aplicações, o que diminui a nocividade e diminui seus gastos ou custos.

4 ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso excessivo de inseticidas e fungicidas sintéticos provoca o desenvolvimento de insetos resistentes e raças de fungos, danos à sustentabilidade ambiental, toxicidade residual, toxicidade para organismos não-alvo e graves distúrbios de saúde humana e animal (KUMAR 2012). Daí o interesse dirigido a inseticidas/fungicidas de origem natural que oferecem abordagem biorracional eficiente para inibir o crescimento de fungos e/ou infestação de insetos e contaminação por micotoxinas (DAS et al., 2021).

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos aromáticos produzidos por meio de uma série de vias metabólicas em plantas com o objetivo de defendê-las de ampla gama de patógenos e são comumente extraídos por destilação a vapor (NAIR et al., 2022). Estudos recentes têm apontado o uso de óleos essenciais de plantas medicinais e extratos para o controle de doenças fúngicas. Porém, diferentes fatores que influenciam a composição química de OEs, tais como espécie, condições climáticas, condições do solo, fertilização, genótipo, modo de produção, épocas de colheita e procedimento de extração. Dois grandes grupos de compostos químicos compõem os OEs: os (i) compostos aromáticos e alifáticos, e (ii) hidrocarboneto terpenos (isoprenos) e terpenoides (isoprenoides).

Os terpenos são unidades de isopreno de cinco carbonos (C₅H₈) que constituem a maior classe de compostos químicos presentes nos óleos essenciais. Os terpenos são

classificados como mono-, sesqui-, di-, ses-, tri- e tetra-terpenos ou hemi-terpenos alternados com base no número de átomos de carbono presentes na estrutura. No entanto, os monoterpenos e sesquiterpenos são os mais importantes constituintes dos óleos essenciais responsáveis pelo seu aroma característico dos OEs. Monoterpenos são compostos de duas unidades de isopreno e existem nas formas monocíclica, bicíclica e acíclica, ao passo que os sesquiterpenos são compostos de três unidades de isopreno e ocorrem em formas acíclicas, monocíclicas, formas bicíclicas e tricíclicas (NAIR et al., 2022). Modificações químicas de um terpeno ou sesquiterpeno, por meio de oxidação ou rearranjo estrutural, produzem diferentes terpenoides. Assim, os OEs com diversas composições químicas exibem ampla gama de efeitos terapêuticos.

A aplicação de OEs para o controle de doenças de meloeiro foi relatada anteriormente (FREIRE et al., 2010), tendo sido avaliados os efeitos OE *in vitro* contra os fungos *Fusarium pallidoroseum* e *Myrothecium roridum*, importantes patógenos de doenças pós-colheita de frutos de meloeiro no Brasil. Foram testados seis óleos: canela, (250 ppm e 50 ppm), pimenta-de-macaco (250 ppm e 50 ppm), laranja (50 ppm e 250 ppm), capim-santo (250 ppm), pitanga (100 ppm e 200 ppm) e Funginate (0,25x). Os autores observaram que os óleos de canela, capim-santo e pitanga provocaram inibição do crescimento micelial abaixo de 50%, concluindo que os óleos essenciais testados inibem o crescimento micelial de *F. pallidoroseum* e *M. roridum* em dosagens superiores a 250 ppm.

Mais recentemente, Porcino (2018) demonstrou que o óleo essencial de erva-doce foi eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira ‘Dancy’, e os óleos essenciais de citronela, copaíba e gengibre não demonstraram efeito.

A entrega inteligente de pesticidas é essencial para reduzir a dosagem com maior eficácia e superar perda de pesticidas (por exemplo, devido à lixiviação e evaporação). As tendências futuras dos pesticidas e nanoformulações incluem nanomateriais como nanoemulsões de biopesticidas (ANTONIOLI, 2019). As tendências futuras dos pesticidas entregues por nanoformulações incluem nanomateriais e nanoemulsões de biopesticidas (LIMA, 2020).

5 ANÁLISE GENÔMICA E PÓS-GENÔMICA

Genômica é uma ciência que estuda o genoma de uma espécie a partir da obtenção da sua sequência, com o objetivo de entender sua estrutura, organização e função. O sequenciamento genético é a primeira parte da análise genômica; após sua obtenção, são

necessários estudos para identificar quais trechos da sequência correspondem a genes, comparar a sequência com indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes, etc. O acúmulo de sequências gênicas e genomas depositados em bancos de dados tem aumentado a demanda por metodologias que permitam sua análise funcional (BASSO, 2015; MELO, 2009).

A bioinformática surge como principal ferramenta para elucidar as questões da função dos genes, tendo como principal aplicação o emprego da tecnologia da informação na manipulação de dados biológicos (SHAMIR; SHARAN, 2001). A pesquisa na bioinformática e biologia computacional pode abranger qualquer informação sobre a abstração de propriedades de um sistema biológico em um modelo físico ou matemático para a implementação de novos algoritmos para a análise dos dados (MELO, 2009).

A experimentação computacional ou análise *in silico* representa o estudo pós-genômico. Um exemplo prático dessa experimentação é a modelagem computacional de proteínas que permite fazer a identificação de drogas com base na estrutura de alvos proteicos (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Segundo Martins et al. (2016), a seleção de proteínas para a construção posterior de inibidores tem como princípio básico a chave e fechadura, onde a proteína alvo representa a fechadura e os possíveis inibidores representam as inúmeras possibilidades de chaves que se encaixam na respectiva fechadura. Esse princípio já é adotado para seleção de drogas na medicina e pode ser usado na agricultura visando ao controle de doenças, a partir da identificação de um alvo que normalmente é uma proteína ou uma enzima originada do patógeno de interesse, e os inibidores do alvo são compostos/agroquímicos que inibem a ação.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI, G. **Desenvolvimento de nanocápsulas de poli (ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos**. 2019. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Brasil, 2019.
- ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e Agrotóxicos: Impactos à Saúde dos Trabalhadores Agrícolas no Nordeste Brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 117-129, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-7746-sol00043>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- BASSO, T. A. **Clusterização aplicada na análise genômica**. 2015. 78f. Trabalho de conclusão de curso em Ciência da Computação - Universidade de Caxias do Sul, Brasil, 2015.
- BERSCHING, K.; JACOB, S. The molecular mechanism of fludioxonil action is different to osmotic stress sensing. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 393, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7050393>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2019/20 a 2029/30: projeções de longo prazo**. Brasília, 2020. 102p.
- BRUTON, B. D. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: MCCREIGHT, J. (Ed.). **Cucurbitaceae 98**. Alexandria: International Society of Horticultural Science, 1998. p. 143-166.
- BUI, V.C.; LE, T.T.; NGUYEN, T.H.; PHAM, N.T.; VU, H.D.; NGUYEN, X.C.; DE TRAN, Q.; HOANG, T.; LE DANG, Q.; LAM, T.D. (2021). Curcumin-removed turmeric oleoresin nano-emulsion as a novel botanical fungicide to control anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in litchi. **Green Processing and Synthesis**, vol. 10, n. 1, p. 729-741. Disponível em <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0071>. Acesso em 21 de março de 2022
- CASTAÑEDA, M. F.; CAMPOS-GONZÁLEZ, E.; AGUILAR, I. R.; CAMPS, E.; CRUCES, M. P.; PIMENTEL, E.; CAMACHO, M. Preparation and characterization of organic nanoparticles by laser ablation in liquids technique and their biological activity. **Materials Research Express**, v. 6, n. 10, 105091, 2019.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.007>. Disponível em: 15 mar. 2022.
- DAS, S. et al. Insecticidal and fungicidal efficacy of essential oils and nanoencapsulation approaches for the development of next generation ecofriendly green preservatives for management of stored food commodities: an overview. **International Journal of Pest Management**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–32, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670874.2021.1969473>. Acesso em: 20 mar. 2022.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases - U.S.** National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acessado em: 10 mar. 2018.

FIGUEIRÊDO M. C. B.; GONDIM R. S.; ARAGÃO, F. A. S. (org.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica.** Brasília: Embrapa, 2017.

FREIRE, E. B.; COSTA, V. S. O.; SANTOS, L. O.; BATISTA, D. C.; TERAPO, D.; BARBOSA, M. A. G. Efeitos de óleos essenciais na inibição in vitro dos patógenos pós-colheita de melão *Fusarium pallidoroseum* e *Myrothecium roridum*. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 5., 2010, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Páginas: p. 165-171. Série: Embrapa Semiárido. Documentos, 228.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; SALES JUNIOR, R.; JORDÁ, C.; BRUTON, B. D. Fungal pathogens associated with melon plants collapse in Spain. **EPP0 Bulletin**, Paris, v. 30, n. 2, p. 169-173, 2000.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 167–180, 2012 Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x>. Acesso em: 18 mar. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2020). Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>. Acesso em 21 de março de 2022.

JAMPILEK, J. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

JOSEPH, R. S. I. Metabolism of Azoxystrobin in Plants and Animals. In: BROOKS, Gerald T.; ROBERTS, T. R. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Pesticide Chemistry and Bioscience.** Woodhead Publishing, 1999. p. 265-278. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845698416.6.265>. Acesso em: 21 mar. 2022.

KUMAR, S. Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. **Journal of Biofertilizers and Biopesticides**.v. 3. 2012. Disponível: 10.4172/2155-6202.1000e107.

KUMAR, S., KUMAR, D., & DILBAGHI, N. (2017). Preparation, characterization and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 24, p. 926–937, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7774-y>. Acesso em 14 de março de 2022.

KUTAWA A.B., AHMAD K., ALI A., HUSSEIN M.Z., WAHAB M.A.A., ADAMU A., ISMAILA A.A., GUNASENA M.T., RAHMAN M.Z., HOSSAIN I. (2021). Trends in nanotechnology and its potentialities to control plant pathogenic fungi: a review. **Biology**

(Basel), 10(9):881 (PMID: 34571758 - PMCID: PMC8465907). Disponível em <https://doi.org/10.3390/biology10090881>. Acesso em 13 de março de 2022.

LAWRY, S.; TEBBETS, B.; KEAN, I.; STEWART, D.; HETELLE, J.; KLEIN, B. S. Fludioxonil induces Drk1, a fungal group III hybrid histidine kinase, to dephosphorylate its downstream target, Ypd1. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 61, e01414–e01416, 2017.

LIMA, J. D. **Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura**. 2020. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

LINHARES, C. M. S. **Reação de acessos e herança da resistência *Macrophomina phaseolina* e efeito da temperatura na podridão cinzenta em meloeiro**. 2018. 65 f. Tese (Doutorado) - Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi - Árido, Mossoró, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufersa.edu.br/bitstream/prefix/910/1/CheylaMSL_TESE.pdf. Acesso em: 14 mar. 2022.

LUSHCHAK, I. et al. 2018. Review article: PESTICIDE TOXICITY: A MECHANISTIC APPROACH Volodymyr. Storeyb. **EXCLI Journal** 2018; 17:1101-1136 – <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1710>.

MARKAKIS, E. A.; TRANTAS, E. A.; LAGOIANNI, C. S.; MPALANTINAKI, E.; PAGOULATOU, M.; VERVERIDIS, F. N.; GOUMAS, D. E. First report of root rot and vine decline of melon caused by *Monosporascus cannonballus* in Greece. **Plant Disease**, v. 102, p. 1036, 2018.

MARTINS, N. F. et al. Searching for Novel Targets to Control Wheat Head Blight Disease— I-Protein Identification, 3D Modeling and Virtual Screening. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 811-830, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.611079>. Acesso em: 10 mar. 2022.

MATSUZAKI, Y.; YOSHIMOTO, Y.; ARIMORI, S.; IWAHASHI, F. The discovery of metyltetraprole: Reconstruction of the quinone outside inhibitor extended pharmacophore to overcome QoI-resistant strains. In: MAIENFISCH, P.; MANGELINCKX, S. (org.). **Recent Highlights in the Discovery and Optimization of Crop Protection Products**. Academic Press, 2021. p. 425-432.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. **Plant Disease**, v. 80, p. 716-725, 1996.

MELO, H. V. F. **Desenvolvimento de um pipeline para análise genômica e transcrito com base em Web services**. 2009. 105f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.

MORAEIS, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**, Texto para Discussão, No. 2506, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em: 14 mar. 2022.

MOURA, M. da C. F.; OLIVEIRA, L. C. S. de; SILVA, S. G. de A. e. A CULTURA DO MELÃO: UMA ABORDAGEM ACERCA DA CADEIA PRODUTIVA NO AGROPÓLO MOSSORÓ – ASSÚ/RN. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, [S. l.], v. 7, n. 7, 2011. DOI: 10.17271/19800827772011183. Disponível em: https://publicacoes.amigosdanatureza.org.br/index.php/forum_ambiental/article/view/183. Acesso em: 11 mar. 2022.

NAIR, A.; MALLYA, R.; SUVARNA, V.; KHAN, T. A.; MOMIN, M.; OMRI, A. Nanoparticles—Attractive Carriers of Antimicrobial Essential Oils. **Antibiotics** 2022, 11, 108. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010108>.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Prevalent weeds collected from cucurbit fields in Northeastern Brazil reveal new species diversity in the genus *Monosporascus*. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 3, p. 349-363, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aab.12493>. Acesso em: 10 mar. 2022.

PEREIRA, R. B. et al. **Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro. Circular Técnica**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012. 8p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71696/1/ct-1121.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2022.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; LEVITA, R.; KATAN, J. Improved solarization of containerized medium for the control of *Monosporascus* collapse in melons. **Crop Protection**, v. 21, n. 10, p. 907-912, 2002.

POLLACK, F. G.; UECKER, F. A. *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia**, v. 66, p. 346–349, 1974.

PORCINO, M. M. **Óleos essenciais no manejo da mancha marrom de alternaria em tangerineira ‘dancy’**. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

RADWAN, O. et al. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions for charcoal rot in soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 617-629, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0686-9>. Acesso em: 14 mar. 2022

RODRIGUES, E.T.; LOPES, I.; PARDAL, M. A. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. **Environment International**, v. 53, p. 18-28 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.005>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SALES JÚNIOR, R. et al. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n. 1, p. 84, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.1.84B>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SALES JÚNIOR, R. et al. First Report of *Monosporascus cannonballus* on watermelon in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 2, p. 278, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0278B>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, E. V.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000100024>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SALES JÚNIOR, R. et al. Podridão de raízes por *Monosporascus* e declínio de ramas no meloeiro: grave problema sem solução. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (org.). **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 111-130.

SHAH, M. A.; WANI, S.H. Nanotechnology and insecticidal formulations. **Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing**, v. 1, p. 285–310, 2016.

SHAMIR, R.; SHARAN, R. Algorithmic Approaches to Clustering Gene Expression Data. **Current Topics In Computational Biology**. 2001.

SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. In: BIOINFO - **Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**. 1. Ed. Vol. 1. Lagoa Santa: Editora Alfahelix, 2021.

SOUZA, G., GOMES, E., GAZZOLA, R. Agropecuária brasileira: produtividade e taxas de crescimento. **Revista de Política Agrícola**, v. 31, n. 1, p. 86-104, abr. 2022. Disponível em: <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/1699>. Acesso em: 20 jul. 2022.

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; MOREIRA, S. S. C.; FERNANDES, A. C. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Revista S&G**, v. 15, n. 1, p. 2-10, 2020. Disponível em: <https://revistasg.emnuvens.com.br/sg/article/view/1532>. Acesso em: 13 mar. 2022.

WOLFF, D. W.; MILLER, M. Tolerance to *Monosporascus* root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. **HortScience**, v. 33, p. 287-290, 1998.

YAN, L. Y. et al. First report of root rot and vine decline of melon caused by *Monosporascus cannonballus* in Eastern Mainland China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 651, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0655-PDN>. Acesso em: 12 mar. 2022.

CAPÍTULO II

Análise pós-genômica dos fungos fitopatogênicos *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*

RESUMO

Monosporascus cannonballus e *Macrophomina phaseolina* são dois fungos fitopatogênicos que já tiveram sua caracterização molecular e, portanto, possuem seu genoma disponível. Essa disponibilidade permite a busca de alvos proteicos de forma racional com a ajuda da bioinformática. Portanto, o objetivo desse trabalho foi selecionar novas proteínas alvos que servirão como base para o desenvolvimento de fungicidas para o controle desses patógenos. Foram analisados os genomas dos fungos *M. cannonballus* (assembly ASM415492v1) e *M. phaseolina* (assembly ASM2087553v1) utilizando os softwares de análise BIOEDIT e BLAST utilizados para separar, filtrar e comparar sequências proteicas. Foram separadas proteínas por critérios funcionais (putative e hypothetical), proteínas nucleares, proteínas de membrana, receptores e transportadores, actinas, proteínas mitocondriais e proteínas de interação com DNA e RNA. O banco de dados Protein DataBank foi utilizado para busca de proteínas que possuem homólogos a fim de elencar e selecionar proteínas do genoma dos fungos. Para *M. cannonballus*, foram reanotadas 17.518 proteínas iniciais, das quais foram selecionados 13 alvos candidatos, e para *M. phaseolina* das 30.226 proteínas iniciais foram identificadas 10 proteínas como potenciais alvos. Deste modo, esse estudo abre perspectivas para a geração de conhecimento sobre a função molecular das proteínas alvo, por meio da validação experimental de novos inibidores.

Palavra-chave: Modelagem D de proteínas; Seleção de alvos; Desenvolvimento de fungicidas; Podridão de raízes do melão; Declínio de ramos do melão.

ABSTRACT

Monosporascus cannonballus e *Macrophomina phaseolina* are two phytoatogenic fungi that have already had their molecular characterization and therefore have their genome available, this availability allows the search for protein targets in a rational way with the help of bioinformatics. Therefore, the objective of this work was to select new target proteins that will serve as a basis for the development of fungicides to control these pathogens. The genomes of the fungi *M. cannonballus* (assembly ASM415492v1) and *M. phaseolina* (assembly ASM2087553v1) were analyzed using the analysis software BIOEDIT, and BLAST were used to separate, filter and compare protein sequences. Proteins were separated by functional criteria (putative and hypothetical), nuclear proteins, membrane proteins, receptors and transporters, actins, mitochondrial proteins and proteins that interact with DNA and RNA. The Protein DataBank database was used to search for proteins that have homologs to list and select proteins from the fungal genome. For *M. cannonballus* of the 14,987 initial proteins it was possible to select 13 candidate targets and for *M. phaseolina* of the 30,226 initial proteins, it was possible to identify 10 proteins as potential targets. Thus, this study opens perspectives for the generation of knowledge about the molecular function of target proteins, through the experimental validation of new inhibitors.

Key words: Modeling D of proteins; Target selection; Development of fungicides; Melon root rot; Decline of melon vines.

1 INTRODUÇÃO

A evolução do desenvolvimento de agentes de controle é estimulante, porém desafiadora, incluindo a necessidade de desenvolver novas estratégias e soluções com abordagem multidisciplinar (MARTINS et al., 2016). A utilização da experimentação molecular computacional no desenvolvimento de produtos para controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola, além de diminuir os custos e o impacto ambiental, tem se mostrado uma abordagem eficaz para fungos, como, por exemplo, *Fusarium graminearum* (ATASANOVA et al., 2022). Neste contexto, a disponibilidade de genomas completos de patógenos permite a busca de alvos proteicos de forma racional com a ajuda da bioinformática.

As ferramentas de bioinformática usadas de forma a selecionar candidatos seguindo critérios de elenco são conhecidas como desenvolvimento de drogas baseada na estrutura de alvos proteicos (DDBE). Em outras palavras, é a seleção de proteínas para a construção posterior de inibidores, seguindo a analogia de chaves e fechaduras, onde a proteína alvo representa a fechadura e os possíveis inibidores representam as inúmeras possibilidades de chaves que se encaixam na respectiva fechadura (BRESSO et al., 2016; MARTINS et al., 2016).

Na medicina, esta abordagem é bem reconhecida e muitos medicamentos hoje no mercado foram desenvolvidos por esta estratégia (BATOOL et al., 2019). A aplicação da DDBE na agricultura teve início nos anos 2000 (WALTER, 2002). O alvo de um inibidor/agroquímico é uma biomolécula (s), normalmente é uma proteína ou uma enzima que se apresenta isolada ou complexada originada no patógeno ou praga de interesse.

A disponibilidade cada vez maior de dados genômicos, possibilita a busca de alvos potenciais mais certos para o controle de vias metabólicas específicas relacionadas ao ataque do patógeno ao hospedeiro e disparadas em resposta a esta interação. São exemplos de sucesso os estudos realizados para fusariose em trigo (BRESSO et al., 2016), ferrugem do cafeeiro (LIMA, 2020), na redução de micotoxinas (SAVOIE et al., 2019), dentre outros. O avanço tecnológico das últimas duas décadas trouxe o acúmulo de dados de sequências de genomas de várias espécies fitopatogênicas, iniciando, desta forma, uma era pós-genômica.

Em relação aos fungos fitopatogênicos, a crescente disponibilidade de genomas completos nos permite abordar o desenvolvimento de compostos antipatógenos em nível genômico e, a partir de uma abordagem comparativa, buscar novos alvos proteicos e fazer previsões sobre potenciais domínios funcionais.

Monosporascus cannonballus e *Macrophomina phaseolina* são fungos fitopatogênicos de grande interesse para o Nordeste do Brasil, pois ocasionam doenças radiculares severas na cultura do melão (*Cucumis melo* L.); além disso, a ausência de controle desses patógenos tem sido a preocupação dos produtores e pesquisadores da área (NEGREIROS et al., 2019 SALES JUNIOR et al., 2012). Ambos os patógenos possuem o genoma disponível em base de dados.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo fazer a identificação de genes conservados que servirão como potenciais alvos para o desenvolvimento de fungicidas para o controle desses patógenos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada foi a análise genômica *in silico*, estratégia moderna que explora as informações armazenadas nos genomas e proteínas transcritas para prospectar genes e responder a questões biológicas em busca de interações entre novos compostos e alvos específicos, que são proteínas específicas, buscamos por alinhamentos em diversos bancos de dados as características que elegem alvos moleculares (MARTINS et al., 2016)

Foram analisados os genomas dos fungos *M. cannonballus* ([assembly ASM415492v1](#)) e *M. phaseolina* ([assembly ASM2087553v1](#)), ambos publicados e armazenados no Genbank. Os isolados do fungo ascomiceto *M. cannonballus* (POLLACK e UECKER, 1974) foram sequenciados pelo grupo da Universidade do Novo México, nos Estados Unidos, que publicou o sumário deste sequenciamento em 2020. O genoma do fungo *M. phaseolina* foi sequenciado pela primeira vez em 2012 pelo grupo de Bangladesh (ISLAM et al, 2012).

O *software* de análise BIOEDIT foi utilizado para separar, filtrar e comparar sequências proteicas. Foram separadas proteínas por critérios funcionais (putative e hypothetical), proteínas nucleares, proteínas de membrana, receptores e transportadores, actinas, proteínas mitocondriais e proteínas de interação com DNA e RNA. Por fim, a busca de proteínas que possuem homólogos no banco de dados Protein DataBank.

2.1 Configuração do conjunto de dados

Para elencar e selecionar proteínas do genoma dos fungos *M. cannonbalus* e *M. phaseolina*, e seus potenciais como alvos fungicidas, foi realizada triagem das proteínas dos genomas conforme a Figura 1. Agrupou-se os conjuntos de proteínas traduzidas dos dois fungos e criou-se duas bases de dados a partir da busca por meio do BLASTx, com objetivo

caracterizar as proteínas funcionais. Todos os unigenes foram submetidos a buscas em bancos de dados como o Genbank, NR Gene e Reference Genes para a seleção de proteínas para a modelagem molecular e desenvolvimento de compostos baseados na estrutura (MARTINS et al., 2016).

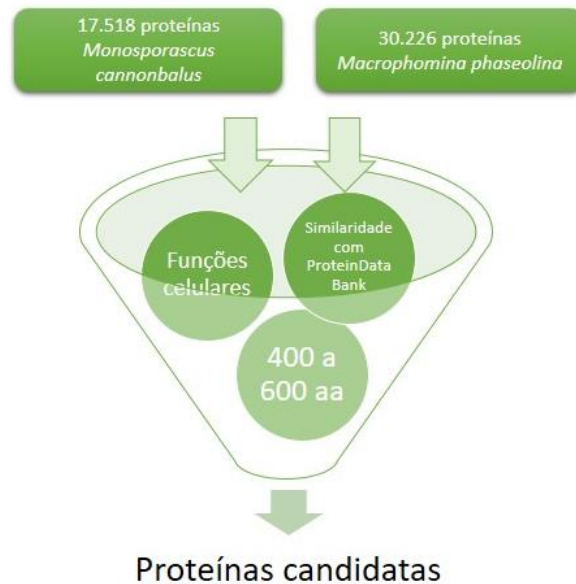


Figura 1- Esquema representativo da metodologia de análise genômica.

2.2 Estratégia de Seleção de Alvos

O critério sistemático para filtragem dos alvos foi definido em termos de prioridade, na medida em que o objetivo primário foi identificar proteínas que pudessem ser usadas como alvos para o desenvolvimento de fungicidas. Os critérios aplicados foram: 1) anotação proteica, descrição fenotípica e como os genes únicos são expressos nos primeiros dias de infecção; 2) descartou-se sequências redundantes, proteínas com baixa similaridade estrutural com o Protein Databank (PDB); 3) predição de localização celular e candidatos com baixa acessibilidade a compostos químicos; 4) número de cópias gênicas no genoma e tamanho entre 400 a 600 aminoácidos; 5) ausência de ortólogos em organismos não alvo, tais como insetos, plantas, humanos.

O primeiro passo deste afunilamento foi a anotação proteica, com a caracterização fenotípica identificada via data base *Pathogen Host Interactions* (PHI-base). O próximo estágio da seleção foi a eliminação da redundância, seguida pela localização celular (citoplasma) e acessibilidade a químicos, e enfim uma busca BLAST de candidatos contra o PDB. O terceiro passo realizou-se a curadoria manual para algumas cópias gênicas, uma ou

duas no genoma com tamanho proteico entre 400 a 600 aminoácidos. Finalmente, a eliminação de ortólogos em outras espécies não alvo com um critério de identidade de sequência (acima de 60%). O final destas seleções apresenta a proposição de proteínas alvos candidatos para o desenho molecular por modelagem e busca de compostos químicos inibitórios potenciais novos fungicidas (MARTINS et al., 2016).

2.3 Modelagem Molecular das proteínas alvo

Na ausência de estruturas 3D experimentalmente resolvidas, os métodos computacionais foram utilizados para prever modelos proteicos 3D e fornecer informações relacionadas com funções proteicas e estruturais. Para se construir modelos 3D apropriados, dos alvos selecionados, foi por meio do uso do programa Modeller hospedado no servidor SwissProt - <https://swissmodel.expasy.org/>. Uma vez identificada a proteína alvo como a mais adequada ao template (molde) para a modelagem comparativa, foi realizado o alinhamento múltiplo de sequência, com parâmetros padrão para confirmar a similaridade de sequência e verificar a conservação de assinaturas estruturais. O *software* MODELLER foi usado para realizar a tarefa de modelagem comparativa com suas configurações padrão (MARTINS et al., 2016).

A modelagem por homologia é um tipo específico de modelagem comparativa em que o modelo e as proteínas alvo compartilham a mesma origem evolutiva. Modelagem comparativa envolve as seguintes etapas: (1) identificação de proteínas para servir como estruturas modelo, (2) alinhamento de sequência das proteínas alvo e modelo, (3) cópias coordenadas para regiões alinhadas com confiança, (4) construções coordenadas de átomos ausentes da estrutura alvo e (5) refinamento do modelo e avaliação das estruturas (BRESSO et al., 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de alvos no genoma de *Monosporascus cannonballus*

As sequências foram recuperadas do *site* do NCBI e analisadas quanto à anotação funcional das proteínas do fungo. Apesar da anotação automática ter sido relatada em 2020, foi necessário fazer análises complementares ao genoma, sumarizadas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Anotação funcional das sequências de *Monosporascus cannonballus*.

Programa	Base de dados	Parâmetro	Resultados
BLASTP	SWISSPROT	blastp -query data/monosporascus.fasta -db data/swissprot/swissprot -out results/blastp_swissprot.out -max_target_seqs 1 -evalue 0.0000000001 -outfmt 6	12.479
BLASTP	PHIBASE	blastp -query monosporascus.fasta - subject phi-base.fasta -out blastp_phibase.out - max_target_seqs 1 -evalue 0.0000000001 -outfmt 6	6.875
BLASTP	PDB	blastp -query data/monosporascus.fasta -db data/pdb/pdbaa -out results/blastp_pdb.out - max_target_seqs 1 -evalue 0.0000000001 -outfmt 6	9.271
Interproscan	[CDD-3.17,Coils-2.2.1,Gene3D- 4.2.0,Hamap-2019_01,MobiDBLite- 2.0,PANTHER-14.1,Pfam-32.0,PIRSF- 3.02,PRINTS-42.0,ProSitePatterns- 2019_01,ProSiteProfiles- 2019_01,SFLD-4,SMART- 7.1,SUPERFAMILY-1.75,TIGRFAM- 15.0	e-values menores que -10	14.987

A reanotação automática do genoma de *M. cannonballus* identificou 17.518 proteínas (Figura 2), dentre elas as principais famílias gênicas: Protein kinase-like, hidrolases Alpha/Beta hydrolase, proteínas transportadoras MFS, a superfamília NAD (P)-binding domain e a superfamília triphosphate hydrolase, dentre outras famílias proteicas correspondentes a vias metabólicas e genes conhecidos.

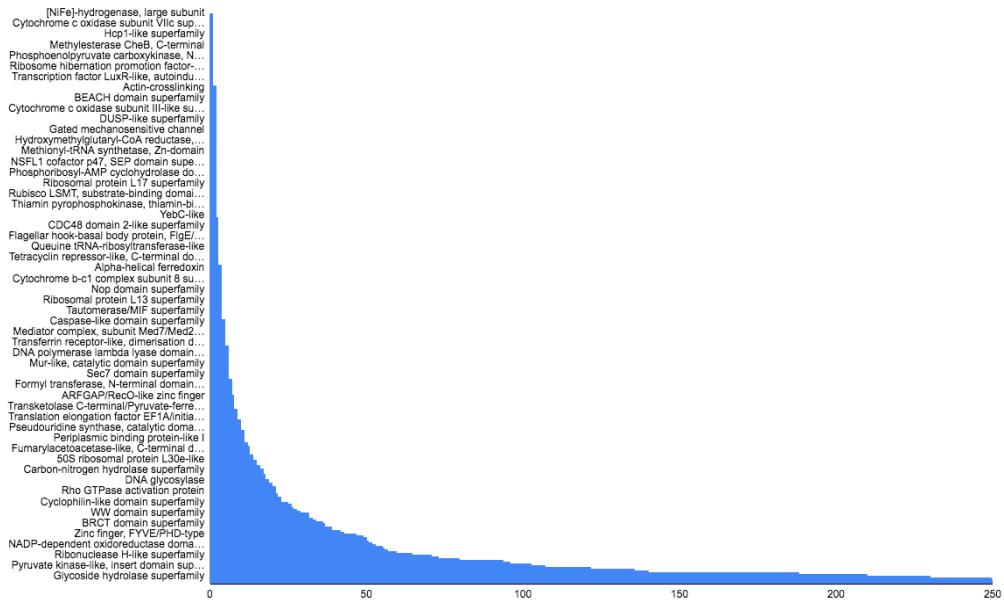


Figura 2: Anotação automática do genoma de *Monosporascus cannonballus* em termos de superfamílias identificadas pelo BLASTp contra InterproSCAN.

Das 17.518 proteínas, a seleção de alvos moleculares de acordo com os critérios de triagem reduziu a base a 7.630 sequências proteicas candidatas submetidas a buscas por estruturas conhecidas selecionou 13 alvos candidatos do genoma de *Monosporascus cannonbalus* (Tabela 2).

Tabela 2 - Elenco de proteínas candidatas a partir da busca por BLAST de 7630 sequências proteicas de *Monosporascus cannonbalus* contra o banco de dados de genes essenciais (ABADIO et al., 2011) Blast evalúe e-100, low complexity filtered.

Sequência Busca	Sequência identificada	Função	e-value	Score	Similaridade %	Referência
RYO90765.1	XP_751532.1	thioredoxin reductase Trr1/Trr2	5e-141	488	74	Poonam et al. (2016)
RYO77526.1	XP_710946.1	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	1e-153	530	71	Lado et al. (2019)
RYO85488.1	XP_753861.1	mitochondrial ferrochelatase	2e-159	549	77	Dafna et al. (2016)
RYO91695.1	EEQ44277.1	sterol 24-C-methyltransferase	2e-112	392	52	Nes et al. (2009)
RYO88434.1	XP_753748.1	homoaconitase LysF	3e-127	442	56	Liebmann et al. (2004)
RYO98630.1	sp Q00310.1	2-alpha-mannosyltransferase	2e-130	453	49	Wang et al. (2021)
RYO94866.1	XP_750449.1	phosphatidate cytidyltransferase	7e-170	584	66	Yang et al. (2020)
RYP01068.1	XP_755457.1	UDP-N-acetylglucosamine-1-P transferase Alg7	4e-165	568	60	Bereketoglu et al. (2017)
YO94118.1	XP_748918.1	stearic acid desaturase (SdeA)	0.0	755	78	Wang et al. (2021)
RYO78693.1	XP_752047.1	mevalonate kinase	2e-158	546	59	Tabatabaee et al. (2021)
RYO89358.1	XP_751695.1	saccharopine dehydrogenase Lys9	3e-166	572	66	Do et al. (2016)
RYO99517.1	XP_747977.1	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	2e-151	523	54	Liu et al. (2014)
RYO99367.1	XP_747988.1	glutamyl-tRNA synthetase	0.0	788	63	Bouz; Zitko (2021)

No sumário do sequenciamento realizado pela Universidade do Novo México, nos Estados Unidos, para *M. cannonballus* foram relatados 11.800 genes preditos, com um genoma total estimado em 70 Mb. A anotação dos conjuntos do genoma de *Monosporascus* indica um conteúdo genético previsto semelhante a outros membros dos Sordario-mycetes e Xylariales. Aaron et al. (2020) não observaram correlação entre o tamanho do genoma e o

número de genes previsto entre os conjuntos de *Monosporascus* ou entre os membros da família Xylariales. Comparações sintênicas entre os genomas de *Monosporascus* e outros membros de Xylariales identificaram regiões de sintenia, bem como grandes regiões sem similaridade. Recentemente, Robinson et al. (2020) realizaram comparações de sintenia genômica e conteúdo gênico funcional entre isolados de *Monosporascus* buscando genes associados a interações fungos-plantas e regiões genômicas que demonstram falta de sintenia entre as montagens de *Monosporascus*. A anotação realizada pelos autores indicou um conteúdo genético semelhante a outros membros dos Sordariomycetes e Xylariales, apesar de seus tamanhos de genoma. Essa incompletude de informações também foi observada aqui nessa pesquisa, razão pela qual foi necessária a realização da reanotação do genoma para que fosse possível selecionar os alvos do genoma do fungo. O genoma anotado e disponível de *M. cannonbalus* (ROBINSON et al., 2020) mostrou-se como um desafio para o sequenciamento e anotação.

Robinson et al. (2020) observaram que os conjuntos gênicos preditos (assemblies) de *Monosporascus* continham número substancial de contigs bacterianos de *Ralstonia pickettii*, provavelmente um endossimbionte fúngico. Essa observação é confirmada pelos estudos biológicos e ecológicos desse fungo, onde foi observado que componentes biológicos sugerem que microrganismos como bactérias e actinomicetes poderiam estar envolvidos na indução da germinação de ascósporos de *M. cannonballus* (SALES JÚNIOR et al., 2018), o que se refletiu na biodiversidade do gênero *Monosporascus*. Constantemente há relato da presença de novas espécies pertencentes a esse gênero, que representa um grupo de fungos importantes na agricultura e amplamente distribuídos em ecossistemas áridos naturais. Das nove espécies descritas, duas (*M. cannonballus* e *M. eutypoides*) são importantes patógenos nas raízes de membros de Cucurbitaceae em ambientes agrícolas. Levantamentos recentes realizados no nordeste do Brasil também resultaram na descrição de cinco novas espécies de *Monosporascus*: *M. brasiliensis*, *M. caatinguensis*, *M. mossoroensis*, *M. nordestinus* e *M. semiaridus* (NEGREIROS et al., 2019). Em virtude de toda essa diversidade biológica, esse grupo carece de mais estudos genômicos e pós-genômicos como esse.

3.2 Seleção de alvos no genoma de *Macrophomina phaseolina*

A seleção de proteínas alvo a partir do genoma de *M. phaseolina* resultou no elenco de dez proteínas alvo. A figura 3 representa o processo de filtragem e seleção de alvos. A partir de 30.226 proteínas, foi separado 12.745 proteínas com tamanho maior que 400 aminoácidos.

Destas, separou-se proteínas hipotéticas, putativas, com função nuclear, de membrana, com anotação de receptor/transportador, actinas, proteínas mitocondriais ou ligantes ao DNA e RNA, resultado 3.897 sequências que foram usadas para buscar estruturas semelhantes usando o *software* BLASTP e o banco de dados PDB. Destas, 243 proteínas tiveram estruturas similares encontradas no PDB, contudo apenas 10 dessas proteínas foram elencadas como potenciais alvos, em decorrência do número de cópias e homologia com organismos não alvo.

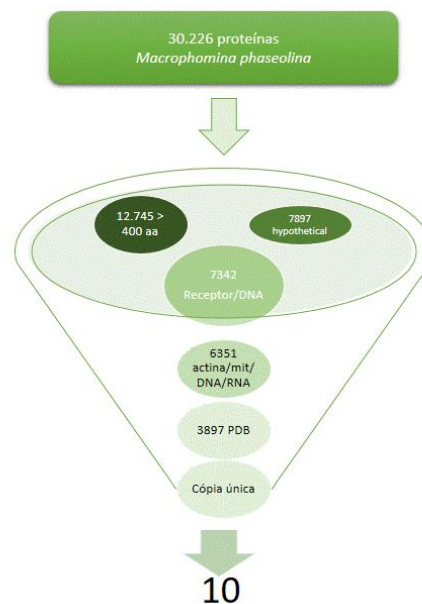


Figura 3: Esquema representativo dos resultados da seleção de potenciais alvos moleculares do genoma de *Macrophomina phaseolina*.

A Tabela 3 apresenta a lista de proteínas elencadas como potenciais alvos moleculares do genoma de *M. phaseolina*. As proteínas candidatas possuem função conhecida e são essenciais para a vida do fungo, de modo que o desenho de inibidores específicos pode inibir processos importantes do ciclo celular e, portanto, impedir o crescimento do fungo na planta. Foram identificadas proteínas como a thioredoxin reductase, mevalonate kinase, glutamyl-tRNA synthetase, dentre outras. A modelagem molecular por homologia mostrou estruturas globulares de enzimas.

Tabela 3 - Potenciais proteínas alvo selecionados do genoma de *Macrophomina phaseolina*.

Sequência busca	Sequência identificada	Função	e-value	Score	similaridade %	Referência
XP_747207 .1	KAH70253 98.1	acetyl-CoA acetyltransferase	e- 15 3	530	69	Zhang et al. (2020)
sp Q00310. 1	EKG16744. 1	Glycolipid 2-alpha- mannosyltransfe rase 1	e- 12 9	448	59	Yin et al. (2021)
XP_748918 .1	KAH70650 87.1	stearic acid desaturase (SdeA)	0.0	764	83	Wang et al. (2021)
XP_753861 .1	EKG12013. 1	mitochondrial ferrochelataze	0.0	700	77	Molina et al. (1989)
XP_750449 .1	KAH70521 78.1	phosphatidate cytidyltransfer ase	0.0	654	73	Yang et al. (2020)
XP_751695 .1	KAH70510 31.1	saccharopine dehydrogenase Lys9	7e- 17 8	610	69	Kingsbury et al. (2004)
XP_755457 .1	KAH70476 29.1	UDP-N-acetyl- glucosamine-1- P transferase Alg7	6e- 17 9	614	65	Dudgeon et al. (2008)
XP_752047 .1	KAH70282 90.1	Phosphomevalo nate kinase	e- 15 5	534	57	Li et al. (2019)
XP_747977 .1	EKG18740. 1	S- adenosylmethio nine decarboxylase	0.0	632	63	Mo et al. (2016)
	KAF430094 6.1	histidine kinase	0.0	632	78	Motoyama et al. (2005)

O genoma foi sequenciado e montado, estimando o genoma em ~49 Mb em 15 super-scaffolds cobrindo 92,83% do genoma de *M. phaseolina*, foram preditas 14.249 janelas abertas de leitura aberta (ORFs), dos quais 9.934 são proteínas validadas pelo transcriptoma (ISLAM et al., 2012). O genoma anotado mostrou abundância de oxidases, peroxidases e enzimas hidrolíticas secretadas para degradar polissacarídeos e lignoceluloses da parede

celular para penetrar no tecido hospedeiro. Para superar a resposta de defesa da planta hospedeira, *M. phaseolina* codifica um número significativo de P450s, transportadores de membrana do tipo MFS, glicosidases, transposases e metabólitos secundários em comparação com todas as espécies de ascomicetos sequenciadas (ISLAM et al., 2012). Um conjunto notavelmente distinto de esterases de carboidratos (CE) está presente no genoma de *M. phaseolina*. Esse fungo apresenta dados genômicos bem estruturados. Quando comparado com *M. cannonballus*, acredita-se que deve ser a ampla gama de hospedeiro do *M. phaseolina* caracterizando-o como fungo polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas, em especial culturas de grande impacto econômico, como soja (*Glycine max* L) e milho (*Zea mays* L.) (FARR; ROSSMAN, 2018; ISHIKAWA et al., 2018).

Mais recentemente, o genoma do isolado *M. phaseolina* foi estudado, revelando 22 contigs com um N50 de 4.257.441 pb, 99,3% de referência completa de ortólogos universais de cópia única e 14.471 genes (PURUSHOTHAM et al., 2020). Essas informações são importantes, pois permitem a análise pós-genômica, que traz a possibilidade de pesquisar especificamente um alvo que esteja presente em muitos ou apenas em vários genomas de fungos, ou seja, projetar um composto inibitório que deve ser ativo contra ampla gama de organismos, ou um que deve funcionar como uma 'bala mágica' contra determinado patógeno, além disso, a comparação de sequências com o crescente banco de dados de genes de organismos não alvo pode eliminar potenciais efeitos indesejados e/ou tóxicos (MARTINS et al., 2016).

3.3 Modelagem Molecular das proteínas alvo

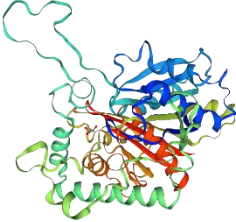
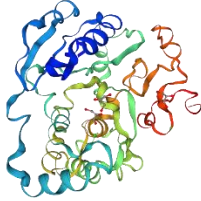
Tanto para *M. cannonballus* quanto para *M. phaseolina* foi possível elencar a modelagem molecular de alguns dos alvos (Tabela 4). Segundo Martins et al. (2016), a Modelagem por homologia tem se mostrado eficiente para a aquisição de modelos 3D teóricos razoáveis, tão logo um alinhamento de sequência adequado exista entre as sequências dos templates e a query.

Em termos de desenvolvimentos de agentes fungicidas, existem inúmeras possibilidades de potenciais alvos de drogas codificados em genomas que incluem proteínas de membrana externa, fatores de interação com o hospedeiro, permeases, enzimas de metabolismo intermediário, sistemas para replicação, transcrição e reparo de DNA, aparelhos de tradução e muitos mais. Todas essas possibilidades podem e devem ser exploradas para

obter combinações multifacetadas abrangentes de formas de controle que combateriam efetivamente os patógenos (BRESSO et al., 2016; MARTINS et al., 2016).

A indústria tem empregado cada vez mais métodos modernos de química, incluindo modelagem molecular, como ferramentas poderosas para o estudo das relações estrutura-função. A integração de métodos *in silico* e experimentais tem proporcionado o entendimento atualizado dos aspectos do reconhecimento intermolecular de forma a elucidar mecanismos e indicar melhorias na eficácia de novas moléculas (BRESSO et al., 2016; MARTINS et al., 2016). Assim, os métodos de design de drogas baseados em estrutura (SBDD) são um componente proeminente da química moderna. A integração dessas abordagens tem sido empregada com sucesso em uma série de investigações de dados estruturais, químicos e biológicos, o que permite a exploração dos genomas de patógenos, melhorando o poder preditivo na identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de fungicidas para o controle desses patógenos.

Tabela 4 - Modelagem molecular de alguns dos alvos *Macrophomina phaseolina* e *M. cannonballus*.

Código de Acesso	Função	Estrutura
KAH7025398.1	Acetyl-CoA acetyltransferase MSNLPVYIVSAVRTPVGMFQGSLSLSAVQLGSHAIKASVERAGIKSEDVEEV FFGNVLSANLGQNPARQCALGAGLSEATVATTVNKVCASAMKAILGAQTIIT GNAEIVVAGGTESMSNVPHYLPNMRTGAKFGDQKLV DGV LKDGLTDVYKTE HMGLQGELCASEHGFSREDQDDY CIRSYKKAQAAQENGWFKDEIAPIEVSGG RGKPNVVVDKDDEPKNFNEAKTKTLKPSFLPGTGTVTAANASPLSDGAAAVV LASEEAVKKHGLKPIAKIRGWGDAARDPSRFTIAPSLAMPKALKHAGVDISAV DAFEINEAFSVVALANMKLCGITEDKVN LHGGAVAIGHPLGCSGARIVTTLIGV LRQKNGKIGAAGICNGGGGASAIVIEALQ	
EKG16744.1	Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase Kre2p/Mnt1p MAGTQRYMRYIVFAFVVLLLIFFSSSDVPTSR LQSASEI KEQGS KWKGSGAA TEPGSKEVPAVNAPGHSGSSSQSTTPNTPTQLTGTMPGERMNATFVTLARNSD VWEIARSIRQVEDRFNRKFNYDWVFLNDAEFDETFIRVT TSLVSGKTKY GKIDT DQWSFPPWIDTNKAAKVRDEM KQKQIIYGDSISYRHMCRYESGFFFRHPLMM DYEWYWRVEPSIELFCDINYDTFKFMADHGKKYSFVLSLYEYVETIPTLWDSV KGF MQYPQHIAKDNSMAFLSDDD GKTYNHCHFWSNFEIGNLNWLR SQAYID FFEHL DHDGGFFYERWGDAPVHSIAAGLMLNKNELHFFDDIAYYHVPFTHCPT SEKTRTDNKCHCNP GDNFDWNGYSCTARFFEVNMEKPEGYEQQ	

KAH7065087.1

4ymk.1.A Acyl-CoA desaturase

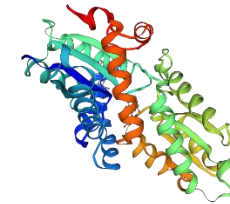
MAKISEPNCSSKYDPNKKHYTEYPMTRQNWYKHAVNWLNTFLVIGIPLMGCIAT
 FWTPLNFKTICWSILYYYWTGLGITAGYHRLWAHTSYKATLPLKIFLAAVGGG
 AVEGSIRWWSRDHRAHHRYPDTDKDPYSVRKGLLYAHFGWMIMKQNPKRIG
 RTDISDLNDDPVVVWQHRNYLKVVFFMGLIFPTLIAGLGWGDWWGGFIYAGI
 LRLFFLQQATFCVNSLAHWLGDQPFDDRNSPRDHVLTALVTFGEGYHNFHHE
 FPSDYRNAIEWFQYDPTKWCWWTWKQLGLAYELKQFRANEIEKGRVQQAQKK
 LNKKRDKLDWGIPLEQLPVM EWDDYIEQAKNGRSLITVAGVIHDVTGFIQDHP
 GGKAMIKSGIGKDV TAMFNGGVYDHSNAAHNLLSTMRVGVIRGGCEVEIWK
 RANCEEKNA



EKG12013.1

Ferrochelatase, mitochondrial

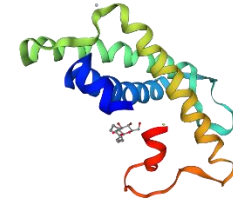
MSLRAPVARLSKRASPAHISKFTATPPSSLWQRSQQDVSQSQRNLATVPPVTQ
 NATSSKGPTAMVFMNMGGPSTTDEVGDFLSRLFSADLIPLGRLQNILGPFISK
 RRTPKIQQYADIGGGSPIRKWSEYQAAEMCKILDEISPATAPHKPYVAFRYAN
 PLTEEMYNKLFEDGFGKGRGGRAVAFTQYPQYSCSTTGSSLNELWKWRSRLE
 GKRA GDGVSEPEGSITWSVIDRWVHPGLVEAFAQNEATLKEFPAETRDQVII
 LFSAHSLPMSVVNRGDPYPAEVAATVYAVMQRLGMKNPYRLVWQSQVGP
 SA WLGAQTS DTVSNFIKKGQKDM LLVPIAFTSDHIETLFELDREIHDAT EEGNV
 KRAESLNGSPVFIQALADIAKAHLDSGLACSKQMGLRCPACTSERCAESKRFF
 ASMQRDL



KAH7052178.1

Phosphatidate cytidylyltransferase

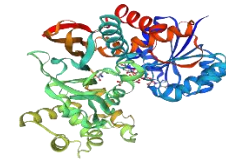
MTKPRRDVVKFQHRGSGSSGKRRMSMSELSEPHSEPGSPTRNGAAAKPEEPPK
 SDYEKKKETFITRTIWTLVMIAGFFWAMFAGHIYIIIIVTAVQIISFKEVIAISNVP
 SRARSLRFTKSLNWYFLGTTMYFLYGESVIYYFKHIIIVDKILLPFATHHRFISF
 MLYVTGFVFFVASLQKGHYKFQFTQFAWTHMALYLIVVQAHFIMNNIFEGMI
 WFFLPVSLVVTNDIFAYICGITFGRTQLIKISPKKTVEGFLGAWIFTIIFGVILTNIL
 MRKYFICPVNDLGANFFTGLECDVNPVFIPHKYRLPFIPPNWTHLPSTVTIAP
 MQFHILIFATFASLIAPFGGFFASGLKRTFKIKDFGDSIPGHGGMTDRMDCQFIM
 GFFAFMYSSFIAVYKASVGGVIEQAITGLTPDQQIEVVKGLSKHLVNQGVIPS
 NVLNYLSDELKRR



KAH7051031.1

Saccharopine dehydrogenase Lys9

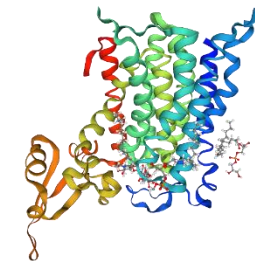
MDAIPPVTGSSQSILLLGSFVARPTAEILSESGFKVTVACRTLENAKKFSEGIK
 NATPISLDVSDDQALDAQVGKHALTISLIPYTHHATVIKSAIRNKKHVVTTSYV
 SPAMMELDADAKAAGITVMNEIGLDPGIDHLYAVKTIDEVHKAGGKITSFLSY
 CGGLPAPENSDNPLGYKFSWSSRGVLLALRNAAKYYQDGKVVVDVSSKDLMG
 TAKPYFIYPGYAFHPYKERYSIPEADTIIRGTLRFQGFPEFIKTLVDIGFLSDDEV
 DYLPKPGSTPLAWREVFKRVLGSSSDADTDLIWAISSKASFADNEEKTRIINGLR
 WIGMFSQDPVTPRGNPLDLCATLEKKMQYEEGERDMVMLQHKFGIEHADGT
 KEVRTSTLVEYGAPEGSGGYSAMAKLVGVPCAVAVKQVLNGAISEKGILAPM
 TPAINDPLIKELKEYGIEMKEKTIS



KAH7047629.1

-UDP-N-acetyl-glucosamine-1-P transferase Alg7

MAGTLRSGESLALLSLLAACIGILANTFQGDGEPLIASLAFSGIAFASCYALIRW
 LGAAFMRAGFKGRDLSKLNVEIPETMGAVCAVVYLFALLVFIPFPFYKDIVA
 ATSGGKNKDMLVQVQEVEVTRFLHRFPHNKLASYLSAILSQTIVLLGIGDDL
 FDIRWRHKILIPAFASIPMLTVYFVDFGVTKVVVPTPLRPYLGVLDDIGWLYYA
 YMAAISIFCPNSINILAGINGIEVSQSIIIALLLAFNDLLYLIPAPPGYPVPHPATD
 SHLFSLYLLLFIGVSAALLCHNWYPARVVFVGDYCYFAGMVFAVVGILGHFS
 KTLNLLIPQIANFLYSAPQLFHVVPCPRHRLPKFNRSTGLLEPSVVVFAEQKKP
 LRPVVAEALKVLHKLKLVVRVKTDEQGNVLESTNLTILNLWLWVFGPMREDRL

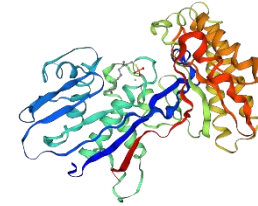


AMGLCALQVACGALGLWIRHRLALLVFTQDNWFV

EKG19287.1

Phosphomevalonate kinase

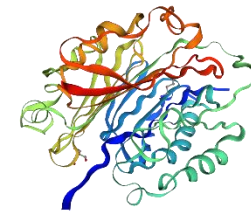
MASANPAVAVSAPGKVLLAGGYLVLDGRFNGLVFGLSARIHVLVRPLATGSG
 VSLSEIIVKSPQFIGATWEYGYRLTELGGGIEVTQLRARATEALHRNPFVETALS
 YALTYISAITPQRIEPASVTILADNDYYSAGPGDVQAPGERFKSFNVPLWEAHK
 TGLGSSAALVTAFTVGAISHYLPEDVFSLKTEVGKLRRLHNLAQAAHCAAQGK
 VGSGFDVASAVFGSCLYRRFSPSLLSAHGEPGAAGFADALRNLVDEKDPSRK
 WDTVITKSAVKVPDGIRLVMCDVDCGSQTPGMVKKVLAWRQEKAEEANAL
 WSLQKSNEALAAELVNLTESKSQDYGTLKNCIAEIRRLIREMSSQSGVPIEPAE
 QSALLDACSQIPGVIGGVVPGAGGYDAVSLIEDRPDVVEKLLQQLLRGWKVDV
 TAGGVSIGRVSMGLGVREEMEGVRLEGAATYGRWAQ



EKG18740.1

S-Adenosylmethionine Decarboxylase

MVAEIPKNYTSSPSSYYGTPHLTINREATIDLDSTNAFEGPEKLELVWFSPSATM
 LPASAQPNGLKSVPADTWKEMLDLVNCKVLSIVESQDVDAYLSESSMFVWP
 HKLVLKTCTGTTLLYGLPRMLEIAALSAGFPGVPANLPKGIPAAATPYRVFYSR
 KNFLFPDQQRGPHRSWRDEVKFLDKMFIGGSAYMIGKMNGEHWYLYITGPDT
 RLTPPSTPDSERNPETETKYLNVPQRMVAGAATDEAQDETLEVLMTDLDEENA
 RQFYLEDASAVAEGRYFQKAREARKNAIKSLGIIHEEGSAESSLAGSTLLNGSS
 NNNDNFDVFEQTSSDHSGFSDASEDDLTFPEELTTEGHTLGTVVSESCGLSDV
 YPTSKYDPARIDAYLFTPCGFSANGVIPAPGGPNGTDATHYFTVHVTPPEQCSY
 ASFETNVPARQSGRETADIVEQVVKIFKGRFSVTLFEAKPAEDELASAAKRS
 ARMDSIKGYKRVDRIHDLGDYDLVFRYYERFDWKGGAPRLGENGY



4 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, conclui-se que:

1. Foram reanotados 17.518 genes de *M. cannonballus* e 30.223 genes analisados de *M. phaseolina* por meio de análise bioinformática;
2. Foram identificadas 23 novas proteínas alvo a partir da análise genômica de dois fungos causadores de doenças em meloeiro, sendo 13 para *M. cannonballus* e 10 para *M. phaseolina*;

O presente estudo abre perspectivas para a geração de conhecimento sobre a função molecular das proteínas alvo, por meio da validação experimental de novos inibidores.

REFERÊNCIAS

AARON J. R.; DONALD, O. N.; PATRICK, S. G. C. Genomic Analysis of Diverse Members of the Fungal Genus *Monosporascus* Reveals Novel Lineages, Unique Genome Content and a Potential Bacterial Associate. **G3 Genes/Genomes/Genetics**, v. 10, n. 8, p. 2573–2583, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/g3.120.401489>. Acesso em: 10 mar. 2022.

ABADIO, A. K. R. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. **BMC Genomics**, 12, 75, 2011.

ATANASOVA, V et al. Computational Strategy for Minimizing Mycotoxins in Cereal Crops: Assessment of the Biological Activity of Compounds Resulting from Virtual Screening. **Molecules**, 27, 258, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27082582>. Acesso em: 11 mar. 2022.

BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 278, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>. Acesso em: 10 mar. 2022.

BEREKETOGLU, C., ARGAS, K. Y., ERASLAN, S., MERTOGLU, B. (2017). Genome reprogramming in *Saccharomyces cerevisiae* upon nonylphenol exposure. **Physiological Genomics**, 49(10), 549-566.

BOUZ et al. Inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases as antimycobacterial compounds: An up-to-date review- JO - **Bioorganic Chemistry** 110, 202, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg>. Acesso em: 10 mar. 2022.

BRESSO, E. et al. Structure-Based Virtual Screening of Hypothetical Inhibitors of the Enzyme Longiborneol Synthase—A Potential Target to Reduce Fusarium head blight disease. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, p. 163-176, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-016-3021-1>. Acesso em: 13 mar. 2022.

DAFNA et al. Identification and characterization of haemofungin, a novel antifungal compound that inhibits the final step of haem biosynthesis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 946–952, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv446>. Acesso em: 20 mar. 2022.

DO, E. et al. The lysine biosynthetic enzyme Lys4 influences iron metabolism, mitochondrial function and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 477, 4, p. 706-711, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.123>. Acesso em: 18 mar. 2022.

DUDGEON, D.D. et al. Nonapoptotic Death of *Saccharomyces cerevisiae* Cells That Is Stimulated by Hsp90 and Inhibited by Calcineurin and Cmk2 in Response to Endoplasmic Reticulum Stresses. **Journals Eukaryotic Cell**. v. 7, n. 12, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00291-08>

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA**. 2018. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>. Acesso em: 13 mai. 2022.

ISHIKAWA, M. S. et al. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 38-44, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sp/v44n1/0100-5405-sp-44-1-0038.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2022.

ISLAM, M.S., et al. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, 13, 493, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-493>. Acesso em: 10 mar. 2022.

KINGSBURY, J. M. et al. Novel Chimeric Spermidine Synthase-Saccharopine Dehydrogenase Gene (SPE3-LYS9) in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **American Society for Microbiology**, 3, 3, 2004.

LADO, J. P. et al. Early differential expression of galactomannan biosynthesis genes in ‘Makapuno’ coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by the de novo assembly and analysis of endosperm transcriptome. **Philipp Agric Sci**, v. 102, p. 6-24, 2019.

LI, C.; HE, Q.; ZHANG, F.; YU, J.; LI, C.; ZHAO, T.; ZHANG, Y.; XIE, Q.; SU, B.; MEI, L.; ZHU, S.; CHEN, J. Melatonin enhances cotton immunity to *Verticillium* wilt via manipulating lignin and gossypol biosynthesis. **Plant J.**, v. 100, n. 4, p. 784-800, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.14477>. Acesso em: 19 mar. 2022.

LIEBMANN, B. et al. Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. **Arch. Microbiol.**, v. 181, p. 378–383, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0667-3>. Acesso em: 19 mar. 2022.

LIMA, J. D. **Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura**. 2020. 51f. Dissertação Mestrado em Ciência de Materiais) - Universidade de Brasília. Brasília, 2020. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/39017/1/2020_JonathanDiasdeLima.pdf. Acesso em: 30 mar. 2022.

LIU, C.; LI, X.; YANG, R. *et al.* The protective roles of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene in melon resistance to powdery mildew infection. **Hortic. Environ. Biotechnol.**, v. 55, p. 557–567, 2014.

MARTINS, N. F *et al.* Searching for Novel Targets to Control Wheat Head Blight Disease— I-Protein Identification, 3D Modeling and Virtual Screening. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 811-830, 2016. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.611079>

MO, H. J.; SUN, Y. X.; ZHU, X. L. *et al.* Cotton S-adenosylmethionine decarboxylase-mediated spermine biosynthesis is required for salicylic acid- and leucine-correlated signaling in the defense response to *Verticillium dahliae*. **Planta**, b. 243, p. 1023–1039, 2016.

MOLINA, R *et al.* Liver ferrochelatase from normal and hexachlorobenzene porphyric rats. Studies on their properties. **Int. J. Biochem.**, v. 21, n. 2, p. 219-25, 1989.

MOTOYAMA, T.; KADOKURA, K.; OHIRA, T.; ICHIISHI, A.; FUJIMURA, M.; YAMAGUCHI, I.; KUDO, T. A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, Issue 3, p. 200-212, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.11.002>. Acesso em: 30 mar. 2022.

NEGREIROS, A. M. P. *et al.* Prevalent weeds collected from cucurbit fields in Northeastern Brazil reveal new species diversity in the genus *Monosporascus*. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 3, p. 349-363, 2019. <https://doi.org/10.1111/aab.12493>

NES W. D *et al.* Sterol 24-C-methyltransferase: An enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 481, Issue 2, p. 210-218, 2009.

POLLACK, F. G., UECKER, F. A. *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia**, v. 66, p. 346– 349, 1974.

POONAM G. *et al.* Curam Sreenivasacharlu Sundaram, Puranam Usha Sarma, In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. **Medical Mycology**, v. 54, Issue 5, p. 524–536, jul. 2016

PURUSHOTHAM, N. Draft Genome Resource for *Macrophomina phaseolina* Associated With Charcoal Rot in Sorghum. **Scientific Societies**. 33, 5, 2020.

ROBINSON, A. J.; NATVIG, D. O.; CHAIN, P. S. G. Genomic analysis of diverse members of the fungal genus *monosporascus* reveals novel lineages, unique genome content and a potential bacterial associate. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 2573–2583, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/g3.120.401489>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SALES JÚNIOR *et al.* Podridão de raízes por *Monosporascus* e declínio de ramas no meloeiro: grave problema sem solução. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (org.). **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 111-130.

SALES JUNIOR, R. et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 195-198, jan.-mar. 2012.

SAVOIE, J. M. Using mushroom-forming fungi in preventing and reducing mycotoxins in cereal products. **Sci. fungorum** [online], v. 49, e1256, 2019. Epub 23-Abr-2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1256>. Acesso em: 10 mar. 2022.

TABATABAEE, S.; IRANBAKHS, A.; SHAMILI, M.; ARDEBILI, Z. O. Copper nanoparticles mediated physiological changes and transcriptional variations in microRNA159 (miR159) and mevalonate kinase (MVK) in pepper; potential benefits and phytotoxicity assessment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, Issue 5, 2021.

WALTER, M. W. Structure-based design of agrochemical. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 3, p. 278-291, 2002.

WANG, Y., LIN, W., YAN, H., NENG, J., ZHENG, Y., YANG, K., XING, F. AND SUN, P. iTRAQ proteome analysis of the antifungal mechanism of citral on mycelial growth and OTA production in *Aspergillus ochraceus*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 101, p. 4969-4979, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11140>. Acesso em: 11 mar. 2022.

WANG, Y.; WANG, S.; ZENG, L.; HAN, Z.; CAO, J.; WANG, Y.; ZHONG, G. Long-chain unsaturated fatty acids are involved in the viability and itraconazole susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 585, 2021, 82-88, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.033>. Acesso em: 23 mar. 2022.

YANG, Q. et al. "Protein Expression Profile and Transcriptome Characterization of *Penicillium expansum* Induced by *Meyeromyces guilliermondii*". **Journal of Food Quality**, v. 2020, 12 pages, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/8056767>. Acesso em: 15 mar. 2022.

YIN, Q.; YANG, R.; REN, Y.; YANG, Z.; LI, T.; HUANG, H.; TANG, Q.; LI, D.; JIANG, S.; WU, X.; WANG, D.; CHEN, Z. Transcriptomic, Biochemical, and Morphological Study Reveals the Mechanism of Inhibition of *Pseudopezizomyces camelliae-sinensis* by Phenazine-1-Carboxylic Acid. **Front. Microbiol.**, 12:618476, 2021.

ZHANG, Y.; WEI, W.; FAN, J.; JIN, C.; LU, L.; FANG, W. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial acetyl coenzyme A acetyltransferase as an antifungal target. **Appl. Environ. Microbiol.**, 86:e02986-19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02986-19>. Acesso em: 21 mar. 2022.

CAPÍTULO III

Nanotecnologia e desenvolvimento de novos fungicidas para controle de *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro

RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) apresenta importância socioeconômica nacional, com destaque para a região Nordeste. Essa produção cada vez mais intensa tem agravado os problemas fitossanitários da cultura. Dentre os patógenos mais importantes, estão *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*, agentes causais da podridão de raízes e declínio de ramas. Para ambos, o manejo cultural prevalece já que o uso de agrotóxicos, além de contribuir negativamente para os impactos ambientais, é pouco eficiente no controle. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoformulações (NF) para controle desses patógenos por meio do uso de fungicidas recomendados em outros países, EUA e Israel, em associação com diferentes concentrações das nanopartículas (NP). A NP utilizada foi gerada pela Empresa KrillTech® e está em submissão de patente. Nos bioensaios para avaliações, foi considerado o crescimento micelial (CM), por meio da inibição (ICM). No bioensaio com o Maxim (0,1ppm) associado às concentrações da NP 20, 60, 180, 540, 1260 mg/L, observou-se ICM 100% para controle do *M. cannonballus*. Para bioensaio com fungicida Graduate A+ (1ppm) associado a NP nas concentrações 100, 400, 800, 1200, 1600 mg/L, o ICM apresentou valores de 98,93 a 100%. Com esses resultados, observou-se que a associação com a NP possibilitou controlar ambos os patógenos com uma concentração dos fungicidas mais de 200 mil vezes inferior à dosagem recomendada. Portanto, a NP tem potencial como facilitador da ação dos fungicidas no controle de ambos os patógenos e é um NF capaz de agir como novos fungicidas, *in vitro*.

Palavra-chave- Nanopartícula. Nanocompostos. Fungos fitopatogênicos. Controle de doenças de plantas.

ABSTRACT

The melon tree (*Cucumis melo* L.) has national socioeconomic importance, especially in the Northeast region. This increasingly intense production has aggravated the crop's phytosanitary problems. Among the most important pathogens, are *Monosporascus cannonballus* and *Macrophomina phaseolina*, causal agents of root rot and vine decline. For both, cultural management prevails since the use of pesticides, in addition to contributing negatively to environmental impacts, is inefficient in control. The objective of this work was to develop nanoformulations (NF) for these pathogens through the use of fungicides recommended in other countries, USA and Israel, in association with different concentrations of nanoparticles (NP). The NP used was generated by the KrillTech® Company and is in patent submission. In the bioassays for evaluations, mycelial growth (CM) was considered through inhibition (ICM). In the bioassay with Fdx (0.1mg/L) associated with concentrations of NP 20, 60, 180, 540, 1260 mg/L, 100% ICM was observed to control *M. cannonballus*. For bioassay with Azx + Fdx (1mg/L) associated with NP at concentrations: 100, 400, 800, 1200, 1600 mg/L, here the ICM presented values from 98.93 to 100%. With these results, it was observed that the association with NP made it possible to control both pathogens with a concentration of fungicides more than 200 thousand times lower when compared to the recommended dosage. Therefore, NP has potential as a facilitator for the action of fungicides in the control of both pathogens and it is an NF capable of acting as new fungicides, *in vitro*.

Keywords: Nanoparticle. Nanocompounds. Phytopathogenic fungi. Plant disease control.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é a área em que se cria, caracteriza, desenvolve e aplica estruturas, materiais, dispositivos e técnicas por meio do controle da matéria em nível nanométrico (10^{-9} metro). Esta é uma nova tendência da ciência que está sendo utilizada mundialmente para solucionar problemas em diversas áreas, como agricultura, medicina, indústria farmacêutica, entre outros (PODDAR, 2018), trazendo uma abordagem disruptiva para o controle de doenças em plantas e se apresentando como importante fonte de inspiração para a geração de novos produtos, bem como para a síntese de novas substâncias com melhor atividade (KRANJC; DROBNE, 2019).

Novas abordagens em nanotecnologia vêm se destacando como instrumento em prol da fitossanidade. Em linhas gerais, a nanotecnologia oferece alternativa promissora no gerenciamento de doenças de plantas e possui muitas vantagens sobre produtos e abordagens convencionais, associados à eficácia aprimorada, entrada reduzida e menor ecotoxicidade. Adicionalmente, os produtos naturais aliados ao desenho racional de bio defensivos consolidam-se como estratégia eficaz no desenvolvimento de novas moléculas, graças à crescente necessidade de novos produtos (LIU et al., 2019).

Atualmente, a aplicação da nanotecnologia é a forma mais conveniente, simples e ecologicamente correta para aumentar a produtividade de diversas culturas e simultaneamente reduzir o uso de produtos químicos tóxicos, minimizando os efeitos colaterais desses produtos. O grande desafio é o desenvolvimento da agricultura atual aliada a produção sustentável com aumento da produtividade. Assim, a nanotecnologia traz soluções para os problemas decorrentes do uso de pesticidas químicos tradicionais com o desenvolvimento de formulações em escala nano com agentes bioativos, os chamados nanobiopesticidas. Esses produtos mostram grandes vantagens por serem ambientalmente seguros, específicos para alvos, biodegradáveis e adequados aos programas de manejo integrado de pragas (MIP) (ZHAO et al., 2020).

Para o controle de uma doença em planta, as nanopartículas podem ser incorporadas e combinadas como um transportador de moléculas ativas (de origem natural ou artificiais) como um dos componentes da gestão integrada da doença (SHAH; WANI, 2016). Usando essa nanopartícula combinada ou incorporada a uma molécula, temos uma nanoformulação.

As nanoformulações permitem a absorção e liberação da substância ativa de maneira controlada, evitando aplicação de doses em concentrações muito elevadas, além de permitir o direcionamento do composto a sítios específicos. As nanopartículas funcionalizadas serão

veículo para disponibilização de compostos químicos para a planta visando ao controle das doenças de interesse (LIMA, 2020)

Os sistemas transportadores de compostos químicos são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde exercer o efeito, controlando a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química da molécula transportada (KUMAR et al., 2019).

Outra vantagem é a liberação estendida, onde a nanoformulação mantém o processo de liberação do químico por um período maior de tempo. O mecanismo de liberação do composto de interesse em dispositivos de liberação normalmente é controlado pela difusão, grau de inchamento, erosão ou estímulos externos, como pH, temperatura e presença de biomoléculas. Nos sistemas controlados pela difusão, o composto químico é liberado com base em um gradiente de concentração (KUMAR et al., 2019). Estes sistemas são normalmente baseados na Lei de Fick da difusão, embora alterações da composição do material e da geometria do dispositivo possam resultar em perfis de liberação não lineares.

Nas últimas décadas, a Revolução Verde promoveu aumento sensível na produção de alimentos com base no uso indiscriminado de insumos agroquímicos. As aplicações de pesticidas convencionais contribuíram para o surgimento da resistência e o consequente surgimento de pragas e a presença de resíduos tóxicos em alimentos. Além disso, a dependência de pesticidas sintéticos e sua aplicação indiscriminada são responsáveis por diversos efeitos prejudiciais ao meio ambiente (SAMURKAS et al., 2020). Estima-se que 90% dos fungicidas e pesticidas aplicados sejam perdidos e acumulados no meio ambiente e no solo (SAMURKAS et al., 2020).

O Nordeste brasileiro destaca-se com um percentual de 96,8% na produção do melão (*Cucumis melo* L.), sendo os estados do Rio Grande do Norte (RN) e o Ceará (CE) responsáveis por 73,19% dessa produção (IBGE, 2020). Nesses estados, a produção está atrelada ao uso de insumos agrícolas, sobretudo de agrotóxicos, e as práticas culturais adotadas têm sido responsáveis por causar problemas fitossanitários (BRUTON et al., 1998; FIGUERÊDO et al., 2017; SALES JÚNIOR et al., 2018), que são os principais fatores que inibem a expansão da cultura, dentre os principais patógenos os fungos *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*, que ocasionam doenças radiculares no meloeiro, conhecidas como podridão do colo ou cancro-seco do meloeiro (*M. phaseolina*) e podridão de raízes por e declínio de ramas (PRMDR) em meloeiro (*M. cannonballus*).

A ausência de método de controle eficiente e ecologicamente seguros tem sido preocupante, pois esses patógenos são um dos principais problemas no agronegócio do melão.

Portanto, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma nova forma de controle para esses patógenos por meio de nanoformulações funcionalizadas com os dois fungicidas comerciais, cujo princípio ativo é fludioxonil e azoxistrobina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Síntese e caracterização da nanopartícula

A nanopartícula (em submissão de patente) utilizada como transporte de entrega facilitada foi desenvolvida pelo método da síntese hidrotermal e foi gerada pela Empresa KrillTech® a partir da *Startup* entre Universidade de Brasília (UnB) e Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil.

Caracterização da nanopartícula

A caracterização das nanopartículas foi realizada a partir de suas características físico-químicas, avaliando-se o tamanho de partícula, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão.

Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRMET)

As imagens de HRMET foram realizadas utilizando um microscópio de alta resolução da marca ZEISS. Uma gota da nanopartícula na concentração de 20mg/L foi depositada sobre a grade própria para MET, retirando-se o excesso com papel de filtro após três minutos. Em seguida, uma gota do contrastante, ácido fosfotúngstico, foi adicionada; após três minutos, o excesso foi removido. As grades prontas foram encaminhadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão e visualizadas sob velocidade de aceleração de elétrons de 80 Kv em aumentos acima de 5000x, para que detalhes da morfologia ficassem visíveis.

Potencial Zeta e Tamanho da partícula

Estas medidas foram determinadas utilizando-se um equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malverne Instruments, UK). As análises do potencial zeta e tamanho de partícula foram realizadas com alíquotas das suspensões aquosas das nanopartículas na diluição de 20 mg/L.

Bioensaios com as nanoformulações

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no Centro de Pesquisa da Embrapa em Agroindústria Tropical - CNPAT, em Fortaleza, Ceará, tendo sido repetidos duas vezes.

Variável Avaliada nos Bioensaios

Foi estimada a taxa de Inibição do Crescimento Micelial (ICM), variável que foi submetida à ANOVA, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS®. Para o cálculo do ICM, foi realizada a medição do micélio fúngico, quando findaram os sete dias de incubação, utilizando um paquímetro digital. Assim, foi possível estimar a taxa de ICM em porcentagem por meio da fórmula abaixo:

$$\text{ICM}(\%) = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} / \text{diâmetro da testemunha}) \times 100$$

%

Avaliação do nanoformulado no controle do *M. cannonballus*

O isolado fúngico utilizado, *M. cannonballus*, foi coletado a partir das raízes de meloeiro cultivados em campos de produção no estado do Rio Grande do Norte-RN. Esse isolado pertence ao Laboratório Fitopatologia II da UFERSA com identidade previamente confirmada por técnicas moleculares (NEGREIROS et al., 2019), cuja sequência foi depositada no GenBank, código JQ 762366, e depositada também na Coleção de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, PE, Brasil), código CMM 2429. Antes do uso, esse isolado foi cultivado em placas de Petri em Meio ágar batata dextrose (BDA) comercial (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 28°C no escuro por sete a dez dias.

O fungicida utilizado tem como nome comercial Maxim® da empresa Syngenta, fungicida de contato, protetor com ação de profundidade, usado em tratamento de sementes, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 05397, indicado para tratamento de sementes das culturas: algodão (*Gossypium arboreum* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) batata (*Solanum tuberosum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.) no controle dos seguintes patógenos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* *Macrophomina phaseolina* *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* tendo como princípio ativo fludioxonil -4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl) pyrrole-3-carbonitrile na concentração 25 g/L.

Padronização da dose resposta do Maxim®

Para execução desse experimento, foi utilizado meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) comercial (39g/L). Após autoclavagem a 120°C por 15min, era adicionado ao meio o Maxim, agitado lentamente, sendo vertidos 20mL na placa de petri, prosseguindo com depósito dos discos de micélio do *M. cannonballus* com 5mm de diâmetro posicionadas no centro da placa e, em seguida, acondicionada em estufa incubadora BOD a 28°C no escuro durante sete dias, quando se realizou a medição do tamanho micelial. Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 25 parcelas experimentais, o experimento foi repetido duas vezes. Cada tratamento correspondeu a diferentes concentrações do fungicida, assim sendo: Tratamento 1 (T1): 0,1ppm do Maxim; Tratamento 2 (T2): 1ppm do Maxim; Tratamento 3 (T3): 10 ppm do Maxim; Tratamento 4 (T4): 50ppm Maxim; Tratamento 5 (T5): testemunha, sem fungicida e apenas com fungo.

Validação da ação do nanofórmula na inibição *in vitro* do *M. cannonballus*

Para execução desse experimento, foi adotada a mesma metodologia descrita na avaliação da dose resposta do Maxim, havendo uma etapa a mais que correspondeu a adição da nanopartícula. Assim, após autoclavagem a 120°C por 15min, era adicionado ao meio o Maxim, nanopartícula. Em seguida, agitou-se lentamente e verteu-se 20mL na placa de petri, prosseguindo com depósito dos discos de micélio do *M. cannonballus* com 5mm de diâmetro posicionadas no centro da placa que foi acondicionada em estufa incubadora BOD a 28°C no escuro durante sete dias, quando se realizou a medição do tamanho micelial. Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com doze tratamentos e cinco repetições, totalizando 60 parcelas experimentais, havendo duas repetições.

Cada tratamento correspondeu a diferentes concentrações da nanopartícula com associação ou não com Maxim®, assim sendo: Tratamento 1 (T1): 1.620 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 2 (T2): 540 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 3 (T3): 180 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 4 (T4): 60 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 5 (T5): 20 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 6 (T6): 1.620 mg/L Nanopartícula; Tratamento 7(T7): 540 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8(T8): 180 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 60 mg/L

Nanopartícula; Tratamento 10(T10): 20 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11(T11): 0,1 ppm Maxim; Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, testemunha, apenas o fungo.

Avaliação do nanoformulado no controle do *M. phaseolina*

O isolado fúngico utilizado, *M. phaseolina*, foi coletado a partir das raízes de meloeiro (*Cucumis melo* L.) pertencentes à Coleção de Culturas de fungos fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM), localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Para uso, esse isolado foi cultivado em placas de Petri em Meio ágar batata dextrose (BDA) comercial (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 28°C no escuro por sete a dez dias.

O fungicida utilizado tem como nome comercial Graduate A+ ® da empresa Syngenta, fungicida sistêmico, que possui dois princípios ativos: fludioxonil -4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl) pyrrole-3-carbonitrile e azoxistrobina methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy) pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate, ambos na concentração de 239g/L. Esta combinação de diferentes ativos faz parte de uma estratégia de gerenciamento de resistência. Esse fungicida é indicado para controle das infecções dos patógenos nos frutos, para as seguintes culturas e patógenos: Abacaxi/ Podridão-negra (*Ceratocystis paradoxa*), Banana/Antracnose (*Colletotrichum musae*); Citros/ Bolor-verde (*Penicillium digitatum*) Mamão/ Sarna (*Asperisporium caricae*) Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Manga/ Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*).

Padronização da dose resposta do Graduate A+ ®

Para execução desse experimento, foi utilizado meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) comercial (39g/L). Após autoclavagem a 120°C por 15min, era adicionado ao meio o Graduate A+, agitado lentamente e vertidos 20mL na placa de petri, prosseguindo com depósito dos discos de micélio do *M. phaseolina* com 5mm de diâmetro posicionadas no centro da placa e em seguida acondicionada em estufa incubadora BOD a 28°C no escuro durante sete dias, quando se realizou a medição do tamanho micelial. Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 25 parcelas experimentais, repetidas duas vezes. Cada tratamento correspondeu a diferentes concentrações do fungicida, assim sendo: Tratamento 1 (T1): 1ppm Graduate A+; Tratamento 2 (T2): 0,8 ppm Graduate A+; Tratamento 3 (T3): 0,6 ppm Graduate A+; Tratamento 4 (T4): 0,4 ppm Graduate A+; Tratamento 5 (T5): testemunha, sem fungicida e apenas com fungo.

Validação da ação do nanoformulado na inibição *in vitro* do *M. phaseolina*

Para execução desse experimento, foi utilizada a mesma metodologia do bioensaio de validação da ação nanoformulado para *M. cannonballus*, porém nesse experimento adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com doze tratamentos e cinco repetições, totalizando 60 parcelas experimentais, repetidas duas vezes.

Cada tratamento correspondeu a diferentes concentrações da nanopartícula com associação ou não com o fungicida, assim sendo: Tratamento 1 (T1): 1.600 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 2 (T2): 1.200 mg/L Nanopartícula +1 ppm Graduate A+; Tratamento 3 (T3): 800 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 4 (T4): 400 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 5 (T5): 100 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 6 (T6): 1 ppm Graduate A+; Tratamento 7 (T7): 1.200 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8 (T8): 800 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 400 mg/L Nanopartícula; Tratamento 10 (T10): 100 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11 (T11): 1.600 mg/L Nanopartícula; Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, Testemunha, apenas o fungo.

3 RESULTADOS

Caracterização das Nanopartículas

Na microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, foi possível observar com aumento de 85.000 vezes um conglomerado de partículas, sendo umas funcionais e outras agregadas, com aparência disforme, alongada e heterogênea. A partícula funcional tem tamanho entre 10-50nm. (Figura 1); o potencial zeta apresentou valores de potência de -17,8mV (Figura 2) e no tamanho da partícula observou-se no gráfico (Figura 3) dois picos de tamanho, sendo um abaixo de 100nm, que corresponde ao tamanho da partícula funcional e outro pico próximo a 1.000nm, correspondendo ao tamanho das partículas agregadas.

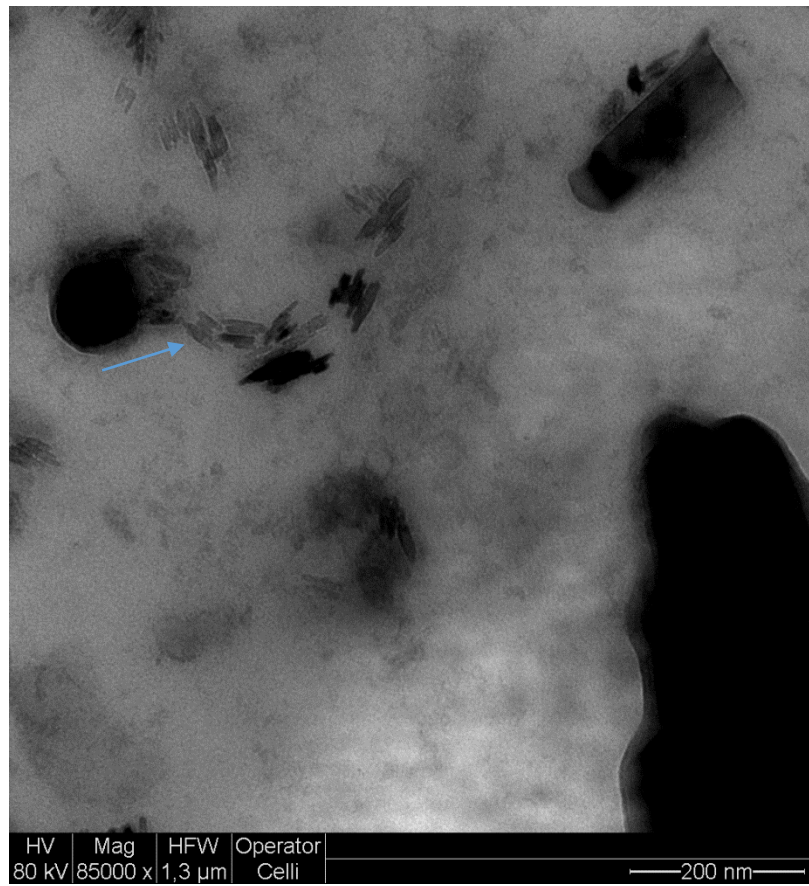


Figura 1- Imagem da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da nanopartícula na concentração de 20mg/L. Nanopartícula alongada (seta).

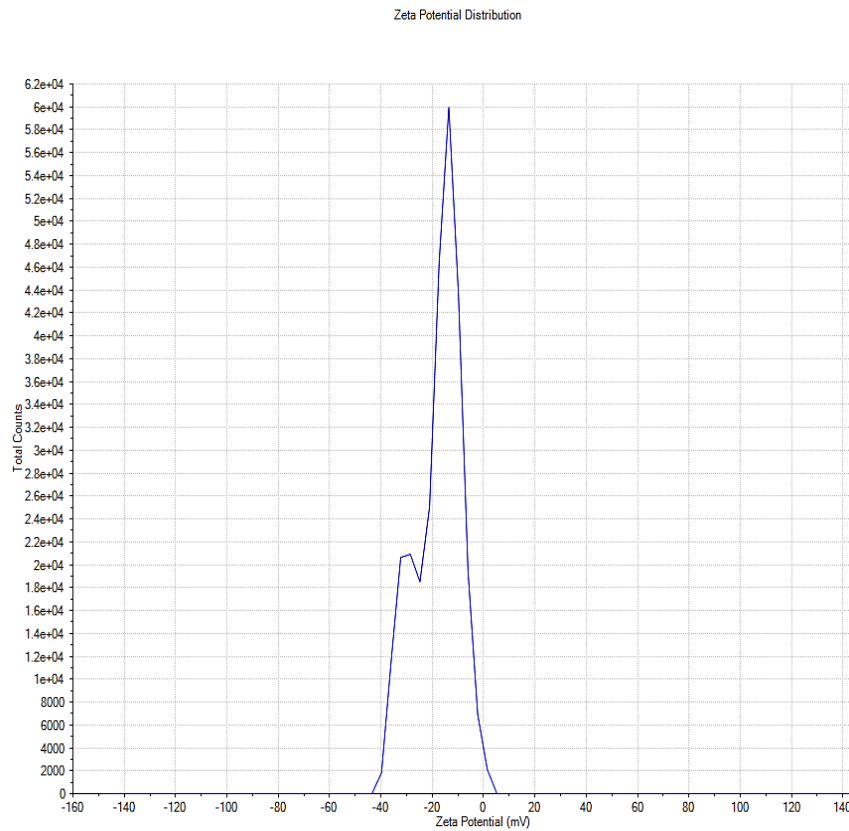


Figura 2 - Gráfico do potencial Zeta da nanopartícula na concentração de 20 mg/L.

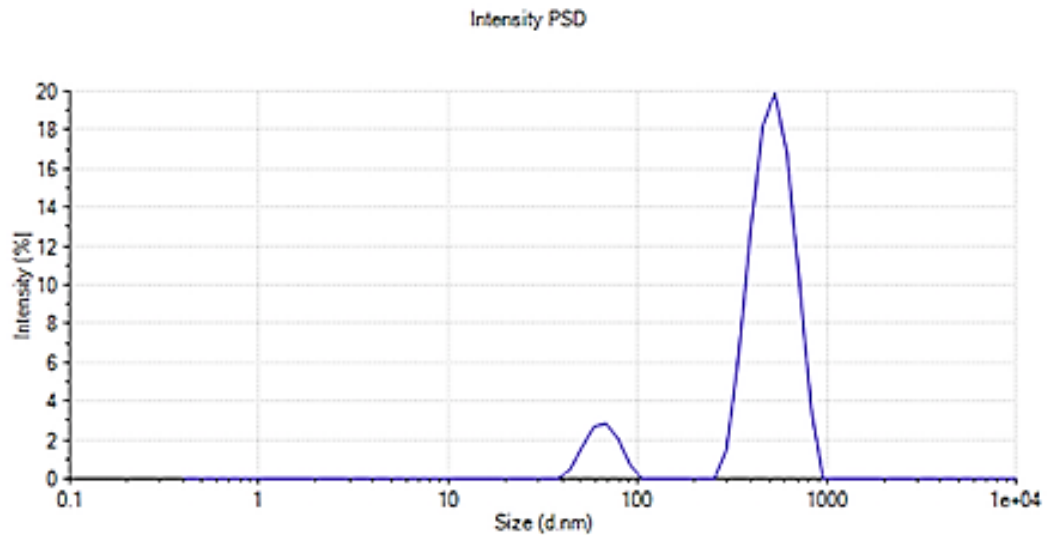


Figura 3- Tamanho estimado das nanopartículas em solução na concentração de 20 mg/L.

Bioensaios com as nanoformulações

Análise de Variância do experimento mostrou que não houve diferença estatística nas repetições dos experimentos, porém houve diferença significativa entre os tratamentos

avaliados tanto nos experimentos com o *M. cannonballus* (Tabela 1 e 2) como para *M. phaseolina* (Tabelas 3 e 4).

Tabela 1 – Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Padronização da dose-resposta do Fludioxonil no controle de *Monosporascus cannonballus*. **CV**: Causa de Variação; **GL**: Graus de Liberdade; **SQ**: Soma dos quadrados; **QM**: Quadrado Médio; **F**: Teste F de significância.

CV	GL	SQ	QM	F
TRAT	4	69784.56649	17446.14162	354.25*
REPEXP	1	173.16605	173.16605	3.52 ^{NS}

* Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade, NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Validação da ação do nano formulado na inibição do *Monosporascus cannonballus*. **CV**: Causa de Variação; **GL**: Graus de Liberdade; **SQ**: Soma dos quadrados; **QM**: Quadrado Médio; **F**: Teste F de significância.

CV	GL	SQ	QM	F
TRAT	11	254150.4446	23104.5859	923.86 *
REPEXP	1	53.7475	53.7475	0.1456NS

*Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade, NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 – Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Padronização da dose-resposta do Azoxistrobina + Fludioxonil no controle de *Macrophomina phaseolina*. **CV**: Causa de Variação; **GL**: Graus de Liberdade; **SQ**: Soma dos quadrados; **QM**: Quadrado Médio; **F**: Teste F de significância.

CV	GL	SQ	QM	F
TRAT	4	67782.01171	16945.50293	1802.22*
REPEXP	1	36.79104	36.79104	3.91 NS

* Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade, NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Resumo da Análise de Variância para variável Inibição Crescimento Micelial (ICM) e repetição do experimento de Validação da ação do nano formulado na inibição do *Macrophomina phaseolina*. **CV**: Causa de Variação; **GL**: Graus de Liberdade; **SQ**: Soma dos quadrados; **QM**: Quadrado Médio; **F**: Teste F de significância.

CV	GL	SQ	QM	F
TRAT	11	379267.8254	34478.8932	1583.98 *
REPEXP	2	77.6901	38.8450	1.78NS

*Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade, NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliação do nano formulado no controle do *Monosporascus cannonballus* - Padronização da dose resposta do Maxim®

Nos tratamentos, os resultados mostraram que em todas as concentrações avaliadas o Maxim foi capaz de inibir o crescimento do *M. cannonballus*, com as seguintes porcentagens de ICM: T1: 60,052%; T2: 83,687%; T3: 100%; T4:100% e T5: 0 % (Figura 4). Estatisticamente, o T3 e T4 não diferiram entre si; por sua vez, os tratamentos T1, T2 e T5 diferiram entre si e de T3 e T4 (Tabela 5). Considerando esses resultados, o T1, cuja concentração do Maxim foi de 0,1 ppm, que apresentou menor ICM, sendo o eleito para ser associado à nanopartícula.

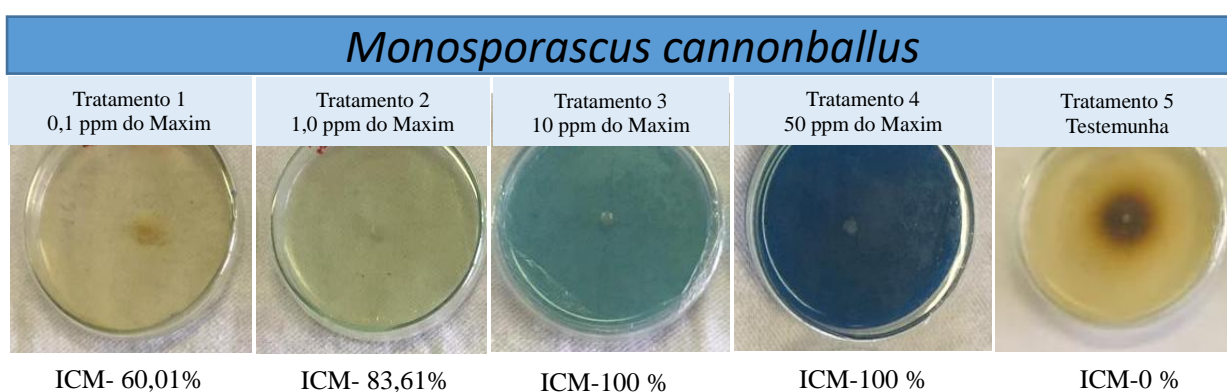


Figura 4- Avaliação do Maxim a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Monosporascus cannonballus*.

Tabela 5- Efeito da dose-resposta do Maxim® na Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Monosporascus cannonballus*.

TRATAMENTOS	MÉDIAS- ICM* (%)
T4- 50ppm do Maxim	100.000 a
T3- 10 ppm do Maxim	100.000 a
T2-1ppm do Maxim	83.687 b
T1- 0,1ppm do Maxim	60.052 c
T5- Testemunha (Fungo)	0.000 d

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Validação da ação do nanoformulado na inibição *in vitro* do *M. cannonballus*

Nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, as concentrações avaliadas foram capazes de inibir o crescimento fúngico em 100% para todos os tratamentos (Figura 5), inclusive estatisticamente esses tratamentos não diferiram entre si (Gráfico 1). Nos tratamentos T6, T7, T8, T9 e T10, nos quais haviam apenas a presença da nanopartícula em diferentes concentrações, observou-se que, quando sozinha, a nanopartícula não apresentou eficiência na ICM (Figura 5) apresentados ICM entre 6,7 a 2,1%. Esses tratamentos não diferiram entre si,

mas diferem dos tratamentos T1 ao T5. O tratamento T11, no qual foi avaliada apenas a ação do fungicida a uma concentração de 0,1ppm, apresentou porcentagem de ICM em 44,77%. Esse tratamento diferiu de todos os demais tratamentos; por sua vez, o tratamento T12, que foi a testemunha, contendo apenas o fungo, apresentou ICM de 0%, mostrando que não houve inibição do seu crescimento no meio utilizado. Estatisticamente, esse tratamento diferiu dos T1 ao T5, o que indica mais uma vez a eficiência da associação fungicida com nanopartícula, tendo a nanopartícula uma atuação de facilitar a entrega específica desse fungicida no controle do fungo. O tratamento T12 não diferiu dos T6 a T10, o que indica ação facilitadora da entrega do fungicida e sua inabilidade em controlar o patógeno sozinha.

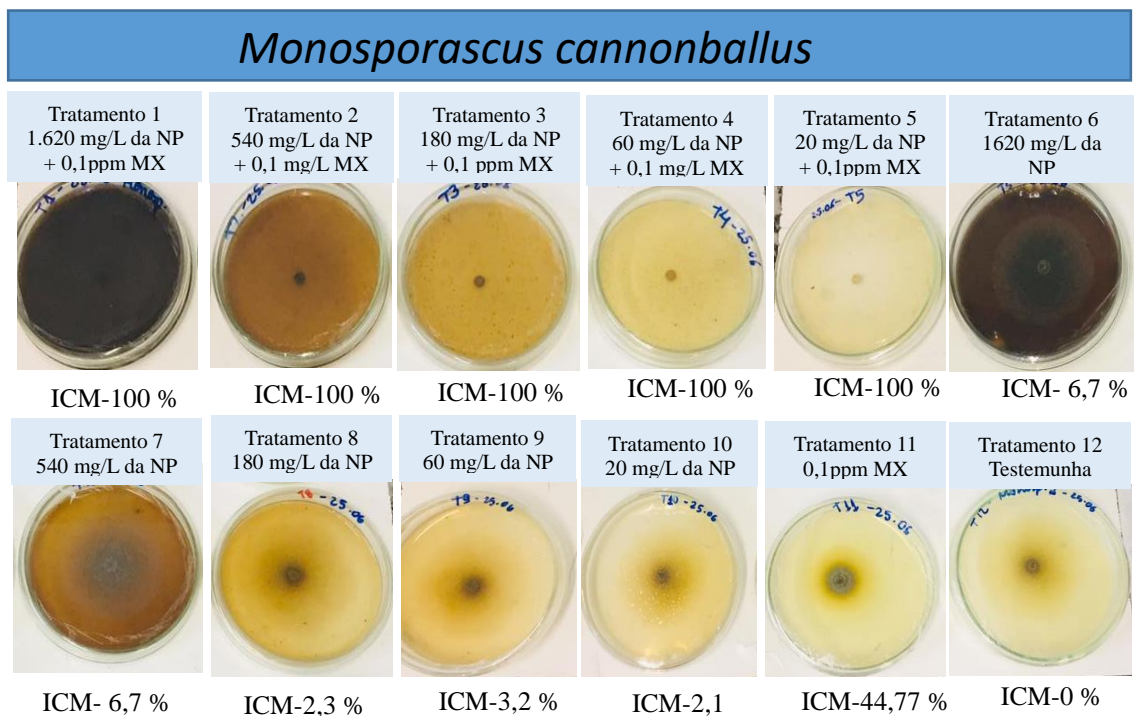


Figura 5- Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Monosporascus cannonballus*. NP- nanopartícula. MX-Maxim.

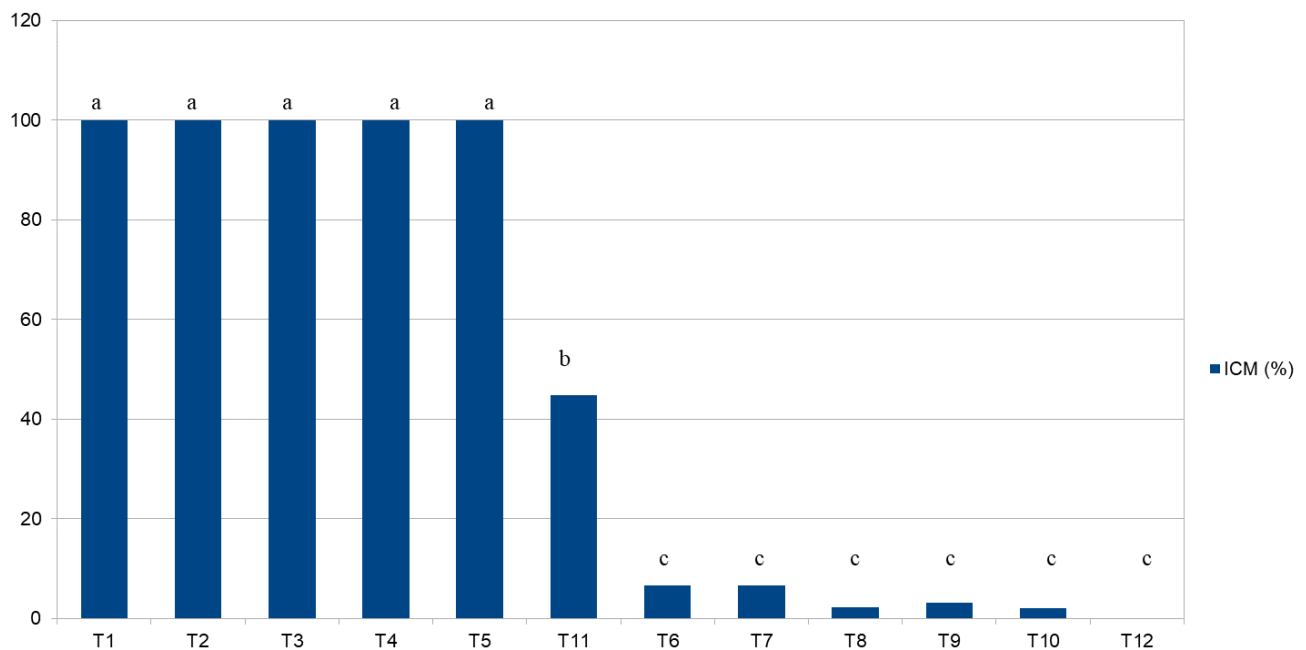
Índice de Inibição Micelial- ICM (%)* do *Monosporascus cannonballus*.

Gráfico 1 - Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Monosporascus cannonballus* *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1 (T1): 1.620 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 2 (T2): 540 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 3 (T3): 180 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 4 (T4): 60 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 5 (T5): 20 mg/L Nanopartícula + 0,1 ppm Maxim; Tratamento 6 (T6): 1.620 mg/L Nanopartícula; Tratamento 7(T7): 540 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8(T8): 180 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 60 mg/L Nanopartícula; Tratamento 10(T10): 20 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11(T11): 0,1 ppm Maxim; Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, testemunha, apenas o fungo.

Avaliação do nanoformulado no controle do *Macrophomina phaseolina*

Padronização da dose resposta do Graduate A+®

Nos tratamentos, os resultados mostraram que em todas as concentrações avaliadas o Graduate A+® foi capaz de inibir o crescimento fúngico, nas seguintes porcentagens de ICM: T1: 92,86%; T2: 93,61%, T3: 91,69% T4: 89,78% e T5: 0 % (Figura 6). Estatisticamente, T1 a T4 não diferiram entre si, diferindo, porém, do T5, que foi o tratamento testemunha, cujo crescimento fúngico era esperado (Tabela 6). Considerando esses resultados, qualquer tratamento poderia ser utilizado no bioensaio seguinte, tendo em vista que nenhum alcançou inibição 100% do fungo, assim a concentração eleita para ser associada à nanopartícula foi a de 1 mg/L.

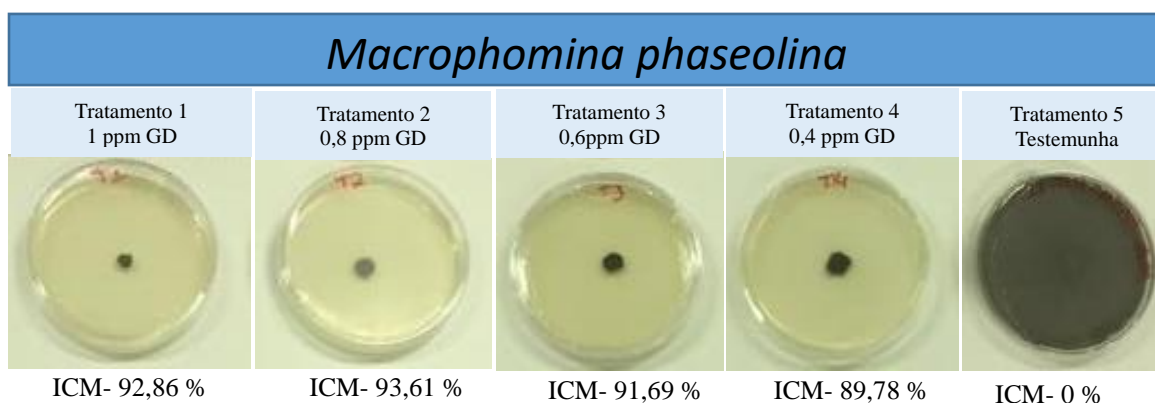


Figura 6- Avaliação da dose resposta do fungicida Graduate partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Macrophomina phaseolina*. .GD- Graduate

Tabela 6 - Efeito da dose resposta do fungicida Graduate na Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Macrophomina phaseolina*.

TRATAMENTOS	MÉDIAS- ICM* (%)
T5- Testemunha	0.000b
T1- 1 ppm Graduate	92.864a
T2- 0,8 mppm Graduate	93.617a
T3- 0,6 ppm Graduate	91.698a
T4- 0,4 mg/L Graduate	89.784a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Validação da ação do nanoformulado na inibição *in vitro* do *M. phaseolina*

Em todos os tratamentos nos quais o fungicida Graduate estava associado à nanopartícula, ocorreu a inibição do crescimento fúngico, apresentando ICM entre 98,3 a 100% (Figura 7) para os tratamentos, que estatisticamente não diferiram entre si (Gráfico 2). Já nos tratamentos nos quais haviam apenas a presença da nanopartícula em diferentes concentrações, observou-se que, quando sozinha, a nanopartícula não apresentou eficiência no ICM, apresentados ICM entre 7,9 a 10,1%. Esses tratamentos não diferiram entre si; por sua vez, o tratamento T12, que foi a testemunha, contendo apenas o fungo, apresentou ICM de 0%, mostrando que não houve inibição do seu crescimento no meio utilizado, tendo diferido estatisticamente de todos os outros tratamentos, o que indica mais uma vez a eficiência da

associação fungicida com nanopartícula, tendo a nanopartícula uma atuação de facilitar a entrega específica desse fungicida no controle do fungo.

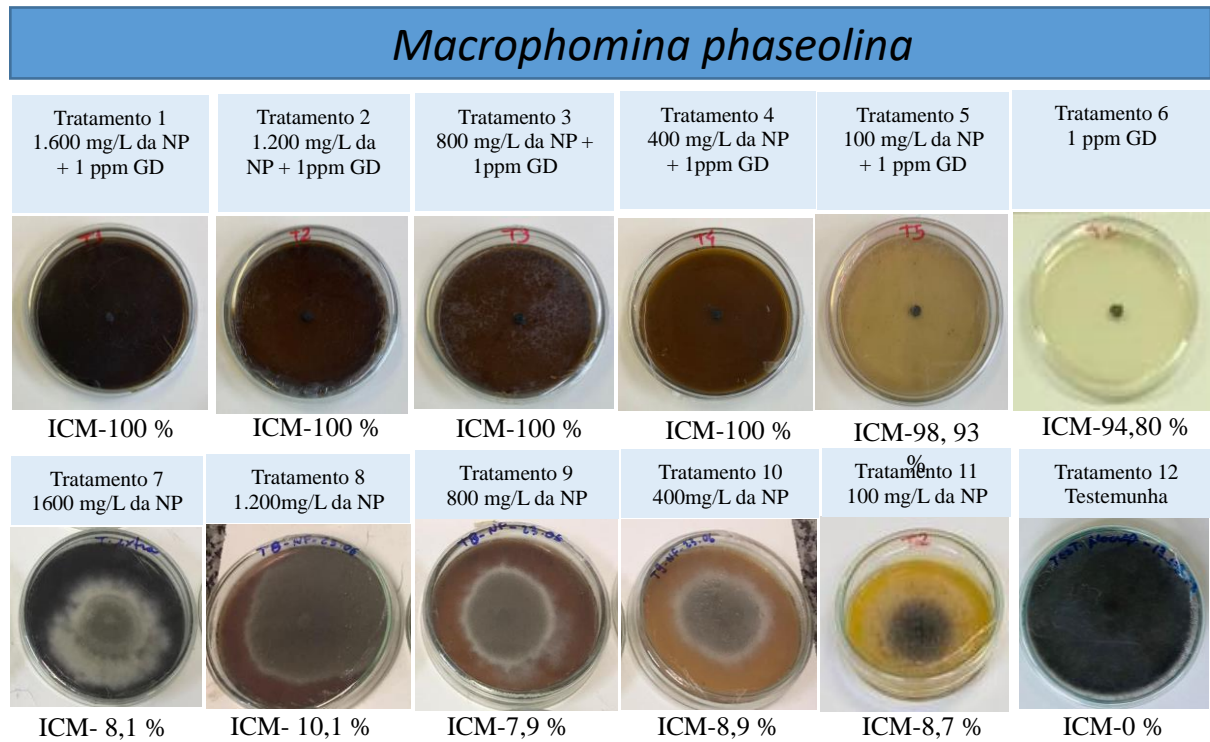


Figura 7- Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Macrophomona phaseolina*. NP- nanopartícula. GD- Graduate.

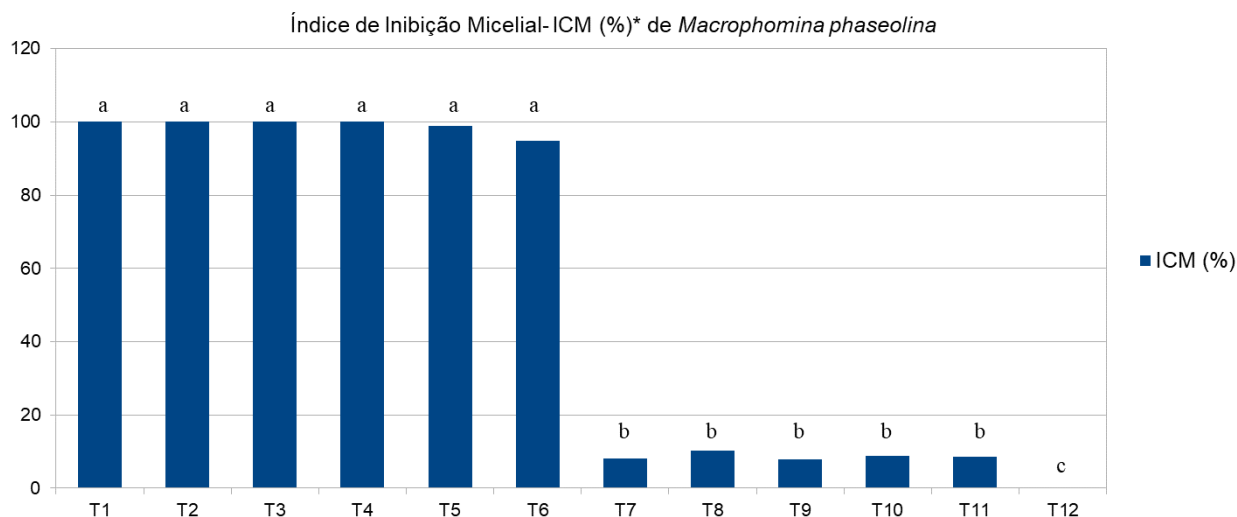


Gráfico 2- Validação da ação do nanoformulado a partir do Índice de Inibição Micelial- ICM (%) do *Macrophomina phaseolina* *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1 (T1): 1.600 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 2 (T2): 1.200 mg/L Nanopartícula +1 ppm Graduate A+; Tratamento 3 (T3): 800 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 4 (T4): 400 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 5 (T5): 100 mg/L Nanopartícula + 1 ppm Graduate A+; Tratamento 6 (T6): 1ppm Graduate; Tratamento 7 (T7): 1.600 mg/L Nanopartícula; Tratamento 8 (T8): 1.200 mg/L Nanopartícula; Tratamento 9 (T9): 800 mg/L Nanopartícula; Tratamento 10 (10): 400 mg/L Nanopartícula; Tratamento 11 (T11): 100 mg/L Nanopartícula; Tratamento 12 (T12): Sem fungicida, Testemunha, apenas o fungo.

4 DISCUSSÃO

As medições do potencial zeta determinam a estabilidade de um sistema coloidal, uma vez que as propriedades de carga superficial estão diretamente relacionadas a essas medições (ZHANG et al., 2017). Conforme Brar; Verma (2011), o potencial zeta serve para verificar as respostas da carga superficial das nanoformulações e para confirmar a efetiva funcionalização das nanopartículas. Neste estudo, o valor encontrado para potencial zeta (-17,8mV) indica a estabilidade da nanopartícula funcional. De forma geral, os valores de potencial negativo estão relacionados à alta estabilidade da nanopartícula (MANAIA et al., 2012; LIN et al., 2014). O efeito do tamanho das nanopartículas também implica funcionalidade e intensidade da fluorescência (SAHU; BEHERA et al., 2012): quanto menor for a partícula, mais eficiente será em sua função. Nesse caso, a nanopartícula dessa pesquisa atua como entregador do fungicida, fazendo a liberação da substância ativa (fludioxonil e azoxistrobina) de forma controlada. A microscopia eletrônica de transmissão corroborou com as demais caracterizações, indicando sua funcionalidade em transportar o fungicida. De acordo com Egerton (2005), a MET tem sido o método mais empregado nas caracterizações de novas partículas, pois, além de permitir visualizar a morfologia, permite também identificar defeitos, estrutura cristalina, relações de orientação entre fases, dentre outros.

Cavalcante et al. (2020), estudando a caracterização de cinco novas espécies de *Monosporascus* spp., incluíram nessa caracterização a sensibilidade das espécies a fungicida. Avaliando o fludioxonil nas diluições 0,01; 0,1; 1; 10 e 100mg/L, observaram que as cinco espécies foram altamente sensíveis ao fungicida com diluições abaixo de 1mg/L do fludioxonil. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, onde na concentração 0,1 mg/L houve sensibilidade do fungo ao fungicida, sendo exatamente essa escolhida para associação com a nanopartícula. Medeiros; Sales Júnior; Michereff (2006) avaliaram a eficiência de fungicidas no controle *in vitro* de *M. cannonballus*, sendo o mais eficiente o Fluazinam, na concentração 0,5 µg/mL, na qual obteve percentagem de inibição de crescimento micelial (ICM) de 68,21%, seguido de Propiconazole, que obteve, em média, ICM = 56,07%. Apesar de serem fungicidas com princípios ativos diferentes desta pesquisa, o valor do ICM foi semelhante ao que encontramos para fludioxonil (ICM= 60,052%).

Li et al. (2018) inocularam sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) com nanopartículas nas concentrações 0; 0,14; 0,28; 0,56; 1,12 e 2,24 mg/mL, observando que a concentração 560 mg/L foi responsável por aumentar o crescimento da planta e a resistência à doença *Rhizoctonia solani*. Com os resultados encontrados nesta pesquisa, observamos ação inibitória ao crescimento do fungo nas concentrações 1.620; 540; 80; 60 e 20 mg/L, consideramos que essa elevada margem de eficiência se deve à nanopartícula estar associada ao fungicida e agir como facilitador da ação dos fungicidas, facilitando a aplicação e a entrega controlada no controle do patógeno alvo. Almeida et al. (2021) observaram *in vitro* a inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum guaranicola* na presença de nanopartículas de prata (AgNPs) na dose de 100 µL, apresentando taxa de inibição do crescimento micelial de 41,12%, considerada promissora. Desse modo, as taxas de inibição encontradas nesta pesquisa foram de 100%. Essa excelente taxa confirma, mais uma vez, a ação de facilitar a aplicação e a entrega controlada no controle do patógeno alvo, além de ter diminuído em 250.000 mil vezes a concentração do fludioxonil, tendo em vista que sua concentração comercial é de 25.000 mg/L, ou seja, a associação com a nanopartícula também contribuiu na fungitoxicidade em doses baixas, que, segundo Correia; Michereff (2018), é umas das características cruciais dos métodos de controle de patógenos, em especial dos métodos químicos para patógenos radiculares.

Chaves Neto et al. (2016), avaliando diferentes concentrações do fungicida Azoxistrobina + Benzovindiflupir (10, 50, 100, 500, 1000 ppm) no controle *in vitro* de *Penicillium* sp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* sp isolados de grãos de milho, observaram percentagem de inibição superior a 20% para *Penicillium* na concentração de 1.000 ppm,

inibição superior a 40% para *Fusarium* nas concentrações 100, 500 e 1.000 ppm e inibição superior a 60% para *Aspergillus* nas concentrações 500 e 1.000ppm. Nesta pesquisa, as taxas de inibição foram superiores a 89% em todas as concentrações avaliadas (1; 0,8; 0,6 e 0,4 ppm), demonstrando especificidade de controle para cada patógeno, daí a necessidade de estudos avaliando concentração de cada princípio ativo utilizado, pois mesmo se tratando de um mesmo grupo químico, estrobilurinas, observamos diferenças significativas na atividade de cada fungicida. Independentemente do grupo pertencente, algumas características são de fundamental importância para todos os fungicidas, tais como: fungitoxicidade em doses baixas, especificidade e não serem prejudiciais ao meio ambiente, conforme Garcia (1999).

A utilização de nanopartículas de prata ou de nanopartículas oriundas de metais tem sido empregada na agricultura no Brasil em pesquisas a partir dos anos 2010. Alguns trabalhos, como de Araújo (2014); Calvacante (2014); Mendes et al. (2014); Mendes (2015); Sousa (2021), relatam, com sucesso, o uso isolado de nanopartículas no controle de fungos fitopatógenos. Nesta pesquisa, a nanopartícula é um elemento não metálico e por isso ela não tem como característica controlar o fungo, mas atuar como facilitador da ação dos fungicidas, a fim de facilitar a aplicação e a entrega controlada do fungicida a ela associada, aumentando a eficiência do fungicida, além de ser ecologicamente viável ao homem e ao meio ambiente, pois mesmo em concentrações mais baixa do seu princípio ativo (nesse caso, o princípio ativo do fungicida foi reduzido em 239.000 mil vezes) foi eficiente no controle *in vitro* de *M. phaseolina*, isso porque quando associado à nanopartícula ele adere à nanopartícula, permitindo a absorção e liberação da substância ativa de maneira controlada, evitando aplicação de doses em concentrações muito elevadas, além de permitir o direcionamento do composto a sítios específicos, portanto a nanopartícula desta pesquisa atua como veículo na disponibilização de compostos químicos para o controle de fitopatógenos.

Segundo Rajwade et al. (2020), ocorrem dano na estrutura da parede e membrana celular, inibição da germinação de esporos, down-regulação de genes de patogenicidade, deformações e interrupção do ciclo celular, geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da replicação de DNA e acidificação do meio intracelular são alguns dos mecanismos de ação dos nanopesticidas no combate a fitopatógenos.

5 CONCLUSÃO

Foi possível identificar o potencial da nanopartícula como facilitador da ação dos fungicidas avaliados, diminuindo em 250.000 mil vezes a concentração do Maxim e em

239.000 mil vezes a concentração do Graduate, a fim de facilitar a aplicação e a entrega controlada nas plantas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A-S.F.; CORRÊA JUNIOR, A.; BENTES, J.L.S. Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by *Fusarium concolor* and inhibition of plant pathogens. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2021.

ARAÚJO, J. A. M. **Nanopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos**. 2014. 108f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.

BRUTON, B. D.; GARCÍA-JIMENEZ, J.; ARMENGOL, J. Analysis of the relationship between temperature and vine declines caused by *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on muskmelon. **Subtropical Plant Science**, v. 51, p. 23-28, 1999.

CAVALCANTE, A. L. A. et al. Characterization of Five New *Monosporascus* Species: Adaptation to Environmental Factors, Pathogenicity to Cucurbits and Sensitivity to Fungicides. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1-14, Set/2020.

CAVALCANTE, N. B. **Atividade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Centro, Petrolina - PE, 2014.

CHAVES NETO, J. R. et al. Sensibilidade *in vitro* de fungos isolados de grãos de milho ao fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir em diferentes concentrações. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 13 n. 23, p.1211, 2016.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (org.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRRPE, 2018. p.1-16.

EGERTON, R. F. **Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM and AEM**. Springer Science+Business Media, Inc., New York, 2005. p. 125-153.

FIGUEIRÊDO M. C. B.; GONDIM R. S.; ARAGÃO, F. A. S. (org.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Brasília: Embrapa, 2017. 302 p.

GARCIA, A. **Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos**. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32p. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2020). **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>. Acesso em: 21 mar. 2022.

KRANJC, E.; DROBNE, D (2019). Nanomaterials in Plants: A Review of Hazard and Applications in the Agri-Food Sector. **Nanomaterials**. 9. 1094. 10.3390/nano9081094.

KUMAR, S.; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; MARRAZZA, G.; HASSAN, A. A.; KIM, K. H. Nano-based smart pesticide formulations: emerging opportunities for agriculture. **Journal of Controlled Release**, v. 294, p. 131–153, 2019.

LI, H. et al. Impacts of Carbon Dots on Rice Plants: Boosting the Growth and Improving the Disease Resistance. **Materiais Biológicos Aplicados**, v. 1, n. 3, p. 663-672, 2018.

LIMA, J. D. **Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura**. 2020. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

LIN, P.-C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014.

LIU, M. L.; CHEN, B. B.; LI, C. M.; HUANG, C. Z. Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. **Green Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 449–471, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8gc02736f>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MANAIA, E. B. et al. Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO₂ nanoparticles obtained by sol–gel process. **Journal of sol-gel Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 251-257, 2012.

MEDEIROS, E. V.; SALES JÚNIOR, R.; MICHEREFF, S. J. Eficiência de fungicidas no controle “in vitro” de *Monosporascus cannonballus*. **Revista Caatinga**, v. 19, p. 360-368, 2006.

MENDES, J. E. **Estudo in vitro da atividade antifúngica de nanopartículas de prata em fungos de armazenamento de soja (*Glycine max*)**. 2015. 157f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MENDES, J. E.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J. A.; DE CAMARGO, E. R.; DE SOUZA, C. P.; PESSOA, J. D. C. Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, v. 8, n. 9, p. 928-933, 2014.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Prevalent weeds collected from cucurbit fields in Northeastern Brazil reveal new species diversity in the genus *Monosporascus*. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 3, p. 349-363, 2019.

PODDAR, K. et al. Chapter 10 - Nanotechnology for Sustainable Agriculture. In: SINGH, R. L.; MONDAL, S. B. T. (org.). **Biotechnology for sustainable agriculture**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2018. p. 281–303.

RAJWADE, J. M.; CHIKTE, R. G.; PAKNIKAR, K. M. Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, Issue 4, n. 17, p. 1437-1461, 2020.

SAHU, S. et al. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. **Chemical Communications**, 48, p. 8835–8837, 2012.

SALES JÚNIOR, R. et al. Podridão de raízes por *Monosporascus* e declínio de ramas no meloeiro: grave problema sem solução. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (org.). **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018b. p. 111-130.

SAMURKAS, A.; YAO. L.; HADIATULLAH, H.; RUIFANG, M.; YUNXUN, X.; RAJAMANIKANDAN, S.; HAN, Z.; ZHIGUANG, Y. Receptor de Ryanodina como alvo de inseticida. **Projeto Farmacêutico Atual**, v. 28, p. 26-35, 2021.

SHAH, M. A.; WANI, S.H. Nanotechnology and insecticidal formulations. **Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing**, v. 1, p. 285–310, 2016.

SOUSA, F. **Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina sobre a Mancha Parda do Arroz**. 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.

ZHANG, H. et al. Filtration of Glycoprotein-Modified Carboxylated Polystyrene Microspheres as *Cryptosporidium* Oocysts Surrogates: Effects of Flow Rate, Alum, and Humic Acid. **Journal of Environmental Engineering**, v. 143, n. 8, p. 1–9, 2017

ZHAO, L., et al., (2020). A novel approach to fabricate fully biodegradable poly(butylene succinate) biocomposites using a paper-manufacturing and compression molding method. **Composites Part A**, 139, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2020.106117>

CAPÍTULO IV

Avaliação de óleos essenciais e nanopartículas funcionalizadas visando ao controle do *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina* isolados de meloeiro

RESUMO

No Brasil, a produção de melão se concentra na região Nordeste, onde os estados do Rio Grande do Norte e o Ceará têm sido responsáveis por mais de 80% da produção e exportações brasileiras de melões (*Cucumis melo* L.). No entanto, essa produção cada vez mais intensa tem agravado os problemas fitossanitários no cultivo. Dentre os patógenos mais importantes, estão *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*, agentes causais da “podridão de raízes e declínio de ramas” em meloeiro. O uso de óleos essenciais se destaca como uma forma de controle menos agressivo, sustentável e que não prejudica o meio ambiente, que visa a conciliar uma produção rentável e ecológica. No entanto, os óleos essenciais têm natureza volátil, baixa estabilidade e baixa solubilidade que afetam a validação de produtos antimicrobianos quando levados para ensaios em campo. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de três óleos essenciais (OEs): capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) no controle *in vitro* dos fungos *M. cannonballus* e *M. phaseolina* isolados de melão e avaliar associação dos OEs a nanopartículas a fim de aumentar a entrega seletiva da sua ação antifúngica. Os OEs comerciais (BioEssência) foram avaliados nas concentrações 1, 3 e 6 ml/L e em associação com a nanopartícula. Foi possível concluir que: i) os três OEs apresentaram efeito inibitório em todos os tratamentos avaliados sobre ambos os fungos; ii) a nanopartícula isolada não interferiu no crescimento micelial; iii) a associação dos OEs com a nanopartícula contribuiu para inibição do crescimento micelial em ambos os fungos, demonstrando que a nanopartícula funcionalizada pode ser desenvolvida com ferramenta de entrega de compostos fungicidas.

Palavras-chave: Nanotecnologia na agricultura; Podridão de raízes e declínio de ramas do meloeiro; capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf); hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.); manjeriço (*Ocimum basilicum* L.).

ABSTRACT

In Brazil, melon production is concentrated in the Northeast region, where the states of Rio Grande do Norte and Ceará have been responsible for more than 80% of Brazilian production and export of melons (*Cucumis melo* L.). However, the intense cultivation has aggravated the phytosanitary threats to the crop production. Among the most important pathogens are *Monosporascus cannonballus* and *Macrophomina phaseolina*, causal agents of “root rot and vine decline” in melon. Essential oils is highlighted as a less aggressive, sustainable form of control those diseases, which aims to reconcile profitable and ecological production. However, essential oils are volatile, low stability and low solubility that implicate on the validation of antimicrobial products in field assays. In this scenario, this work evaluated the antifungal activity from for three essential oils (EO) from *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass), pepper (*Mentha piperita*) and basil (*Ocimum basilicum*) under *in vitro* assays of *M. cannonballus* and *M. phaseolina* isolated from melon. Additionally, the association of the EOs with the nanoparticle were tested in order to increase the selective delivery of its antifungal action. The commercial EOs (BioEssence) were delivered in the concentrations 1, 3 and 6 ml/L and in association with the nanoparticle. It is possible to conclude that: i) all EOs showed to be effective against the mycelial growth; ii) the nanoparticle alone did not interfere with mycelial growth and; iii) the association of the nanoparticle with the EO were effective against the mycelial growth for both *M. cannonbalus* and *M. phaseolina*, demonstrating that the nanoparticle can be developed as a functional carrier against fungi in plants.

Key words: Nanotechnology in agriculture; Root rot and melon shoot decline; lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf), peppermint (*Mentha piperita* L.); basil (*Ocimum basilicum* L.).

1 INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento da população mundial, cresceu igualmente a necessidade de alimentos, porém essa produção veio atrelada ao uso de diferentes insumos agrícolas, dentre eles os agrotóxicos. A utilização exagerada de fungicidas contribui para o surgimento da resistência de patógenos e para a presença de resíduos tóxicos em alimentos. Além disso, o uso excessivo de pesticidas sintéticos é responsável por diversos efeitos prejudiciais ao meio ambiente, a saúde humana e tem efeitos indesejados (FONSECA et al., 2015; SAMURKAS et al., 2020). Estima-se que 90% dos fungicidas e pesticidas aplicados sejam perdidos e acumulados no meio ambiente e no solo (SAMURKAS et al., 2020).

Estimulando a busca por métodos menos agressivos, sustentáveis e que não prejudiquem o meio ambiente, surgem alternativas ecológicas no controle de pragas. O uso de defensivos alternativos, de origem natural, vem aumentando ultimamente como forma ecológica do controle de pragas conciliando uma produção rentável com o equilíbrio ecológico (FERNANDES et al., 2006). O controle alternativo se destaca como prática sustentável que utiliza organismos naturais, sem químicos, de maneira que não polui o meio ambiente e não proporciona resistência aos patógenos controlados. Eles apresentam baixa ou nenhuma toxicidade aos organismos presentes no meio ambiente, já que são eficientes no combate aos insetos, doenças e microrganismos nocivos, com disponibilidade acessível e custo reduzido. Esse método advém da agricultura orgânica, modelo de agricultura no qual é proibido o uso de insumos químicos, sendo usadas outras estratégias como medidas paliativas no controle de insetos e doenças até que se encontre o equilíbrio desejado (BARROS, 2017).

Diante do apelo para que novas formas (mais sustentáveis) de controle de doenças de plantas sejam adotadas, o uso de produtos naturais tais como os óleos essenciais surgiu como uma alternativa que tem se tornando uma realidade no controle de doenças de plantas (FONSECA et al., 2015).

Oriundos do metabolismo secundário de plantas, os óleos essenciais (OEs) possuem características antifúngicas, antimicrobianas e inseticidas, decorrente de misturas complexas de substâncias voláteis, com baixa massa molecular, líquidas, lipofílicas e odoríferas em sua grande parte (MORAIS, 2009). Os principais constituintes dos óleos essenciais são, por exemplo, os monos e sesquiterpenos, hidratos de carbono, fenóis, álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, que são responsáveis pela atividade biológica e por sua fragrância (NUZHAT; VIDYASAGAR, 2013). A atividade fungicida dos óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos ocorre por meio da ação inibitória do crescimento micelial e da germinação de

esporos ou por meio da indução de fitoalexinas, que contêm propriedades elicitoras (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005; ROZWALKA et al., 2008). De forma geral, os OEs são classificados como compostos não-fitotóxicos e potencialmente ativos contra vários outros microrganismos.

Dentre os óleos essenciais conhecidos, vários já demonstraram atividade antimicrobiana como, por exemplo: OE de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), que tem como componentes químicos o citral, geranial (55.2%) e neral (44.7%) (SAWADOGO et al., 2022); OE de hortelã (*Mentha spicata*), que tem como componentes químicos timol (28.19%), ácido adapico (25.82%), mentol e acetato de metila (24.18%), piperitone (24.76%) (SOLIMAN et al., 2022); OE de manjeriço (*Ocimum basilicum*), que tem como componentes químicos principais o metil chavicol (88.6%), 1,8-cineol (4.2%) e α -trans-bergamotene (1.7%) (SUMALAN et al., 2020). Todos esses OEs já foram testados contra os seguintes fungos fitopatogênicos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, controlados por OE de capim-limão; *Fusarium oxysporum*, controlado pelo OE de hortelã; *Azotobacter chroococcum*, *Micrococcus luteus*, controlado pelo OE de manjeriço (SAWADOGO et al., 2022; SOLIMAN et al., 2022; SUMALAN et al., 2020).

Devido à sua natureza volátil, fotodegradável, suscetibilidade química e baixa solubilidade, os OEs são pouco eficazes quando levados para ensaios em campo, o que afeta diretamente o desenvolvimento de novos ativos antimicrobianos (MOREIRA, 2014; NAIR et al., 2022). Visando a resolver essa problemática, nanopartículas compostas por materiais poliméricos têm sido estudadas extensivamente. Neste cenário, a pesquisa sobre sistemas de entrega eficientes de óleos essenciais em interações planta-patógeno permanece em voga, daí é que a nanotecnologia mostra grande potencial para aumentar a eficiência desses produtos (LIMA, 2020; MOREIRA, 2014; NAIR et al., 2022).

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a eficiência dos óleos essenciais (OE) de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf), OE de hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.) e OE de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) no controle *in vitro* dos fungos *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker e *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid), causadores de doenças em meloeiro (*Cucumis melo* L.). Além disso avaliar a associação do OE a nanopartículas de modo a realizar entrega seletiva e incrementar a estabilidade de compostos antifúngicos como forma inovadora de controle dessas doenças em meloeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados fúngicos

Foram utilizados dois isolados fúngicos, sendo eles: *Monosporascus cannonballus*, isolado pertencente ao Laboratório Fitopatologia II da UFERSA oriundo de meloeiro, com identidade previamente confirmada por técnicas moleculares (NEGREIROS et al., 2019) cuja sequência foi depositada no GenBank, código JQ 762366, e depositada também na Coleção de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM), na Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE (Recife, PE, Brasil), código CMM 2429; o outro é denominado *Macrophomina phaseolina*, coletado a partir das raízes de meloeiro também pertencente à Coleção de Culturas de fungos fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM)/ UFRPE. Para uso, os isolados foram cultivados em placas de Petri em Meio ágar batata dextrose (BDA) comercial (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 28°C no escuro por sete a dez dias.

2.2 Óleos Essenciais

Foram utilizados três óleos essenciais comerciais da marca BioEssência: capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*), todos com certificação IBD vegano e IBD ingredientes naturais e com laudo de análise de cromatografia disponibilizada pelo fabricante (ANEXO I).

Apesar do laudo, foi realizada a caracterização gasosa desses óleos no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Agroindústria Tropical- Fortaleza-CE. Para a análise, uma alíquota de 1 µL de cada óleo essencial foi dissolvida em 999 µL de hexano (grau GC) e transferida para um vial.

A análise foi realizada em um instrumento Agilent GC-7890B acoplado a um detector de massa seletivo Agilent MSD-5977A com impacto de elétrons a 70 eV equipado com uma coluna HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, metilpolisiloxano, Agilent). Foi usada uma proporção de divisão (split) de 1:50, com injeção de 1 µL, hélio como gás de arraste (taxa de fluxo de 1,00 mL.min⁻¹ e velocidade linear constante de 36,8 cm.s⁻¹), temperatura do injetor de 250°C, temperatura do detector de 150°C e temperatura da linha de transferência de 280°C. O programa de temperatura do forno consistia em uma temperatura inicial de 70°C com uma rampa de aquecimento de 4°C/min a 180°C, seguida por uma rampa de 10°C/min a 250°C no final da corrida (34,5 min).

A identificação dos compostos foi realizada comparando seus índices de retenção com aqueles de compostos conhecidos obtidos pela injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C7-C30 analisados na mesma coluna nas mesmas condições cromatográficas. Também foi realizada a comparação dos padrões de fragmentação com os fornecidos nas bases de dados do equipamento (NIST, versão 2.0 de 2008 -287.324 compostos).

2.3 Nanopartículas

A nanopartícula (em submissão de patente) utilizada foi gerada pela Empresa KrillTech® por meio da *Startup* entre Universidade de Brasília (UnB) e Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil. Em microscopia eletrônica de transmissão, a partícula apresentou tamanho entre 10-50nm, com valor de potencial zeta de -17,8mV.

2.4 Potencial Zeta e Tamanho Nanopartículas Funcionalizadas

Potencial Zeta e Tamanho das nanopartículas associada a cada óleo essencial, ou seja, nanopartículas funcionalizadas, foram determinados utilizando-se um equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malverne Instruments, UK), utilizando alíquotas das suspensões aquosas na diluição de 1:50.

2.5 Bioensaios *in vitro*

Para cada bioensaio realizado, foi adotada a mesma metodologia. Utilizou-se o meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) comercial (39g/L). Após autoclavagem a 120°C por 15min, era adicionado ao meio o respectivo OE de cada tratamento, agitado lentamente e vertidos 20mL na placa de petri, prosseguindo com depósito dos discos de micélio do fungo avaliado com 5mm de diâmetro posicionados no centro da placa e em seguida acondicionada a 28°C. O crescimento das colônias foi mensurado quando elas tomassem toda a superfície do meio de cultura das placas do tratamento testemunha, somente com o fungo, realizando-se a medição do tamanho micelial.

A variável avaliada nos bioensaios foi a taxa de Inibição do Crescimento Micelial (ICM). Essa variável foi submetida à ANOVA, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS®. Para o cálculo do ICM, foi realizada a medição do micélio fúngico utilizado um paquímetro digital. Assim, foi possível estimar a taxa de ICM em porcentagem por meio da fórmula abaixo:

$$\text{ICM (\%)} = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} / \text{diâmetro da testemunha}) \times 100 \%$$

2.5.1 Ação do OE de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) no controle do *Monosporascus cannonballus*

Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEC₁): 1mL/L OE Capim-limão; Tratamento 2 (OEC₂): 3mL/L OE Capim-limão; Tratamento 3 (OEC₃): 6mL/L OE Capim-limão; Tratamento 4 (NOEC₁): 1mL/L OE Capim-limão + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Maxim; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

2.5.2 Ação do OE de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) no controle do *Monosporascus cannonballus*

Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 2 (OEH₂): 3mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 3 (OEH₃): 6mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 4 (NOEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Maxim; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

2.5.3 Ação do OE de manjeriço (*Ocimum basilicum*) no controle do *Monosporascus cannonballus*

Para observar a atividade antifúngica do sistema OE e NOE de *Ocimum basilicum*, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEM₁): 1mL/L OE manjeriço; Tratamento 2 (OEM₂): 3mL/L OE manjeriço; Tratamento 3 (OEM₃): 6mL/L OE manjeriço; Tratamento 4 (NOEM₁): 1mL/L OE manjeriço + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Maxim; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

2.5.4 Ação do OE de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) no controle do *Macrophomina phaseolina*

Para observar a atividade antifúngica do sistema OE e NOE de *Cymbopogon flexuosus* adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEC₁): 1mL/L OE Capim-limão; Tratamento 2 (OEC₂): 3mL/L OE Capim-limão; Tratamento 3 (OEC₃): 6mL/L OE Capim-limão; Tratamento 4 (NOEC₁): 1mL/L OE Capim-limão + 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Graduate A+; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

2.5.5 Ação do OE de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) no controle do *Macrophomina phaseolina*

Para observar a atividade antifúngica do sistema OE e NOE de *Mentha piperita*, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 2 (OEH₂): 3mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 3 (OEH₃): 6mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 4 (NOEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta + 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Graduate A+; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

2.5.6 Ação do OE de manjeriço (*Ocimum basilicum*) no controle do *Macrophomina phaseolina*

Nesse experimento, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e cinco repetições, totalizando 35 parcelas experimentais, assim sendo: Tratamento 1 (OEM₁): 1mL/L OE manjeriço; Tratamento 2 (OEM₁): 3mL/L OE manjeriço; Tratamento 3 (OEM₁): 6mL/L manjeriço; Tratamento 4 (NOEM₁): 1mL/L OE manjeriço + 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 400mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida Graduate A+; Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cromatografia Gasosa dos Óleos Essenciais

Segundo análise cromatográfica do fabricante e conforme o identificado nesta pesquisa, o OE de capim-limão tem como principais componentes químicos o geranial e neral, correspondendo às seguintes porcentagens: geranial (45,08%) e neral (38,2%) (Tabela 1 e Figura 1). Essa mistura origina o citral, relatado como o principal componente do OE do

capim-limão. Nesta pesquisa, a concentração do citral foi de 83,28%. Essa molécula, além de conferir o odor, tem ação antimicrobiana. Lee et al. (2021) observaram que o OE de capim-limão utilizado em sua pesquisa continha a seguinte composição: 72% de citral, 40% de geranial e 32% neral. Adukwu et al. (2012), avaliando composição do OE em seus estudos, observaram composição de neral em 33,00% e geranial em 47,00% (80% citral). Azevedo et al. (2016) observaram a seguinte composição: neral 33,8% e 43,62% geranial, ou seja, 77,42% citral. Segundo Lorenzi (2008), Simão; Spitzer (2003), a composição dos óleos essenciais oriundos de uma mesma espécie pode variar em virtude das condições edafoclimáticas durante o cultivo. Os estudos indicam que o citral, componente majoritário do OE capim-limão, é um aldeído alifático composto pela mistura entre os isômeros neral (β -citral ou cis-citral) e geranial (α -citral ou trans-citral), sendo responsável pela atividade antimicrobiana (GANJEWALA, 2009; PANDEY et al., 2003).

Tabela 1 – Composição do óleo essencial de capim limão com os respectivos parâmetros de identificação: tempo de retenção (Tr em min); índice de kovats (ki) experimental e referenciado na literatura; taxa de similaridade (%); m/z do principal fragmento e área relativa (%).

Capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i> Stapf)						
Molécula	Tr (min)	KI^2 exp.	KI^1 Adams	Taxa de similaridade (%)	Major m/z	Área (%)
Camphene	4,123	952	954	90,1	93	0,68
D-Limonene	5,599	1030	1029	89	68	2,85
Linalol	7,29	1099	1096	70	43	0,55
Neral	11,223	1239	1238	93	41	38,2
Geraniol	11,662	1254	1252	82,3	69	4,84
Geranial	12,113	1268	1267	91,4	69	45,08
Geranyl acetate	15,632	1382	1381	81,5	69	3,08
E-caryophyllene	16,688	1416	1419	90	41	3,18
γ -cadinene	19,5	1510	1513	81,7	161	1,08
Hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.)						
α -Pinene	3,875	936	939	89,1	93	1,01
β -Pinene	4,6	979	979	88,8	93	1,1
D-Limonene	5,592	1029	1029	88,7	68	2,21
Eucalyptol	5,656	1032	1031	87	43	0,94
Isopulegol	8,5	1146	1145	90	41	1,32
Menthone	8,716	1154	1162	94,6	112	20,53
Iso menthone	9,015	1164	1162	86,6	112	14,5
Menthol	9,231	1171	1171	95,7	71	46,13
neo-Isopulegol	9,391	1177	1171	80,5	41	1,93
Isomenthol	9,562	1182	1182	91,6	71	1,17
α -Terpineol	9,81	1190	1188	75,2	59	0,76
Pulegone	11,242	1240	1237	87,1	81	1,45

Menthyl acetate	12,839	1290	1295	92,7	95	5,88
E-caryophyllene	16,694	1417	1419	87	91	0,68
Manjeriçao (<i>Ocimum basilicum L.</i>)						
Linalol	7,208	1095	1096	93,8	71	15,26
Estragol	9,989	1196	1196	95,7	148	82,79
E-caryophyllene	16,681	1416	1419	80	93	0,37
α -trans-						
Bergamotene	17,165	1433	1434	83,6	93	0,41
Ni	20,321	1540	-	-	93	1,17

¹KI: índice de Kovats experimental.

²KI: índice de Kovats da referência (Adams 2007).

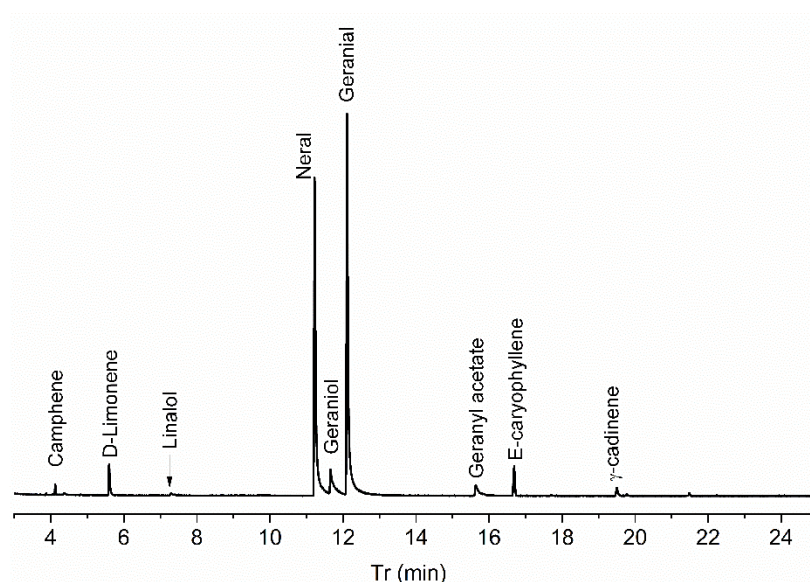


Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

Por sua vez, o OE de hortelã-pimenta apresentou como principais componentes: mentol (46.13%) e mentona (20.53%) (Figura 2 e Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com relatos na literatura: Iscan et al. (2002) relataram a composição do óleo essencial de quatro amostras de *M. piperita* de fontes distintas, observando as seguintes proporções: mentol (28%-42%) e mentona (18%-28%) como os principais constituintes; Fejér et al. (2018) observaram os seguintes compostos do obtido do OE de *M. piperita* L. cultivar (Kristinka): Mentol 64.01% e Mentona 23.43%. Freire (2020) extraiu o OE de folhas secas de hortelã-pimenta, observando que em sua maior parte os componentes do OE foram monoterpenos, sendo os principais: mentol (44,92%) e mentona (6,02%). Segundo Edris; Farrag (2003), o mentol é o principal responsável pela ação antifúngica do OE de hortelã e

possui efeito aumentado na presença da mentona, ao passo que ela sozinha não apresenta essa propriedade.

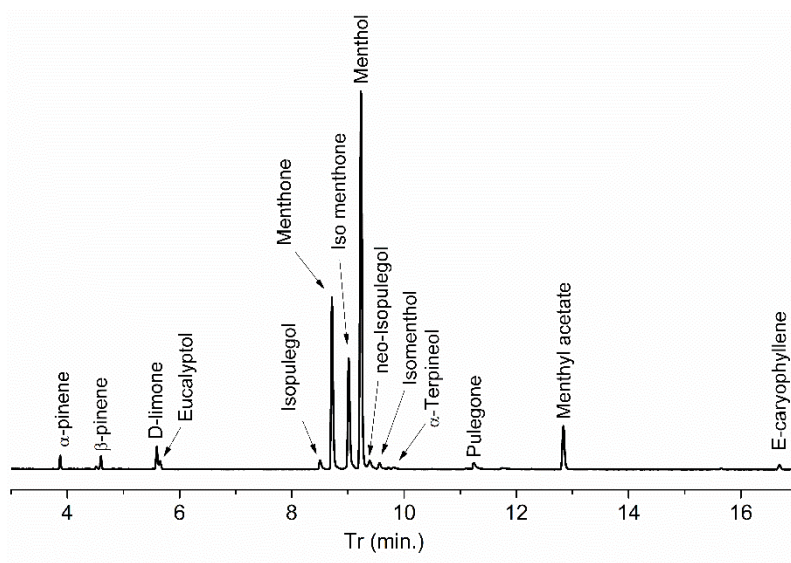


Figura 2 – Cromatograma do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*).

Óleo essencial de manjeriço apresentou como constituintes majoritários: estragol 82,79% e linalol com 15,26% (Figura 3 e Tabela 1). Veloso et al. (2014) fizeram a caracterização do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço e observaram que linalol e o (E)- cinamato de metila foram os componentes majoritários. Vieira; Simon (2000) coletaram e caracterizaram quimicamente 14 acessos de *Ocimum americanum* L., *O. basilicum* L., *O. campechianum*. Para *Ocimum basilicum* (manjeriço), foram encontrados os seguintes constituintes: 1,8-cineol (22%), linalol (49,7%), metil chavicol (47%) ou cinamato de metila. Moura (2015), avaliando o óleo essencial do manjeriço, observou que seus constituintes majoritários foram linalol e estragol.

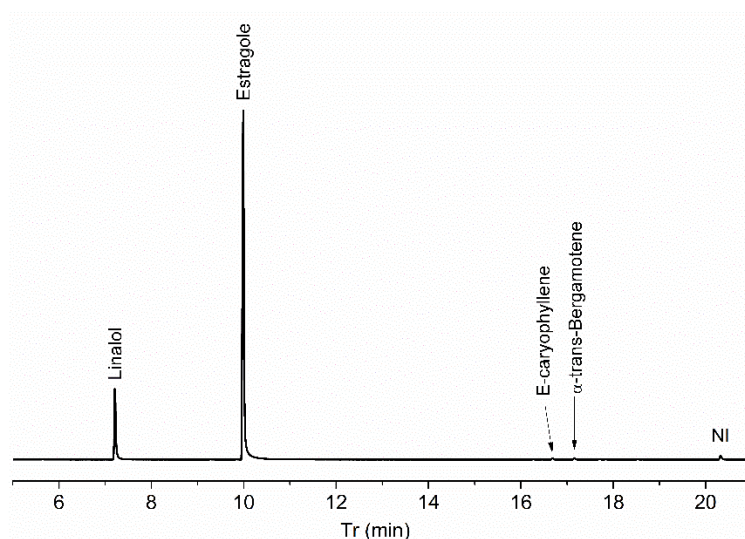


Figura 3 – Cromatograma do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum*).

O linalol é um monoterpeneo presente no óleo essencial de manjerição de extrema importância para as indústrias de cosméticos e alimentícios, já que é utilizado como fixador de fragrâncias. Esse composto é relatado como o constituinte principal do OE manjerição, sendo relatado como partida para várias sínteses importantes, como a síntese do acetato de linalila e por isso eficiente como acaricida, bactericida e fungicida; até na medicina tem sido aplicado com sucesso como sedativo, e atualmente são analisadas suas propriedades anticonvulsivas (BAKKALI et al., 2008; SANTOS; FREITAS, 2013). O Estragol é um fenilpropenoide e importante constituinte de muitos óleos essenciais, inclusive do manjerição (COSGE et al., 2008). Esse composto possui amplas aplicações na medicina popular e aromaterapia (LEAL-CARDOSO et al., 2004). Segundo De Vicenzi et al. (2000), estatragol tem ação genotóxica, mutagênica ou carcinogênicas, por isso sua importância toxicológica.

3.2 Potencial Zeta e Tamanho Nanopartículas Funcionalizadas

Na tabela 2, observamos os valores de potencial zeta e tamanho das partículas a partir da emulsificação da nanopartícula com óleos os essenciais, NOEH₁ apresentou valor de -14,4 mV de potencial zeta e 81nm quanto ao tamanho da partícula; NOEM₁ apresentou valor de -21 mV de potencial zeta e 127nm quanto ao tamanho da partícula; NOEC₁ apresentou valor de -32,9 mV de potencial zeta e 78 nm quanto ao tamanho da partícula. Antonioli (2019) desenvolveu nanocápsulas de PLA (poliácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão, com o propósito de liberação gradual do óleo no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, isolados de uva, observando valor de potencial

zeta -25,2mV. Pires; Moura (2017) observaram os seguintes valores de potenciais zeta das nanoemulsões dos óleos essenciais de limão (-24,6mV); copaíba (-24,7mV) e melaleuca (-26,8mV). Esses resultados são semelhantes aos valores de NOEH₁, NOEM₁ NOEC₁ encontrados nesta pesquisa. Segundo Manaia et al. (2012) e Lin et al. (2014), quanto mais negativo for o valor do potencial zeta e menor for o tamanho da partícula, mais estável será a nanopartícula.

Tabela 2- Valores de potencial zeta e tamanho das nanopartículas funcionalizadas com óleo essencial. NOEH₁ 1mL/L OE hortelã pimenta + 400mg/L Nanopartícula; NOEM₁: 1mL/L OE manjeriço + 400mg/L Nanopartícula; NOEC₁: 1mL/L OE Capim-limão + 400mg/L Nanopartícula.

Identificação	Potencial Zeta (mV)	Tamanho da partícula (nm)
NOEH ₁	-14.4	81nm
NOEM ₁	-21	127nm
NOEC ₁	-32,9	78nm

3.3 Bioensaios *in vitro* - Ação dos óleos essenciais no controle do *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*

A tabela 3 apresenta a taxa de inibição do crescimento micelial para os fungos *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina*. Pode-se observar que nos tratamentos OEH, OEM e OEC de cada ensaio, que continham óleos essenciais em diferentes concentrações, para NOE que continha OE associado à nanopartícula e T6 somente com fungicida, não se observou crescimento micelial (Tabela 2), ou seja, ICM = 100%. Por sua vez, nos tratamentos T5 (NP) e T7 (F) observou-se o crescimento micelial (Tabela 2): ICM= 4,4 % e ICM 0%, respectivamente. Esses resultados mostram a eficiência do OE mesmo em diferentes concentrações no controle *in vitro* do *M. cannonballus* e *M. phaseolina*, quando associado OE na menor concentração (1mL/L OE) com a nanopartícula também houve inibição do crescimento do patógeno ICM =100% para ambos os fungos, porém a nanopartícula sozinha (T5) não foi capaz de inibir o crescimento micelial, ICM= 4,4 %. Isso mostra que a nanopartícula não interfere na ação do OE e pode ser indicada como ferramenta de entrega do OE, contribuindo para manter a eficiência do produto.

Tabela 3- Taxa de Inibição do Crescimento Micelial (ICM) de *Monosporascus cannonballus* e *Macrophomina phaseolina* utilizando do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e nanopartícula funcionalizada com cada óleo. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Média da Taxa de Inibição do Crescimento Micelial- ICM (%)*		
Capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)		
TRATAMENTOS	<i>Monosporascus cannonballus</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
T1- OEC ₁	100% a	100% a
T2- OEC ₂	100% a	100% a
T3- OEC ₃	100% a	100% a
T4- NOEC ₁	100% a	100% a
T5- NP	4.4% b	5.7% b
T6-C	100% a	100% a
T7- F	0% b	0% b
Hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>)		
TRATAMENTOS	<i>Monosporascus cannonballus</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
T1- OEH ₁	100% a	100% a
T2- OEH ₂	100% a	100% a
T3- OEH ₃	100% a	100% a
T4- NOEH ₁	100% a	100% a
T5- NP	4.4% b	5.7% b
T6-C	100% a	100% a
T7- F	0% b	0% b
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)		
TRATAMENTOS	<i>Monosporascus cannonballus</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
T1- OEM ₁	100% a	100% a
T2- OEM ₂	100% a	100% a
T3- OEM ₃	100% a	100% a
T4- NOEM ₁	100% a	100% a
T5- NP	4.4% b	5.7% b
T6-C	100% a	100% a
T7- F	0% b	0% b

Tratamento 1 (OEC₁): 1mL/L OE Capim-limão; Tratamento 2 (OEC₂): 3mL/L OE Capim-limão; Tratamento 3 (OEC₃): 6mL/L OE Capim-limão; Tratamento 4 (NOEC₁): 1mL/L OE Capim-limão + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida e Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo. Tratamento 1 (OEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 2 (OEH₂): 3mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 3 (OEH₃): 6mL/L OE hortelã pimenta; Tratamento 4 (NOEH₁): 1mL/L OE hortelã pimenta + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida e Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo. Tratamento 1 (OEM₁): 1mL/L OE manjeriço; Tratamento 2 (OEM₂): 3mL/L OE manjeriço; Tratamento 3 (OEM₃): 6mL/L manjeriço; Tratamento 4 (NOEM₁): 1mL/L OE manjeriço + 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 5 (NP): 20mg/L Nanopartícula; Tratamento 6 (C): 100g/L fungicida e Tratamento 7 (F): testemunha, apenas o fungo.

Moreira (2014) ressalta a importância de estratégias para evitar a instabilidade química criada pelo ar, luz, altas temperaturas e umidade, sendo esses os fatores responsáveis pela rápida degradação e evaporação dos princípios ativos dos óleos essenciais, o que inibe sua ação em longo prazo. Lima (2020) observou que com a utilização de nanopartículas para construções das nanoformulações com OE há o acoplamento dos compostos bioativos provenientes dos OEs, dependendo dos grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas. Essa associação OE + nanopartícula pode melhorar a solubilidade dos compostos bioativos presentes na constituição dos OEs utilizados, aumentar a estabilidade aquosa, diminuir o custo da utilização, diminuir o uso dos OEs, torná-los eco amigáveis, evitar oxidação e fotodegradação, dentre outros (LIMA, 2020).

Lee et al. (2021) obtiveram sucesso no controle *in vitro* do *Aspergillus flavus* isolado de trigo (ICM= 100%) utilizando o OE de capim-limão. Dias (2020), avaliando *in vitro* a inibição de dois isolados *M. phaseolina*, de feijão-caupi, sobre ação do OE capim limão, observou ICM de 100% nas maiores concentrações do OE.

Khaledi et al. (2015) avaliaram o efeito antifúngico de diversos óleos vegetais, dentre eles hortelã –pimenta no controle *M. phaseolina* isolado do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), observaram que o óleo apresentou efeito inibidor do crescimento em 100% na concentração de 2000ppm. Santos et al. (2017) avaliaram o efeito do OE de hortelã-pimenta no controle *in vitro* de *M. phaseolina* isolado obtido de raízes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), constatando que em todos os tratamentos à base do óleo essencial de hortelã houveram inibição no crescimento micelial, com variação no percentual de inibição de 33,9% a 54,4%.

Gomes et al. (2016), estudando a eficiência dos óleos essenciais, dentre eles o manjeriço, observaram redução da incidência de fungos associados às sementes de feijão-fava. Tico et al. (2019) observaram que OE de manjeriço apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre *Fusarium* sp., isolado da cana de açúcar, reduzindo o crescimento da colônia e esporulação em 100%. Khaledi et al. (2015) verificaram que ao utilizar os óleos essenciais de manjeriço na concentração de 2000 ppm inibiram 100% o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, patógeno radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Fernandes et al. (2015), avaliando fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *M. cannonballus*, verificaram que tanto o óleo quanto o extrato proporcionaram percentual de inibição de 100% do fungo.

Foi possível identificar relatos na literatura quanto ao controle de *M. phaseolina* utilizando óleos essenciais, porém com isolados fúngicos de feijão. Para *M. cannonballus*, são

poucos os trabalhos envolvendo seu controle por meio de OE, sendo necessárias, portanto, mais pesquisas. Brum (2012) afirma que a capacidade dos OE de dissolver-se em meio lipídico permite que haja uma harmonia entre o óleo e os componentes lipídicos presentes nas células dos patógenos, causando modificações na sua estrutura, sendo essa a causa do sucesso no controle de fitopatógenos por meio da utilização de OE. Por isso são promissoras avaliações visando a essa forma de controle, em especial para fitopatógenos que necessitam de métodos de controle específicos, eficientes e sustentáveis, como é o caso desses dois patógenos, *M. phaseolina* e *M. cannonballus*, isolados de meloeiro.

4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de capim-limão, hortelã-pimenta e manjeriço apresentaram efeito inibitório *in vitro* sobre *M. cannonballus* e *M. phaseolina*, isolados de meloeiro. *In vitro*, a associação do OE com nanopartícula demonstrou que a nanopartícula não interfere na ação do OE e pode ser indicada como ferramenta de entrega dele, contribuindo para aumentar a eficiência do produto.

REFERÊNCIAS

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. A atividade anti-biofilme de óleos essenciais de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) e toranja (*Citrus paradisi*) sobre cinco isolados de *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p. 1217-1227, 2012

ANTONIOLI, G. **Desenvolvimento de nanocápsulas de poli (ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos**. 2019. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.

AZEVEDO, I.L.et al., 2016 Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* STEUD. WATS.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**. 10. 25. 10.21708/avb.2016.10.1.5467.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and chemical toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008

BARROS, A. P. Defensivos Alternativos na Agricultura Familiar de Araguatins-TO. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 1, n. 1, 2017.

BRUM, R. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. 2012. 135f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins (UFT). Gurupi, TO, 2012.

COSGE, B.; KIRALAN, M.; GÜRBÜZ, B. Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. vulgare) growing in Turkey. *Natural Product Research*, v. 22, p. 1011-1016, 2008.

DE VINCENZI M, SILANO M, MAIALETTI F, SCAZZOCCHIO B. Constituents of aromatic plants: Ii. Estragole. *Fitoterapia*. 2000; 71:725–729.

DIAS, A. M. **Diversidade genética de *Macrophomina phaseolina* e o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* no seu crescimento *in vitro***. 2020. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2020.

EDRIS, A.E.; FARRAG, E.S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their majol aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung*, v.47, n.2, p.117-121, 2003

FEJÉR, J. G.; GRUL'OVÁ, D.; DE FEOB, V.; ÜRGEOVÁC, E.; OBERTD, B.; PRET'OVÁC, A. *Mentha* × *piperita* L. nodal segments cultures and their essential oil production. **Industrial Crops & Products**, 550-555. 2018.

FERNANDES, L.C. B. et al. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathologica**, FapUNIFESP [s.l.], v. 41, n. 2, p.153-155, 2015.

FERNANDES, M. C. A.; LEITE, E. C. B.; MOREIRA, V. E. **Defensivos alternativos**. Ferramenta para uma agricultura ecológica, não poluente, produtora de alimentos sadios. Niterói: PESAGRO-RIO, 2006. p. 22.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. D. S.; GONÇALVES, M. G.; JÚNIOR, P.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 45-50, 2015.

FREIRE, M.M. 2022. Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). Timburi-SP. Editora Cia do eBook.

GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, v. 3, p. 56-65, 2009.

GOMES, R.S.S. & NUNES, M.C. & NASCIMENTO, L.C. & SOUZA, J.O. & PORCINO, M.M.. (2016). Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18. 279-287. 10.1590/1983-084X/15_117.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 3943-3946

KHALEDI, NIMA; TAHERI, PARISSA; TARIGHI, SAEED. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of applied microbiology**, v.118, n.3, p. 704-717, 2015

LEAL-CARDOSO, J. H.; MATOS-BRITO, B. G.; LOPES-JUNIOR, J. E.; VIANA-CARDOSO, K. V.; SAMPAIO-FREITAS, A. B.; BRASIL, R. O.; COELHO-DE SOUZA, A. N.; ALBUQUERQUE, A. A. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1193-1198, 2004.

LEE, L. T. et al. Controle de *Aspergillus flavus* em grãos de trigo utilizando óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*. **Acta Brasiliensis**, [SI], v. 5, n. 3, p. 92-96, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.22571/2526-4338528>. Acesso em: 23 mar. 2022.

LIMA, J. D. **Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura**. 2020. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

LIN, P.-C.; LIN, S.; WANG, P.C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA, 2008. 544p

MANAIA, E. B. et al. Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO₂ nanoparticles obtained by sol-gel process. *Journal of sol-gel Science and Technology*, v. 63, n. 2, p. 251-257, 2012.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27: S4050-S4063, 2009.

MOREIRA, A. C. G. **Microencapsulação de óleos essenciais**. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química) - Universidade do Porto, Porto, 2014.

MOURA, E. S. **Atividade inseticida dos óleos essenciais de manjeriço e candeieiro e seus componentes sobre *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)**. 2015. 41f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

NAIR, A.; MALLYA, R.; SUVARNA, V.; KHAN, T. A.; MOMIN, M.; OMRI, A. **Nanoparticles—Attractive Carriers of Antimicrobial Essential Oils**. *Antibiotics* 2022, 11, 108. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010108>. Acesso em: 25 mar. 2022.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Prevalent weeds collected from cucurbit fields in Northeastern Brazil reveal new species diversity in the genus *Monosporascus*. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 3, p. 349-363, 2019. <https://doi.org/10.1111/aab.12493>

NUZHAT, T.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, Suppl. 2, p. 19-28, 2013.

PANDEY, A.K.; RAI, M.K.; ACHARYA, D. Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of CornMint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. *Pharmaceutical Biology*. V.41, n.6, p.421-425, 2003. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.421.17825>

PIRES, V.G.A.; MOURA, M.R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. *Quim. Nova*, Vol. 40, No. 1, 1-5, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160130>

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SAMURKAS, A.; YAO, L.; HADIATULLAH, H.; RUIFANG, M.; YUNXUN, X.; RAJAMANIKANDAN, S.; HAN, Z.; ZHIGUANG, Y. Receptor de Ryanodina como alvo de inseticida. **Projeto Farmacêutico Atual**, v. 28, p. 26-35, 2021. Disponível em: 10.2174/1381612827666210902150224. Acesso em: 14 mar. 2022.

SANTOS, A.B. et al. 2017. FUNGITOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ EM *Macrophomina phaseolina* (Tassi.). Goid. In: Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia CONTECC'2017 Hangar Convenções e Feiras da Amazônia - Belém - PA 8 a 11 de agosto de 2017.

SANTOS, P.S.; FREITAS, R.M. Atividades ansiolítica e anticonvulsivante de constituintes de óleos essenciais. *Revista interdisciplinar*, v.6, n.1, p.105-111, 2013.

SAWADOGO, I.; PARÉ, A.; KABORÉ, D.; MONTET, D.; DURAND, N.; BOUAJILA, J.; ZIDA, E. P.; SAWADOGO-LINGANI, H.; NIKIÉMA, P. A.; NEBIÉ, R. H. C. et al. Antifungal and Antiaflatoxinogenic Effects of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, and *Cymbopogon schoenanthus* Essential Oils Alone and in Combination. **J. Fungi**, 8, 117, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8020117>. Acesso em: 26 mar. 2022.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 125-132.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 467-495

SOLIMAN, S. A. et al. Biochemical Characterization, Antifungal Activity, and Relative Gene Expression of Two *Mentha* Essential Oils Controlling *Fusarium oxysporum*, the Causal Agent of *Lycopersicon esculentum* Root Rot. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants1102018>. Acesso em: 26 mar. 2022.

SUMALAN, R. M. et al. Assessment of mint, basil, and lavender essential oil vapor-phase in antifungal protection and lemon fruit quality. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25081831>. Acesso em: 26 mar. 2022.

TICO, B.M. et al. 2019. Óleos essenciais no controle do *Fusarium* sp. da cana de açúcar *in vitro*. Revista Brasileira de Meio Ambiente, v.7, n.3. 070-079 (2019). <https://doi.org/10.5281/zenodo.3595058>

VELOSO, R.A.; CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A; CARDOSO, D.P.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; SCHEIDT, G.N. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). Rev. bras. plantas med ; 16 (2,supl.1): 364-371, 2014. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_180

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.). Found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, Nova Iorque, v. 54, p. 207-16, 2000.

ANEXO I



FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP:17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bioessencia.com.br
 www.bioessencia.com.br @bio_essencia

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Óleo essencial de Capim Limão (*Cymbopogon flexuosus*)

LOTE	210413
DATA DE VALIDADE	11/2022
DATA DE FABRICAÇÃO	11/2020
ORIGEM	BRASIL
MÉTODO DE EXTRAÇÃO	DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR DAS FOLHAS
RESULTADO	APROVADO

TESTE	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
ASPECTO	LÍQUIDO LÍMPIDO	OK
COR	AMARELO CLARO À AMARELO	OK
ODOR	CARACTERÍSTICO	OK
DENSIDADE (20°C)	0,865 – 0,902	0,892
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20°C)	1,480 – 1,490	1,484

Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado.

Não contem OGM, nem foi utilizado para teste em animais.

Produto 100% puro, isento de solvente e diluente.

Segundo RDC 481/99, não suscetível à contaminação microbiológica.

Responsável Técnica: Gorete Vieira de Souza - CRQ 044100922



Produto certificado pelo IBD.



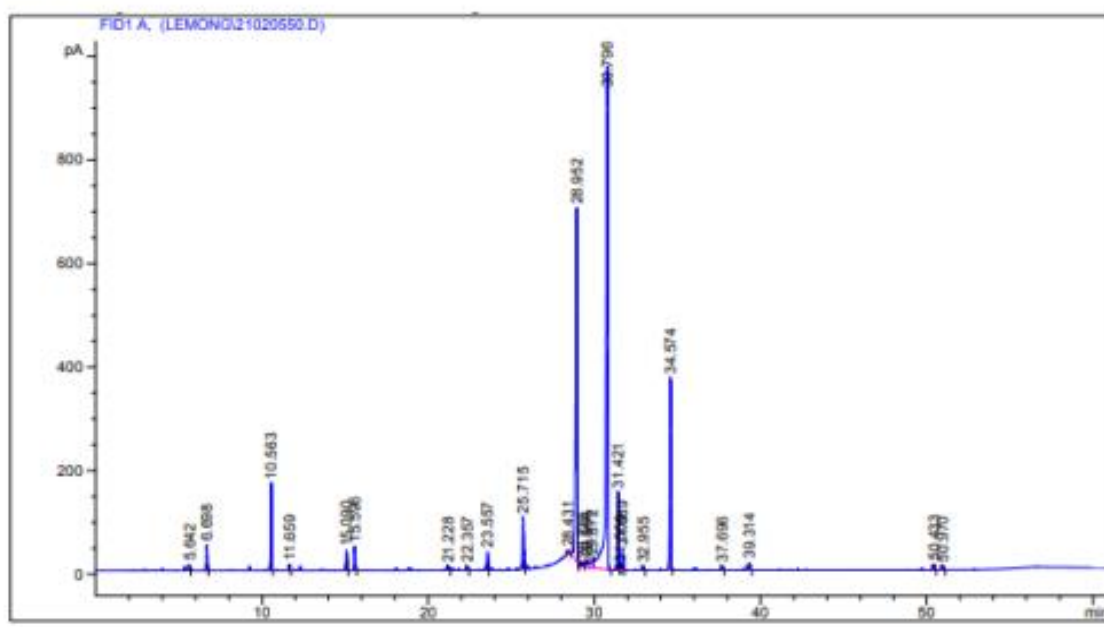
FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP:17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bioessencia.com.br
 www.bioessencia.com.br @bio_essencia

Este documento apresenta uma cópia idêntica da cromatografia disponibilizada pelo fornecedor.

CROMATOGRAFIA

Óleo essencial de Capim Limão (*Cymbopogon flexuosus*)

Lote: 210413



Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %	
1	5.642	BP	0.0478	31.24242	9.91154	0.19000	ALFA PINENO
2	6.698	BB	0.0492	154.48273	48.48559	0.93946	CANFENO
3	10.563	BB	0.0532	580.19525	168.45320	3.52836	LIMONENO
4	11.659	BP	0.0531	36.40285	10.59931	0.22138	
5	15.090	BB	0.0561	136.64157	37.85891	0.83096	
6	15.596	BB	0.0604	176.25571	46.35325	1.07187	
7	21.228	VV	0.0723	30.31791	6.63135	0.18437	
8	22.357	BB	0.0665	34.54251	8.13648	0.21006	
9	23.557	FP	0.0577	132.71912	35.40459	0.80711	LINALOL
10	25.715	BB	0.0680	438.12589	100.23129	2.66439	
11	28.431	BB	0.0701	34.49458	6.27607	0.20977	
12	28.952	BP	0.0838	4150.68506	683.63953	25.24170	NERAL
13	29.326	VV	0.0990	52.71490	7.14941	0.32058	ALFA TERPINEOL
14	29.556	VV	0.1153	93.23670	11.17728	0.56700	
15	29.872	VV	0.1647	197.94600	15.95426	1.20378	
16	30.796	VP	0.1032	7561.35889	967.54639	45.98315	GERANIAL
17	31.421	VV	0.0635	612.12561	150.19077	3.72254	ACETATO DE GERANILA
18	31.569	VV	0.0617	35.62835	8.90731	0.21667	



FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP:17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bioessencia.com.br
 www.bioessencia.com.br @bio_essencia

Este documento apresenta uma cópia idêntica da cromatografia disponibilizada pelo fornecedor.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
19	31.689	VB	0.0674	165.78687	38.40071	1.00821
20	32.955	PB	0.0640	26.20255	6.50112	0.15935
21	34.574	BB	0.0655	1571.58081	370.10535	9.55731-GERANIOL
22	37.696	BB	0.0654	33.43771	7.89563	0.20335
23	39.314	BP	0.0788	73.15191	13.80200	0.44486
24	50.433	BB	0.0749	46.13606	9.80428	0.28057
25	50.970	PB	0.0775	38.34903	7.77787	0.23321

Totals : 1.64438e4 2777.19347

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***



FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP: 17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bioessencia.com.br
 www.bioessencia.com.br @bio_essencia

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Óleo Essencial de Hortelã Pimenta (*Mentha piperita*)

LOTE	210802
DATA DE VALIDADE	01/2023
DATA DE FABRICAÇÃO	01/2021
ORIGEM	ÍNDIA
MÉTODO DE EXTRAÇÃO	DESTILAÇÃO A VAPOR DAS FOLHAS
RESULTADO	APROVADO

TESTE	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
ASPECTO	LÍQUIDO	OK
COR	INCOLOR A AMARELO PALHA	OK
ODOR	CARACTERÍSTICO	OK
DENSIDADE (20°C)	0.890 - 0.910	0.898
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20°C)	1.450 - 1.470	1.450
ROTAÇÃO ÓPTICA (20°C)	-10° A -30°	-23,9°

Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado.

Não contem OGM, nem foi utilizado para teste em animais.

Produto 100% puro, isento de solvente e diluente.

Segundo RDC 481/99, não suscetível à contaminação microbológica.

Responsável Técnica: Gorete Vieira de Souza - CRQ 044100922



Produto certificado pelo IBD.



FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP: 17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bioessencia.com.br
 www.bioessencia.com.br @bio_essencia

Este documento apresenta uma cópia idêntica da cromatografia disponibilizada pelo fornecedor.

CROMATOGRAFIA

Óleo Essencial de Hortelã Pimenta (*Mentha piperita*)

Lote: 210802

Componentes	%
Mentol	42,76
Mentona	24,77
Eucaliptol (1,8-cineol)	6,08
Acetato de metila	5,50
Neomentol	4,43
Isomentona	3,30
Limoneno	2,76
Beta cariofileno	2,12
Pulegone	0,76
Metofuran	1,67
Trans-hidrato de sabineno	0,13
Octanol-3	0,13
Isopulegol	0,10
Carvone	0,05

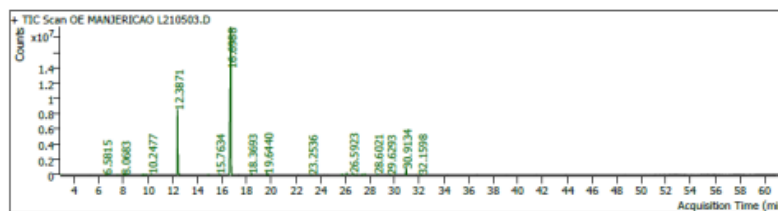


FLORANANDA IND. E COM. DE COSMÉTICOS E PRODUTOS NATURAIS LTDA ME
 Rua Elias Bichara Tabbal, 736. Jd. América - Jaú, SP
 CEP: 17210-680 | Indústria Brasileira
 +55 (14) 34160822 SAC: sac@bloessencia.com.br
 www.bloessencia.com.br @bio_essencia

Este documento apresenta uma cópia idêntica da cromatografia disponibilizada pelo fornecedor.

CROMATOGRAFIA

Óleo Essencial de Manjeriço (*Ocimum basilicum*)
 Lote: 210503



Pk #	RT Min	Compound Name	CAS#	Peak Area	Component RI	Library RI	Match Factor	% of Total
1	2.9272	Methyl vinyl ketone	78-94-4	11556.4	811	-	82.37	0.01
5	6.5815	alpha-Pinene	7785-26-4	94890.7	934	14601116	92.79	0.07
6	7.5004	BENZALDEIDO 6.1639	100-52-7	7622.1	965	15	82.60	0.01
8	7.9505	PINENE-<BETA-> 7.3685	127-91-3	42823.3	981	982	89.95	0.03
9	8.0683	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	110-93-0	89400.9	985	-	89.72	0.06
10	8.1908	BETA-THUJENE 7.3047	28634-89-1	23218.4	989	873	84.63	0.02
13	9.5149	CYMENE-<PARA-> 8.8647	99-87-6	23101.1	1026	1050	87.76	0.02
14	9.5762	2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	118202.9	1028	-	95.85	0.09
15	9.6869	D-LIMONENE 9.0132	5989-27-5	44852.0	1030	1054	90.06	0.03
16	9.8495	Eucalyptol	470-82-6	122895.9	1035	-	92.24	0.09
17	10.2477	3-Carene	13466-78-9	207512.9	1045	-	96.68	0.15
23	12.3871	LINALOOL 11.4768	78-70-6	26637254.8	1101	1101	99.53	19.27
27	14.8563	L-MENTHON 13.9917	140793-97-3	24025.4	1159	-	77.12	0.02
30	15.7634	L-MENTHOL 13.8893	2616-51-5	230208.0	1181	-	94.11	0.17
33	16.6988	ESTRAGOLE 15.7729	140-67-0	104442872.0	1203	1225	99.88	75.55
36	18.3693	CITRAL-<Z-> 17.4740 (NERAL)	106-26-3	317183.3	1241	-	94.64	0.23
41	19.6440	CITRAL-<E-> 18.7487 (GERANIAL)	141-27-5	550580.9	1270	-	95.61	0.40
44	23.2536	Eugenol	97-53-0	20961.0	1354	-	87.80	0.02
50	25.7087	Longifolene	475-20-7	217273.2	1413	-	94.39	0.16
51	26.0928	beta-Caryophyllene	87-44-5	609411.5	1422	12939760	98.32	0.44
53	26.5923	cis-alpha-Bergamotene	18252-46-5	664037.9	1434	65	97.24	0.48
54	26.9009	25.11 Funebrene-<2-epi-beta->	854154-72-6	37154.0	1442	-	81.87	0.03
55	27.3627	(E)-beta-Famesene	18794-84-8	94889.1	1453	-	88.47	0.07
56	27.5677	26.82 Humulene-<alpha->	6753-98-6	303335.2	1458	-	92.69	0.22
57	28.6021	28.15 Germacrene D	23986-74-5	204948.6	1483	-	88.08	0.15
63	29.6293	beta-Bisabolene	495-61-4	44837.9	1509	-	80.97	0.03
66	30.9134	Bisabolene	495-62-5	2422441.3	1542	65683	94.93	1.75
68	32.1598	4-Methoxycinnamaldehyde	1963-36-6	102935.8	1574	-	90.17	0.07