



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS NATURAIS

RODRIGO NOBRE DE SOUZA BORBA

**BIOINSUMO A BASE DE NEEM INDIANO E CRAVO-DA-ÍNDIA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DA ANTRACNOSE DO CAJUEIRO-ANÃO**

FORTALEZA – CEARÁ

2026

RODRIGO NOBRE DE SOUZA BORBA

BIOINSUMO A BASE DE NEEM INDIANO E CRAVO-DA-ÍNDIA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DA ANTRACNOSE DO CAJUEIRO-ANÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Naturais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Ciências Naturais. Área de Concentração: Reaproveitamento de Recursos Naturais.

Orientador: Prof^o. Dr. Carlúcio Roberto Alves

FORTALEZA – CEARÁ

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Borba, Rodrigo Nobre de Souza

Bioinsumo a base de neem indiano e cravo-da-índia como alternativa de controle da antracnose do cajueiro-anão [recurso eletrônico] / Rodrigo Nobre de Souza Borba. - 2026. 65 f. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia, Curso de Mestrado Acadêmico - Programa de Pós-graduação Em Ciências Naturais, Fortaleza, 2026.

Orientação: Prof. Pós-Dr. Carlucio Roberto Alves.

1. Produtos naturais, Cajueiro, Colletotrichum ssp. I. Título.



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do fevereiro de dois mil e vinte e seis, no(a) Sala Graviola da Embrapa Agroindústria Tropical, realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação de RODRIGO NOBRE DE SOUZA BORBA, aluno(a) regularmente matriculado(a) no MESTRADO ACADÊMICO - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS - PPGCN-MA, intitulada: **BIOINSUMO A BASE DE NEEM INDIANO E CRAVO-DA-ÍNDIA COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DA ANTRACNOSE DO CAJUEIRO-ANÃO**. O(A) mestrando(a) reuniu-se com a Banca Examinadora composta por Prof. Dr. CARLUCIO ROBERTO ALVES (Orientador e Presidente da Banca/UECE), Profa. Dra. CHRISTIANA DE FÁTIMA BRUCE DA SILVA (Embrapa Agroindústria Tropical), Profa. Dra. ANA LÚCIA EUFRÁZIO ROMÃO (UECE) e Prof. Dr. MARLON VAGNER VALENTIM MARTINS (Embrapa Agroindústria Tropical) de 09:00h às 12:00 horas. Inicialmente o(a) mestrando(a) expôs seu trabalho e em seguida procedeu-se à arguição pelos membros da Banca, dispondo cada membro de tempo para tal. Finalmente a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o(a) mestrando(a) aprovado(a) 9,0, por sua dissertação e sua defesa pública. Eu, Dr. Carlúcio Roberto Alves, presidente da banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim e os demais membros. Fortaleza, 27 de fevereiro de 2026.

Carlúcio Roberto Alves

Prof. Dr. CARLUCIO ROBERTO ALVES
(Orientador e Presidente da Banca/UECE)

Christiana de Fátima Bruce da Silva

Profa. Dra. CHRISTIANA DE FÁTIMA BRUCE DA SILVA
(Embrapa Agroindústria Tropical)

Ana Lúcia Eufrazio Romão

Profa. Dra. ANA LÚCIA EUFRÁZIO ROMÃO
(UECE)

Marlon Wagner Valentim Martins

Prof. Dr. MARLON VAGNER VALENTIM MARTINS
(Embrapa Agroindústria Tropical)

Dedico esse trabalho a minha família e a todos os meus ancestrais que não tiveram a oportunidade de acessar espaços de conhecimento como me foi possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu forças e sabedoria para uma caminhada acadêmica inenarrável.

Aos meus pais, Sergio Ricardo e Regina Lúcia pelo incentivo durante o processo, me dando todo o suporte necessário, fazendo o possível e o impossível para a realização de um sonho.

Aos meus irmãos, Rafael Nobre e Letícia Nobre, pois, se eu estou aqui hoje, foi pela força e pelo carinho que vocês me dão todos os dias.

Aos amigos que sonharam com esse título junto comigo, Anna Albie, Roberta Damaceno, Erika Lanzarin, Joyce Gomes, Thais Oliveira, Lilia Vasconcelos, Fábio Costa e Alexandre Araujo, veio muito ai.

As Divas Haydee Schaumann e Amanda Batista, esse tempo foi muito mais leve ao lado de vocês.

Aos amigos que encontrei durante essa jornada, Taysse Holanda, Denilson Oliveira, Eduardo Oliveira e a Letícia Rejane vocês foram essenciais durante todo o processo.

À Dra. Ana Lucia Eufrázio pelas instruções e suporte fornecidos.

Ao Professor Carlucio Roberto Alves e ao Professor Marlon Vagner Valentin Martins que me orientaram durante a execução do trabalho e me forneceram condições para que este fosse executado.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Ambiental (LaNA) e ao Laboratório de Fitopatologia (Embrapa Agroindústria Tropical)

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap)

RESUMO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) é uma planta frutífera amplamente disseminada no nordeste brasileiro, apresentando-se como de suma importância para a socioeconomia local. No que diz respeito as doenças do cajueiro, a antracnose causada por várias espécies do gênero *Colletotrichum* ssp. se configura uma das doenças fúngicas com maior importância do cultivar, com maior incidência em regiões litorâneas e nos sertões de altitude. O controle da doença sobre o cultivo já é muito bem determinada com o emprego de agentes fungicidas químicos sintéticos, podas de limpeza e técnicas fitossanitárias. Contudo, o presente trabalho teve como objetivo entender como se comporta (*in vitro* e *in vivo*) o agente causal da antracnose em cajueiro frente uma formulação antifúngico natural patenteada a base de extrato etanólico de raiz de neem indiano e óleo essencial de cravo-da-índia. Para os ensaios *in vitro* foi utilizada a) metodologia de crescimento micelial em meio de cultura e b) a quantificação da germinação de conídio em 24h utilizando diferentes concentrações da formulação variando de 200-2000 mg.L⁻¹ para ambos os ensaios. Para o estudo *in vivo* foi usada a metodologia de disco de folha, onde a formulação foi aplicada sobre o disco em diferentes concentrações (1200-2000 mg.L⁻¹) e diferentes espaços de tempo (0, 3 e 7 dias) entre a aplicação da formulação e a inoculação do patógeno. De acordo com os dados coletados para o estudo *in vitro* foi observado que as concentrações de 200, 400 e 600 mg.L⁻¹, não influenciaram significativamente a inibição do crescimento micelial, já nas concentrações mais elevadas 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 mg.L⁻¹, observou-se atrasos no crescimento micelial medidos nos 3, 4, 4, 7 e 8 dias, respectivamente. Nas duas doses mais elevadas (1800 e 2000 mg.L⁻¹) o efeito residual da formulação tem maior poder de inibir o crescimento micelial por muito mais tempo, onde a concentração de 2000 mg.L⁻¹ inibiu o crescimento fúngico cerca de 85,82%. A aplicação da formulação potencializou a formação do tubo germinativo dos conídios em todas as concentrações testadas, contudo não foi possível observar formação de apressório nos tubos germinados. De acordo com resultados do ensaio *in vivo* em disco de folha foi possível observar que todas as concentrações aplicadas no dia 0 não apresentaram potencial em inibir a ação do fungo sobre o tecido foliar em comparação com o dia 7, onde a severidade se mostrou estatisticamente menor. Com isso, a formulação natural é uma alternativa para o controle da antracnose.

Palavras-chaves: Produtos naturais; Cajueiro; *Colletotrichum* ssp;

ABSTRACT

The cashew tree (*Anacardium occidentale*, L.) is a fruit-bearing plant widely distributed in northeastern Brazil, and is of paramount importance to the local socio-economy. Regarding cashew tree diseases, anthracnose, caused by various species of the genus *Colletotrichum* ssp., is one of the most important fungal diseases affecting this cultivar, with a higher incidence in coastal regions and high-altitude hinterlands. Disease control in the cultivar is already well established through the use of synthetic chemical fungicides, pruning, and phytosanitary techniques. However, this study aimed to understand the behavior (in vitro and in vivo) of the causal agent of anthracnose in cashew trees in response to a patented natural antifungal formulation based on an ethanolic extract of Indian neem root and clove essential oil. For the in vitro assays, a) the mycelial growth methodology in culture medium was used, and b) the quantification of conidium germination in 24h was performed using different concentrations of the formulation ranging from 200-2000 mg.L⁻¹ for both assays. For the in vivo study, the leaf disc methodology was used, where the formulation was applied to the disc at different concentrations (1200-2000 mg.L⁻¹) and different time intervals (0, 3, and 7 days) between the application of the formulation and the inoculation of the pathogen. According to the data collected for the in vitro study, it was observed that concentrations of 200, 400, and 600 mg.L⁻¹ did not significantly influence the inhibition of mycelial growth. However, at the higher concentrations of 1200, 1400, 1600, 1800, and 2000 mg.L⁻¹, delays in mycelial growth were observed, measured at 3, 4, 4, 7, and 8 days, respectively. At the two highest doses (1800 and 2000 mg.L⁻¹), the residual effect of the formulation had a greater power to inhibit mycelial growth for a much longer time, where the concentration of 2000 mg.L⁻¹ inhibited fungal growth by approximately 85.82%. The application of the formulation potentiated the formation of the conidial germ tube at all tested concentrations; however, appressorium formation was not observed in the germinated tubes. According to the results of the in vivo leaf disc assay, it was observed that all concentrations applied on day 0 did not show potential to inhibit the action of the fungus on the leaf tissue compared to day 7, where the severity was statistically lower. Therefore, the natural formulation is an alternative for the control of anthracnose.

Keywords: Natural products; Cashew tree; *Colletotrichum* ssp;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L., o cajueiro (CLONE ‘CCP 76’ - EMBRAPA).....	17
Figura 2 - Imagem dos sintomas característicos da antracnose em diversos órgãos de <i>Anacardium occidentale</i>: folhas (a-c), hastes (d-e), pseudofrutos (pedúnculos) (f-g) e fruto (castanha) (h).....	20
Figura 3 - Imagem do neem indiano (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).....	21
Figura 4 - Imagem da representação estrutural de compostos identificados provisoriamente no extrato hidroetanólico das raízes de <i>Azadirachta indica</i> por UPLC-QTOF-MSE.....	23
Figura 5 - Imagem da árvore (a), folha (b), frutos (c) e botões florais (d) secos do cravo-da-índia.....	24
Figura 6 - Imagem representativa da estrutura do eugenol.....	25
Figura 7 - Crescimento radial (dia 7) in vitro de <i>Colletotrichum</i> spp. frente aos extratos vegetais com atividade antifúngica, submetidos a diferentes metodologias de esterilização/desinfestação.....	32
Figura 8 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial, in vitro de <i>Colletotrichum</i> spp. frente aos extratos vegetais com atividade antifúngica, submetidos a diferentes metodologias de esterilização/desinfestação.....	33
Figura 9 - Representação estrutural da Azadirachtina (A) e do eugenol (B)..	38
Figura 10 - Efeito das diferentes concentrações da formulação (200-2000 mg.L⁻¹), controle negativo (apenas fungo) e controle positivo (fungicida comercial) sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio BDA	43
Figura 11 - Atividade do antifúngico natural/AFN (200-2000 mg.L⁻¹) sobre o crescimento radial do micélio de <i>Colletotrichum</i> spp. in vitro (14 dias)	43
Figura 12 - Efeito do tempo de exposição sobre o crescimento radial diário in vitro de <i>Colletotrichum</i> spp. às diferentes doses da formulação.....	44
Figura 13 - Efeito das doses da formulação (200-2000 mg.L⁻¹), controle positivo e controle negativo sobre o percentual de inibição do	

crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura BDA, em 14 dias	46
Figura 14 - Efeito das doses (200-2000 mg.L ⁻¹) da formulação sobre a germinação dos conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura BDA, após 24 horas	47
Figura 15 - Aspecto visual de discos de folha de <i>Anacardium occidentale</i> submetidos a diferentes tratamentos e inoculação com <i>Colletotrichum</i> spp.....	48
Figura 16 - Efeito das diferentes concentrações da formulação sobre o período de incubação do <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha de cajueiro (A) e influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) no período de incubação do <i>Colletotrichum</i> spp em discos de folha de cajueiro (B).....	49
Figura 17 - Efeito das diferentes concentrações da formulação sobre o período de latência do <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha de cajueiro (A) e influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) no período de latência do <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha.....	51
Figura 18 - Efeito de diferentes concentrações do produto natural sobre a severidade da antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha de <i>Anacardium occidentale</i> (A) e Influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) sobre a severidade (B).....	52
Figura 19 - Comparação visual da severidade da antracnose sob diferentes concentrações da formulação (1200-2000 mg.L ⁻¹), controle negativo (apenas fungo) e controle positivo (fungicida comercial) e períodos de inoculação em dias.....	53
Figura 20 - Efeito das concentrações do tratamento sobre a produção de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. (A) e produção média de conídios em diferentes períodos de inoculação (B).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metodologias de esterilização/desinfestação dos extratos etanólicos de raiz de neem indiano e óleo essencial de cravo-da-índia na formulação de 2000 mg.L⁻¹ para a inibição do fungo <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
Tabela 2 - Concentrações utilizadas de AFN e TN para os ensaios do crescimento micelial e germinação de conídios do fungo <i>Colletotrichum</i> spp.....	41
Tabela 3 - Porcentagem de conídios germinados de <i>Colletotrichum</i> spp. após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do antifúngico natural (A-N).....	47
Tabela 4 - Período de incubação de <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha de <i>Anacardium occidentale</i> submetidos a diferentes concentrações do produto natural e tempos de inoculação.....	49
Tabela 5 - Período de latência de <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folha de <i>Anacardium occidentale</i> submetidos a diferentes concentrações de produto natural e tempos de inoculação.....	50
Tabela 6 - Severidade da antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folhas de <i>Anacardium occidentale</i> submetidos a diferentes concentrações da formulação e tempos de inoculação...	52
Tabela 7 - Produção média de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. sob diferentes concentrações (mg L⁻¹) e tempos de incubação.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	17
3.2	Doenças do cajueiro	18
3.2.1	Antracnose (<i>Colletotrichum</i> spp.)	18
3.3	Produtos naturais	20
3.3.1	Neem indiano (<i>Azadiracta indica</i> A. JUSS)	20
3.3.2	Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	24
3.3.3	Compostos bioativos	26
4	ESTERILIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS	28
4.1	Introdução	28
4.2	Material e métodos	29
4.2.1	Extração e formulação	29
4.2.2	Esterilização da formulação	29
4.2.3	Teste in vitro sobre o fungo <i>Colletotrichum</i> spp.	30
4.3	Resultados e discussão	31
4.4	Conclusão	34
	REFERÊNCIAS	34
5	BIOINSUMO À BASE DE EXTRATO DE NEEM ÓLEO E CRAVO- DA-ÍNDIA NA INIBIÇÃO DE <i>in vitro</i> E <i>in vivo</i> DO AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO CAJUEIRO NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Coletotrichum</i>	36
5.1	Introdução	37
5.2	Material e métodos	39
5.2.1	Formulação	39
5.2.2	Ensaio de inibição in vitro do crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. submetidos a formulação em diferentes concentrações (200-2000 mg.L ⁻¹)	40

5.2.3	Ensaio de inibição in vitro da germinação de conídios do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. submetidos a formulação em diferentes concentrações (200-2000 mg.L ⁻¹)	40
5.2.4	Ensaio de inibição in vivo em disco de folhas do agente causal da antracnose do submetidos a formulação em diferentes concentrações (1200-2000 mg.L ⁻¹)	41
5.3	Resultados e discussão	42
5.4	Conclusão	55
	REFERÊNCIAS	55
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta frutífera amplamente disseminada no Nordeste brasileiro, com grande importância socioeconômica para a região (Almeida *et al.* 2017). Com o passar dos anos a cajucultura tornou-se umas das atividades agrícolas mais rentáveis para o agronegócio brasileiro, tanto pela sua produção no campo, quanto pelo valor nutricional do fruto, além de possuir elevada importância para as indústrias de cosmetologia, farmacologia, e o aproveitamento do bagaço do pseudofruto na culinária (Olufemi, Abanum, e Christerbeth 2023).

O fruto verdadeiro, conhecido como castanha de caju, segue sendo o principal produto da cajucultura, de onde se obtêm a amêndoa e o líquido da casca da castanha (LCC), empregado na indústria química, onde em sua maioria é destinado ao mercado externo. O pseudofruto, ou pedúnculo, comumente consumido *in natura*, além de ser base empregado como matéria-prima na fabricação de doces e bebidas, como exemplo a cajuína, conhecida por ser uma bebida refrescante, saborosa, natural e sem aditivos químicos (Carvalho, 2010).

Desde a década de 70 a cajucultura passa por um avanço tecnológico na implementação de técnicas modernas de manejo. Com o desenvolvimento de clones do tipo anão o manejo da cultura no campo foi facilitado, a melhora na uniformidade do produto final e a exploração do mercado do pedúnculo. Em contra partida, tais avanços ocasionaram a redução da variabilidade genética, o que eleva a vulnerabilidade das plantas ao ataque de patógenos (Cardoso *et al.*, 2013).

Entre os mais de dez tipos de doenças infecciosas que o cajueiro pode ser acometido, a maioria delas é causada por fungos. A cajucultura tem as doenças com um dos principais problemas fitossanitários. A antracnose do cajueiro, causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) Penz. & Sacc, é uma doença que compromete todas as fases fenológicas do hospedeiro, mostrando-se relevante principalmente em regiões e épocas úmidas e chuvosas (Cardoso *et al.*, 2013)

O manejo da antracnose no campo pode ter algumas frentes, como a eliminação dos restos do cultivar infectado (poda de limpeza, remoção e/ou destruição da plantação), controle químico preventivo ou curativo com o uso de fungicidas comerciais e a implementação de pomares com clones resistentes ou tolerantes (Cardoso *et al.*, 2013). Apesar de existir defensivos químicos registrados para a antracnose do cajueiro, a utilização de insumos biológicos no controle da doença vem ganhando relevância. Entretanto, a recomendação de

fungicidas a base de produtos naturais ainda é restrita. Atualmente, junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) existe apenas registro de um produto natural com capacidade antifúngica proveniente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Com o passar das décadas o uso de metabólitos secundários de plantas no controle de fitopatógenos vem se intensificando por meio da aplicação de extratos brutos e óleos essenciais provenientes de plantas medicinais. A aplicação desses metabólitos está relacionada com substâncias presentes em sua composição com propriedades fungicidas (Venturoso *et al.* 2011). A utilização de extratos vegetais proveniente de plantas medicinais tem se mostrado cada vez mais eficiente no manejo de alguns fitopatógenos. Isso está atrelado a ação antifúngica direta, inibindo a germinação de esporos e o crescimento micelial de fungo (Carvalho, 2010)

O emprego de produtos naturais como o neem (*Azadirachta indica*) (Amede *et al.*, 2015) e o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (Affonso *et al.*, 2012) em sinergia oferece uma alternativa promissora devido às suas propriedades antifúngicas. Esses produtos podem reduzir a necessidade de fungicidas químicos aplicados nas lavouras como um todo. Ademais, a junção dos princípios ativos já mostrou resultados *in vitro* frente a *Lasiodiplodia theobromae* na carta-patente depositada por Romão *et al.* (2023).

Buscando em base de dados estudos acerca dos metabólitos secundários da raiz é possível perceber que existem poucos estudos já publicados. Poucos trabalhos relatam a sua utilização frente a fitopatógenos. Ampliar os conhecimentos sobre a atividade antifúngica dos extratos das raízes do neem pode abrir novos horizontes para a aplicação desse material vegetal, uma vez que ele não apresenta um grau elevado de toxicidade (Romão, 2019).

Diante disso, o trabalho em questão tem objetivo, investigar a eficiência *in vitro* e *in vivo* de um bioinsumo a base do extrato de neem indiano e do óleo essencial de cravo-da-índia, para a inibição do desenvolvimento do *Colletotrichum gloesporioides*, agente causador da antracnose em cajueiros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a eficiência de um bioinsumo a base do extrato de nem indiano e do óleo essencial de cravo-da-índia, para a inibição do crescimento micelial e germinação dos conídios de *Colletotrichum gloesporioides*, bem como na redução da severidade da antracnose em cajueiros.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar protocolos de esterilização de extratos vegetais;
- Analisar o efeito de concentração da formulação natural na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.;
- Avaliar o efeito de concentração da formulação natural sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.;
- Analisar o período de incubação, latência e severidade da doença de discos de folhas protegidos com a formulação;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)

Anacardium occidentale L., popularmente conhecido como cajueiro (Figura 1), é uma planta rústica de porte médio, sendo classificada como xerófila, típica de climas tropicais, originária do Brasil, sendo nativa da região litorânea. A relevância do espécime está atrelada ao desenvolvimento social e econômico do Nordeste, onde o Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte são os Estados que mais cultivam o cajueiro (Almeida et al. 2017).

Figura 1 - Imagem da espécie *Anacardium occidentale* L., o cajueiro (CLONE ‘CCP 76’ - EMBRAPA)



Fonte: Próprio autor.

Grande parte da sua importância socioeconômica pode ser creditada ao fato de que a maior parcela de produção provém de pequenos produtores familiares, onde a colheita é realizada na entressafra de outras culturas. Já sua importância econômica está ligada a dois principais fatores: a indústria da castanha de caju, com foco na exportação do fruto e mercado

interno; e a indústria do pedúnculo, ligada ao mercado interno, onde o pseudofruto é utilizado *in natura* ou na produção de suco (Almeida et al. 2017).

De acordo com o IBGE (2026), em 2024 no Brasil a área colhida de cajueiros foi de 450.237 ha, sendo o Ceará o principal produtor produzindo 101.931 ton. em 282.602 ha, equivalente a 62,7% da área nacional.

O melhor aproveitamento da produção está relacionado a fatores como a escolha do material genético e dos tratos culturais (Vidal Neto et al., 2013). Porém, existem outros fatores que acarretam perdas no campo, como a formação de plantações com mudas de pés francos e o manejo negligente da cultura em relação aos tratos fitotécnicos e fitossanitários (Martins; Cardoso; Viana, 2016; Serrano; Oliveira, 2013). Para além das pragas no campo que afetam negativamente a produção, doenças infecciosas ocasionadas por fungos são uma parcela dos desafios a serem vencidos para uma safra lucrativa de pedúnculos e castanhas (FREIRE et al., 2002)

3.2 Doenças do cajueiro

3.2.1 Antracnose (*Colletotrichum* spp.)

A antracnose causada pelo patógeno *Colletotrichum* spp. é tida como uma doença importante para a cajucultura, com capacidade de infectar todos os órgãos e tecidos da planta desenvolvidos ou em desenvolvimento (Alves 2017). Doença essa que ocorre em todas as regiões produtoras, o que gera danos econômicos significativos se for negligenciada (Cardoso et al., 2013).

A infecção do cajueiro pelo *Colletotrichum* spp. acarreta em lesões que ocorrem nas folhas, nos ramos, nas flores, nos frutos e pseudofrutos, onde nas lesões são produzidas numerosas estruturas de reprodução, denominadas acérvulos (Cardoso et al., 2013). De acordo com Cardoso *et al.* (2013) “A antracnose é mais severa em tecidos jovens, resultante do lançamento floral, o qual ocorre durante ou logo após do período chuvoso”. Os sintomas podem ser observados em todas as partes aéreas da planta, sendo as folhas a parte onde os sintomas são expressivos.

A infecção se dá pelos esporos (conídios) do patógeno, que são dispersos de folhas infectadas para tecidos sadios através do vento por uma longa distância. Os esporos também podem ser transportados dos órgãos de plantas contaminadas através dos respingos de orvalho e/ou chuva, ou até mesmo com material de poda contaminado. Quando as condições ambientais são desfavoráveis à dispersão e infecção do patógeno, o fungo tende a sobreviver como

saprófita (fase não patogênica) em tecidos já necrosados na planta ou no solo (Souza, Vieira, e Neves 2019).

De acordo com Alves (2017), cajueiros acometidos por antracnose apresentam diversos sintomas, dentre eles, manchas necróticas de formatos irregulares e tamanhos variados, com coloração parda a avermelhada em folhas novas, e em folhas maduras as manchas apresentam-se enegrecidas. As folhas acometidas pelas manchas ainda podem apresentar curvaturas ou distorções, devido ao crescimento desigual dos tecidos saudáveis e afetados (Figura 2a-b). Vale ressaltar ainda que, folhas jovens ou maduras que são colonizadas pelo fungo tendem a ter uma queda prematura dependendo do grau de severidade (Gamarra-Rojas et al. 2019).

Os sintomas na inflorescência iniciam-se com lesões necróticas na base das hastas florais com formatos alongados (Figura 2d-e), que evoluem até atingir a inflorescência por completo, ocasionando a queima e queda das flores (Alves 2017). Os pedúnculos (pseudofruto) novos acometidos pelo patógeno apresentam manchas escuras e deformadas (Figura 2f). Já nos mais maduros, os sintomas se dão por lesões necróticas escuras que atingem grande extensão da superfície do pseudofruto, exibindo fendilhamento da área necrosada (Figura 2g) (Carvalho, 2010).

O desenvolvimento do patógeno nos frutos (castanhas) é facilitado com altas temperaturas e umidade elevada (acima de 80%) formando lesões, com a presença de acérvulos (corpo de frutificação do fungo) e uma massa rosada com consistência gelatinosa contendo um alto número de conídios do patógeno. Na presença do orvalho e/ou chuva, os conídios podem germinar emitindo um tubo germinativo, com a formação de um apressório globuloso, que tem a função de penetrar diretamente nos tecidos foliares (Souza et al. 2019).

Figura 2 - Imagem dos sintomas característicos da antracnose em diversos órgãos de *Anacardium occidentale*: folhas (a-c), hastes (d-e), pseudofrutos (pedúnculos) (f-g) e fruto (castanha) (h)



Fonte: Marlon Vagner Valentim Martins

3.3 Produtos naturais

A aplicação de extratos vegetais surge com alternativa para o manejo integrado de pragas e na produção orgânica. Esta alternativa emerge como viável devido ao menor custo financeiro, além de serem biodegradáveis diminuindo a persistência e o acúmulo de produtos químicos tóxicos no solo (Lima & Silva 2022).

3.3.1 Neem indiano (*Azadiracta indica* A. JUSS)

Azadirachta indica A. Juss, conhecida popularmente no Brasil como Nim Indiano ou “neem”, é uma espécie pertencente a família *Meliaceae* (Figura 3). Nativa da Índia e inserida no Brasil de forma controlada por volta da década de 80 por pesquisadores com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a espécie. Contudo, hoje é possível encontrar exemplares do espécime em diferentes regiões do país por ser uma árvore de rápido crescimento e por proporcionar uma grande área de sombra (Melo et al. 2022).

Figura 3 - Imagem do neem indiano (*Azadirachta indica* A. Juss)



Fonte: FUNDAJ 2026.

Na medicina popular dos países asiáticos, graças a suas atividades terapêuticas, o neem indiano é conhecido como “farmácia viva” e “árvore milagrosa”. Vem sendo relatado na literatura que os compostos presentes na composição do neem possuem propriedades antiviral, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica (Amede et al., 2015), contraceptivo, antimalárico, antiulceroso, apresenta efeito antitumoral, contudo apresenta atividade depressora sobre o sistema nervoso central (Bernardi, Meurer, e Arantes 2012).

Em diversos países, incluindo o Brasil, o neem é considerada uma espécie exótica invasora, pois ela tem a capacidade de inibir o crescimento de plantas nativas no local em que cresce, podendo comprometer a biodiversidade do local. Através de um sistema de competição, o neem se dissemina de maneira rápida e eficiente eliminando outras espécies nativas, prejudicando a flora, e conseqüentemente a fauna (Ferreira et al. 2020).

No Nordeste brasileiro algumas cidades já proibiram o cultivo dessa árvore por conta dos impactos ambientais que a presença do espécime provoca ao meio, como o poder inseticida frente a alguns artrópodes fundamentais que constituem o ecossistema local (Melo et al. 2022).

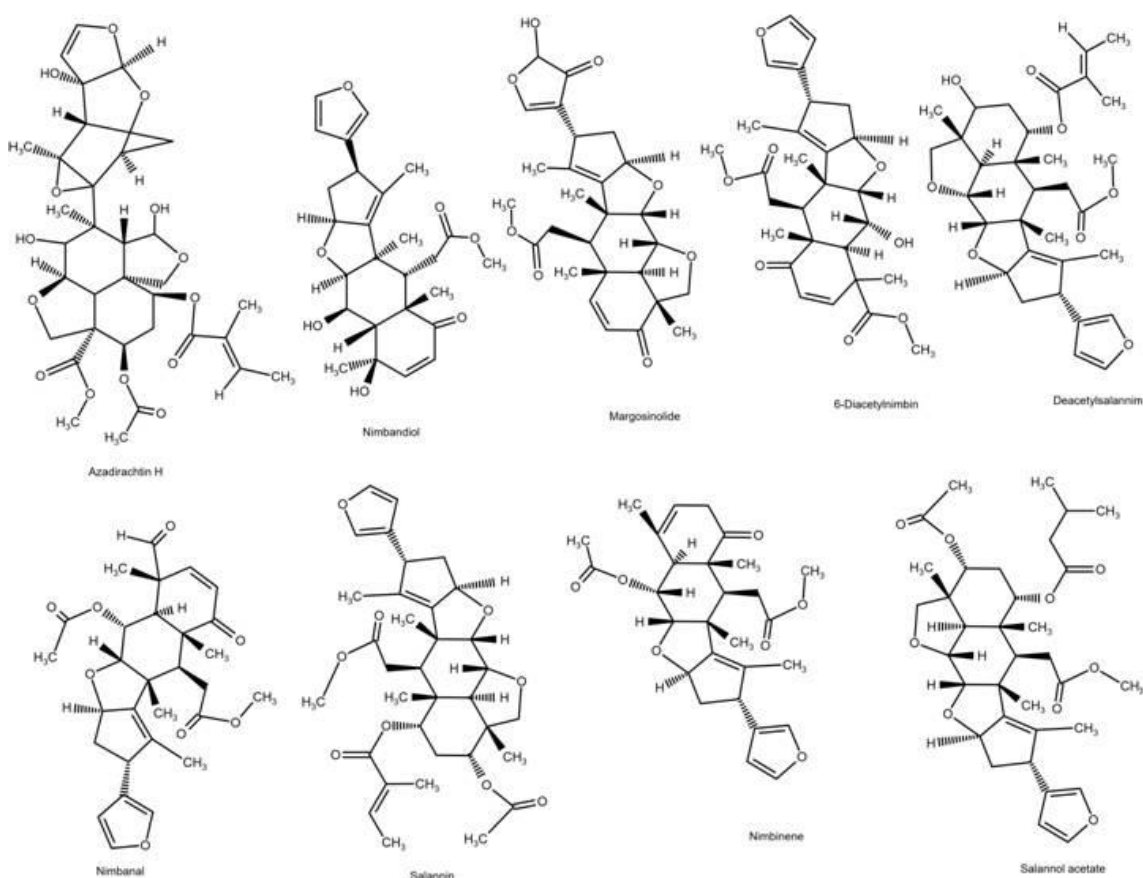
A árvore de neem tem a capacidade de se defender de vários tipos de pragas devido a grande quantidade de moléculas bioativas metabolizadas pela planta (Lima e Silva 2022). A literatura relata que entre os compostos elucidados na composição química do neem, o que se destaca como composto majoritário é a azadirachtina, maior alvo de estudos no âmbito medicinal, cosmetológico e no controle de pragas (Melo et al. 2022).

Em estudos com o óleo essencial das folhas do neem desenvolvido por Menezes e colaboradores (2021) foram isolados hidrocarbonetos que conferem atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana também foi constatada por Singaravelu (2019) a partir de extratos brutos provenientes das cascas do caule frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em estudos com cepas de *Candida albicans*, Neglo e colaboradores (2022), relataram que todos os extratos de neem testados apresentaram atividade antifúngica contra todas as cepas usadas no experimento.

De acordo com o relatado por (Lima e Silva 2022) o neem indiano é apontado como uma alternativa viável para atuar como inseticida natural, apresentando características passíveis de ser utilizado devido a sua biodegradabilidade, por não ser acumulativo, possuir baixa toxicidade aos humanos e possui relativa seletividade aos inimigos naturais das pragas. Para além do que já foi exposto, a utilização do neem não envolve resistência a longo prazo nas pragas.

Em estudos realizados por Romão *et al.* (2023) foram identificados 9 compostos provenientes do extrato hidroetanólico da raiz do neem: azadiractina H, margosinólido, 6-deacetilnimbina, deacetilsalinina, nimbanal, nimbinina, acetato de salanol, salanina e nimbin (Figura 4).

Figura 4 - Imagem da representação estrutural de compostos identificados provisoriamente no extrato hidroetanólico das raízes de *Azadirachta indica* por UPLC-QTOF-MSE



Fonte:(Romão et al., 2023)

De acordo com Lima e Silva (2022), as principais moléculas ativas do neem são a azadiractina (inseticida e repelente de insetos), nimbin (espermaticida e anti-inflamatório em vertebrados) e salanim (repelente a insetos).

Nos estudos com fitopatógenos, (Kasper et al., 2018) comparou a eficiência do óleo comercial e do extrato etanólico obtido das folhas de neem, onde os autores observaram o efeito inibitório de ambos em uma concentração inibitória mínima de 250 µg/mL frente a *Macrophomina phaseolina*. As inibições foram observadas para outros patógenos como, *Fusarium oxysporum* na concentração inibitória mínima de 250 µg/mL para o óleo e 500 µg/mL para o extrato; e, ambos inibiram o crescimento a *Sclerotinia sclerotiorum* e *Aspergillus parasiticus* na concentração inibitória mínima de 1000 µg/mL.

De acordo com Machado, Haralampidou e Machado (2015) o óleo essencial extraído das sementes do neem apresentam ação antifúngica frente aos fungos *L. theobromae* e *C. gloesporioides* em uma concentração de 64 ml/L.

Ainda sobre a ação antifúngica do óleo essencial de neem, Negreiros et al., (2013) verificaram a eficiência de 10 ml/L do óleo sobre o fungo *C. musae* causador da antracnose em frutos de banana “prata”. Os autores observaram que nessa concentração, após 19 dias de aplicação, houve uma redução de 43,39% de do crescimento do patógeno em relação a controle.

3.3.2 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

O craveiro da Índia (Figura 5a), conhecido atualmente pelo nome científico *Syzygium aromaticum*, pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*). Uma planta de porte arbóreo, com copa alongada, podendo atingir de 8 a 10 metros de altura. Possui folhas aromáticas, com características ovais medindo entre 7 a 11 centímetros de comprimento (Figura 5b). Suas flores são hermafroditas, pequenas, aromáticas, organizadas em corimbos terminais, em tons que mesclam o verde e amarelo, com manchas vermelhas claras quando mais jovem, e com a maturidade um vermelho mais escuro, sendo a melhor hora para a colheita do cravo-da-índia. Os frutos também possuem uma coloração avermelhada e são de dupla elipsóide (Affonso et al., 2012b).

Figura 5 - Imagem da árvore (a), folha (b), frutos (c) e botões florais (d) secos do cravo-da-índia



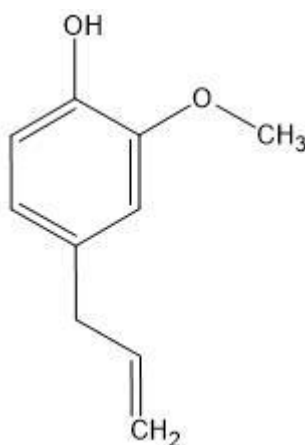
Fonte: (Affonso et al., 2012).

Foi uma árvore amplamente disseminada nos tempos antigos devido a especiaria produzida por ela. Durante as navegações o cravo-da-índia (Figura 5d) foi uma das primeiras especiarias a serem comercializadas pelo mundo, muito utilizada na medicina popular e na culinária. A literatura relata que a mais de dois mil anos na China o cravo-da-índia foi usado para mascarar o mal hálito ao ser mascarado. Já entre os egípcios e os romanos, o cravo-da-índia era usado como um agente estimulante entre os trabalhadores (Kiple; Ornelas, 1999).

Atualmente, os produtos do cravo-da-índia encontrados no mercado são, o óleo essencial puro, ou derivados deles, usados em diversas aplicações, como, cosmetologia, indústrias farmacêuticas e o próprio botão floral seco, usado como tempero na culinária (Affonso et al., 2012).

Óleos essenciais, óleos estéreo ou essenciais são definidos como um tipo de misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com características odoríferas, com sabor acre (ácido), com consistência oleosa, onde sua coloração pode ir de incolor até levemente amarelada. Quando recém extraídos, podem apresentar baixa estabilidade na presença de luz, umidade, ar e calor. Mesmo sendo uma mistura de diferentes compostos orgânicos, geralmente possuem um composto majoritário, para o cravo-da-índia, o eugenol, ou, 4-alil-2-metoxifenol (Figura 6) (Bueno et al., 2023).

Figura 6 - Imagem representativa da estrutura do eugenol



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os óleos essenciais são formados por substâncias de baixo peso molecular, geralmente lipofílicas, características que facilitam a penetração eficiente na membrana plasmática. Pesquisas já relatam que a permeabilidade de óleos essenciais em tecidos é cerca

de 100 vezes mais rápida em comparação com a água. É graças a essa alta capacidade de penetrar na membrana dos compostos fenólicos, como o eugenol, que é reconhecida a atividade antimicrobiana do óleo (Affonso et al., 2012).

Em função disso, Affonso e colaboradores (2012) relataram a atividade do óleo essencial de cravo-da-índia frente a fungos como *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, como também descreveram a utilização do óleo essencial em preparações tópicas para o tratamento de infecções fúngicas.

Em estudos realizados por Costa et al., (2011) onde os autores avaliaram a ação do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial *in vitro* dos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* fitopatógenos foi descrito que, o óleo apresentou atividade antifúngica para *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* em uma concentração de 15%. No entanto não foi observado mesma atividade sobre *Macrophomina faseolina*.

Já em estudos anteriores realizado por Santos et al. (2007) testando diferentes concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, os autores relataram atividade antifúngica em todas as concentrações, sendo que a partir de 500mg.L ocorreu inibição total dos fungos.

O elevado número de compostos ativos encontrados em plantas encoraja os estudos e desenvolvimentos de novas tecnologias a partir de extratos vegetais, tendo em vista, o manejo de fitopatógenos (Venturoso et al., 2010).

3.3.3 Compostos bioativos

Como já relatado anteriormente, a atividade antifúngica dos extratos de neem e óleo essencial de cravo-da-índia já é muito bem descrita na literatura. Ambos possuem atividade antifúngica consolidada. Contudo, em pesquisas utilizando extrato etanólico de raiz de neem e óleo essencial de cravo-da-índia Romão *et. al.* (2019) desenvolveu diferentes formulações a base dos mesmos variando suas concentrações, onde foi observado que a ação antifúngica foi melhorada quando os princípios ativos foram usando em conjuntos, inibindo 100% da *Lasiodiplodia theobromae* a uma concentração de 1400 mg.L de extrato de neem e 10-20% do peso de óleo essencial em relação ao peso do extrato.

Wagner & Ulrich-Merzenich (2009) descrevem que “interações aditivas ocorrem quando o efeito da mistura de duas ou mais substâncias é igual ao simples somatório do efeito destas, isoladamente.” Sendo assim, a atividade sinérgica é quando o efeito produzido pela

combinação de substâncias é superior ao esperado quando se utiliza quando as mesmas substâncias são empregadas separadamente. Sinergia tem origem na palavra grega “*synergos*” que significa “trabalho em conjunto” (Eid et. al. 2012).

A união de compostos ativos afim de alcançar um efeito sinérgico pode elevar a biodisponibilidade de substâncias ativas e/ou diminuir as doses destes. Desse modo, diminui também a sua possível toxicidade e efeitos adversos, o que contribui para o aumento de eficiência (Van Vuuren & Viljoen, 2011).

4 ESTERILIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

4.1 Introdução

Os estudos do efeito de produtos naturais no controle de fitopatógenos são realizados em condições *in vitro* e *in vivo*. A eficiência desses produtos é inicialmente testada em condições de laboratório e a partir de resultados promissores, podem ser testados em condições controladas de casa-de-vegetação e depois em campo.

Para o caso de ensaios em laboratórios são usadas metodologias com o emprego de meios de cultura que permitem o crescimento e o desenvolvimento de espécies de fungos. Meios de cultura como o batata dextrose ágar (BDA) são os mais utilizados para esse propósito, e os que mais favorecem também o crescimento de microorganismos indesejados prejudicando a obtenção de resultados requeridos (Martinelli; Santos, 2025).

Uma das traves da pesquisa com meio de cultura é a contaminação do meio nutritivo por bactérias e fungos durante as etapas de pesquisa *in vitro*. A grosso modo, as contaminações podem se originar de quatro fontes diferentes, sendo elas, a fonte de explante (qualquer parte da planta, sejam raiz, tronco, casca, folhas, flores, sementes ou frutas), o meio nutritivo, o ambiente e o operador. Quando a contaminação atinge o meio de cultura e/ou material vegetal ele compete pelos nutrientes, sintetiza substâncias tóxicas e atrapalha o crescimento do patógeno que está sendo estudado (Sousa et al., 2007).

Durante a construção do presente estudo, um dos empecilhos de se trabalhar com material vegetal proveniente de raízes é a fácil contaminação por microrganismos (principalmente fungos) nos ensaios realizados em meio de cultura BDA. Essa contaminação pode estar atrelada a microbiota normal (fungos e bactérias) da planta presente em todas as suas partes. A esterilização do material vegetal nesses casos é de fundamental importância para o sucesso dos testes *in vitro* de extratos de plantas (Melo et al., 2000).

Com o objetivo de evitar a contaminação do meio de cultura por microrganismos indesejados, que por sua vez, podem interferir nos resultados das pesquisas que envolvem a utilização de extratos vegetais, é comumente empregado metodologias distintas a fim de promover a esterilização dos extratos candidatos à inibição de fungos em condições *in vitro* (Venturoso et al., 2010).

Já é muito bem consolidado pela literatura a utilização de filtração e autoclavagem a 120 °C como método de esterilização de materiais vegetais (Venturoso et al., 2010). Contudo,

ao se utilizar um extrato vegetal é importante se atentar ao método de esterilização, pois dependendo da metodologia empregada, o mesmo pode degradar o composto ativo presente ou até mesmo não eliminando completamente os microorganismos presentes nesses extratos vegetais (Lorenzetti et al., 2018b).

Diante do que foi exposto, o objetivo desse capítulo foi avaliar o efeito de diferentes processos de esterilização dos extratos na ação antifúngica da formulação a base de extrato etanólico de raiz de neem indiano e óleo essencial de cravo-da-índia na inibição do fungo *Colletotrichum* spp.

4.2 Material e métodos.

4.2.1 Extração e formulação

Para a obtenção do extrato, as raízes do neem indiano foram coletadas na Universidade Estadual do Ceará (-3.7904274721857485, -38.55274064659043). As partes das plantas foram levadas ao Laboratório de Nanobiotecnologia Ambiental, onde passaram por limpeza e por processo de secagem em estufa a 40° durante 48 h. Em seguida as raízes foram trituradas e submersas em álcool etílico 99,9% PA para a extração a frio de seus compostos por processo de maceração durante sete dias. Após, o extrato foi filtrado e reduzido em evaporador rotativo acoplado ao sistema de vácuo a 60° C e seco em estufa a 40° C para a obtenção do extrato bruto. O óleo essencial de cravo-da-índia foi adquirido comercialmente. A formulação foi preparada de acordo com a metodologia descrita na carta-patente “Fungicida natural para uso farmacológico e fitossanitário, Número do Depósito: BR 102018072793-1, Data do Depósito: 06/11/2018; Data da Publicação Nacional: 26/05/2020” desenvolvida por Romão *et al* (2019).

4.2.2 Esterilização da formulação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza/CE (-3.752696523237867, -38.57564108894219). As metodologias de esterilização/desinfecção empregadas e suas especificações estão descritas na Tabela 1. Para o experimento, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 3 repetições (cada repetição = 1 placa de Petri), para a formulação do extrato especificado.

Tabela 1 - Metodologias de esterilização/desinfestação dos extratos etanólicos de raiz de neem indiano e óleo essencial de cravo-da-índia na formulação de 2000 mg.L⁻¹ para a inibição do fungo *Colletotrichum spp*

SIGLA	TRATAMENTOS	PROCESSOS	ESPECIFICAÇÃO
FFIL	Formulação 2000 mg.L ⁻¹	Filtragem	Millipore 0.22um 25mm
FBM	Formulação 2000 mg.L ⁻¹	Banho-maria	65 °C durante 1 hora
FAC	Formulação 2000 mg.L ⁻¹	Autoclavagem	120 °C durante 15 minutos
FSTE2000	Formulação 2000 mg.L ⁻¹	Adição de antibiótico	Cloranfenicol (40.000 mg.L ⁻¹)
EX	Extrato bruto de raiz de neem (2000 mg.L ⁻¹)	Adição de antibiótico	Cloranfenicol (40.000 mg.L ⁻¹)
OS	Óleo essencial comercial de cravo-da-índia (10-15% o peso do extrato)	Adição de antibiótico	Cloranfenicol (40.000 mg.L ⁻¹)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.3 Teste *in vitro* sobre o fungo *Colletotrichum spp*.

Após o preparo e posterior esterilização/desinfestação pelos diferentes métodos descritos acima a formulação na concentração de 2000 mg.L⁻¹ (concentração adaptada da carta patente) foi adicionada ao meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) fundente e vertidos em placas de Petri. Como comparativo as metodologias com emprego de calor (banho-maria e autoclavagem) e de barreira (filtragem) foram usados três grupos com a adição de antibiótico ao meio BDA, sendo eles: a) Formulação Sem Tratamento de Esterilização/desinfestação (FSTE 2000) a uma concentração de 2000 mg.L⁻¹; b) apenas Extrato Etanólico de Raiz de Neem (EX) a uma concentração de 2000 mg.L⁻¹ e c) com de Óleo Essencial de cravo-da-índia (OS) em uma concentração equivalente a 10-15% do peso de extrato. O ensaio foi realizado em triplicata, onde cada placa de Petri corresponde a uma repetição.

Para os testes como as metodologias de esterilização foi adicionado um disco de BDA de 7 mm contendo do fungo *Colletotrichum spp.*, (isolado LF200) proveniente de folhas do cajueiro-anão acometidas com antracnose. A eficiência dos processos de esterilização foi avaliada a partir da inibição do crescimento micelial em meio de cultivo, conforme metodologia descrita por Menten, (1976). Para efeito comparativo da atividade antifúngica da formulação foi utilizada um controle negativo (CN) com fungo plaqueado em meio de cultura apenas com BDA e controle positivo (CP) com fungo plaqueado em meio de cultura BDA adicionado de fungicida comercial Nativo[®] (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹)). As placas

foram medidas longitudinal e transversalmente a cada 24h para determinar o diâmetro médio das colônias (em centímetros) até o grupo controle negativo atingir a borda a placa. Após a obtenção dos valores de diâmetro das colônias do patógeno foi realizado o cálculo de Crescimento Radial utilizando a formula proposta por (Fortí, 1997), em que:

$$CR = \frac{DM - 0,7}{2}$$

Onde:

DM: Média dos diâmetros longitudinais e transversais do crescimento colonial do patógeno;

0,7: Diâmetro do disco do isolado do patógeno adicionado ao meio em placa de Petri.

Além disso, para medir quanto o crescimento micelial foi afetado em função da substância aplicada, foi calculado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) conforme a fórmula utilizada por Menten (1976).

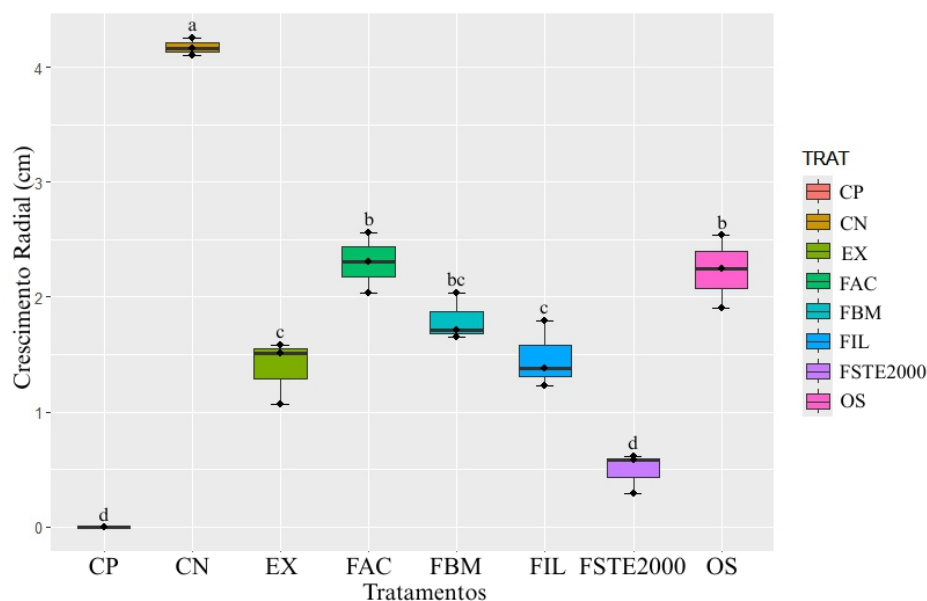
$$PIC = \frac{\text{Crescimento do controle negativo} - \text{Crescimento do tratamento}}{\text{Crescimento da controle negativo}} \times 100$$

Os dados de crescimento radial e percentual de inibição de crescimento micelial foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade utilizando o programa RStudio.

4.3 Resultados e discussão

De acordo com os dados coletados é possível inferir que em todas as metodologias de esterilização não houve contaminação nas placas de Petri por fungos oportunistas e inibição do crescimento micelial do patógeno *Colletotrichum* spp. em níveis diferentes. O controle negativo cresceu até atingir a borda da placa de Petri em sete dias. O grupo com a adição de fungicida comercial não apresentou crescimento do patógeno ao final da avaliação (Figura 7).

Figura 7 - Crescimento radial (dia 7) *in vitro* de *Colletotrichum* spp. frente aos extratos vegetais com atividade antifúngica, submetidos a diferentes metodologias de esterilização/desinfestação



Fonte: Elaborado pelo autor.

*Médias seguidas da mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de probabilidade do teste de Tukey.

**CP: fungicida comercial (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹); CN: Crescimento micelial de *Colletotrichum* sp., em meio de cultivo BDA; EX: extrato etanólico de raiz de neem + antibiótico; OS: óleo essencial de cravo-da-índia + antibiótico; FSTE 200: formulação (extrato etanólico de raiz de neem + óleo essencial de cravo-da-índia) + antibiótico; FAC: formulação Autoclavada; FBM: formulação banho-maria; FIL: formulação filtrada.

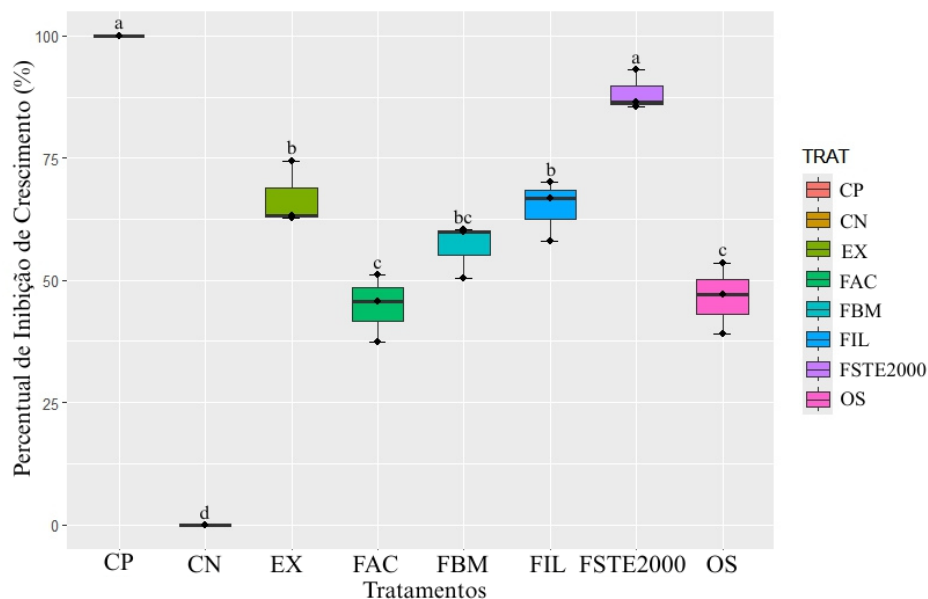
Os grupos que passaram por processo térmico (FBM e FAC) se mostraram menos eficazes quando comparados aos outros grupos na inibição do crescimento radial (Figura 7). A esterilização através da autoclavagem a 120 °C demonstra que o aquecimento de extratos vegetais seriam um processo que proporciona alterações nos metabólitos secundários de plantas (Venturoso et al., 2010). No processo de filtragem (FFIL) é possível constatar que provavelmente esse processo reteve parte dos compostos ativos na membrana, afetando negativamente a ação antifúngica (Figura 7).

Nos grupos adicionados de antibiótico (FSTE 2000, EX e OS) apenas o extrato FSTE 2000 inibiu o fungo significativamente, sendo estatisticamente igual ao controle positivo com uso de fungicida comercial. Quando aplicados em conjunto (FSTE 2000 + ANTB) a colônia fúngica atingiu apenas 0,57 cm de crescimento. Vale ressaltar a confirmação da

atividade sinérgica do extrato de neem e do óleo essencial de cravo-da-índia. Quando utilizados separadamente, a ação antifúngica se mostra menos eficiente, com crescimento de 1,50 e 2,25 cm, para o EX + ANTB e OS 10-20 % + ANTB, respectivamente (Figura 7).

É possível observar a partir da Figura 8 que os processos térmicos de esterilização de compostos orgânicos (FBM e FAC) degradaram os compostos ativos presentes no extrato e no óleo essencial de maneira que o percentual de inibição de crescimento foi afetado, onde o extrato autoclavado obteve um PIC de 45,50 % e o banho-maria de 58,97 %. Os tratamentos EX, FAC, FBM, FFIL e OS foram os que menos inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. O mais eficiente foi o extrato adicionado apenas o antibiótico (FSTE 2000) e se mostrou de novo estatisticamente igual ao meio de cultura adicionado apenas do fungicida comercial inibindo 86,12 % do crescimento fúngico.

Figura 8 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial, *in vitro* de *Colletotrichum* spp. frente aos extratos vegetais com atividade antifúngica, submetidos a diferentes metodologias de esterilização/desinfestação



Fonte: Elaborado pelo autor.

*Médias seguidas da mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de probabilidade do teste de Tukey.

** CP: fungicida comercial (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹); CN: Crescimento micelial de *Colletotrichum* sp., em meio de cultivo BDA; EX: extrato etanólico de raiz de neem + antibiótico; OS: óleo essencial de cravo-da-índia + antibiótico; FSTE 200: formulação (extrato etanólico de raiz de neem + óleo essencial de cravo-da-índia) + antibiótico; FAC: formulação Autoclavada; FBM: formulação banho-maria; FIL: formulação filtrada.

Franzener e colaboradores (2003) verificaram a capacidade antifúngica do extrato aquoso de *Artemisia camphorata* autoclavado frente a germinação de esporos do *Bipolaris sorokiniana*. O processo térmico afetou sua atividade antifúngica, pois após a metodologia, o mesmo não inibiu a germinação do patógeno.

Em testes de sensibilidade térmica com extrato de cravo-da-índia foi demonstrado que após processo térmico houve redução de até 38% o crescimento micelial do fungo *Macrophomina phaseolina* (Lorenzetti et al. 2018). Venturoso *et al.* (2010) também relatam que a temperatura não degrada os princípios ativos do cravo-da-índia com capacidade antifúngica. Quando comparado o grupo tratado apenas com FSTP 200 e a FAC é possível observar que a ação antifúngica cai drasticamente. Os valores de FAC se aproximam do grupo tratado apenas com o OS, ou seja, o óleo essencial presente na formulação autoclavada não foi degradado com a temperatura elevada.

4.4 Conclusão

Os compostos submetidos a tratamentos térmicos como medidas de esterilização sofrem degradação; a filtragem por Millipore retém parte dos compostos ativos na membrana; o extrato etanólico de raiz de neem em conjunto com óleo essencial de cravo-da-índia e adição de antibiótico foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

REFERÊNCIAS

FORTÍ, J. A. Aspectos patológicos, epidemiológicos y culturales de *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez. Tesis Doctoral—Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 1997.

LORENZETTI, E. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos de vegetais sobre desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina* em métodos de esterilização. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 112–118, 14 jun. 2018.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, R. S. Desenvolvimento de fungos nematófagos em diferentes meios de cultura. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 14 mar. 2025.

MELO, J. T. *et al.* Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do Laboratório de Fitoterápicos, do Programa de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 2, n. 2, p. 45–50, 25 abr. 2000.

MENTEN, J. O. M. *et al.* Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57–66, 1976.

SOUSA, G. C. *et al.* Contaminação Microbiana na Propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 405–407, 2007.

VENTUROSOSO, L. R. *et al.* Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 499–505, 2010.

5 BIOINPUT BASED ON NEEM OIL EXTRACT AND CLOVE FOR THE IN VITRO AND IN VIVO INHIBITION OF THE CAUSAL AGENT OF CASHEW ANTHRACNOSE AND THE INHIBITION OF THE DEVELOPMENT OF *Coletotrichum*.

Bioinsumo à base de extrato de neem óleo e cravo-da-índia na inibição de *in vitro* e *in vivo* do agente causal da antracnose do cajueiro na inibição do desenvolvimento de *coletotrichum*

Rodrigo Nobre de Souza Borba; Haydée Schaumann da Silva; Ana Lúcia Eufrazio Romão; Marlon Vagner Valentim Martins; Carlucio Roberto Alves.

Abstract: The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is widely cultivated in Brazil, especially in the Northeast of the country. However, some phytosanitary problems such as cashew anthracnose can harm plant production, and management measures are necessary to reduce disease epidemics. Although there are records of fungicides for disease control, the introduction of natural products is an alternative to be used in integrated disease management. This work aimed to apply the patent "Natural fungicide for pharmacological and phytosanitary use, Deposit Number: BR 102018072793-1" in the *in vitro* control of the fungus. The use of the extract inhibited the mycelial growth of the fungus by 85.82% at a concentration of 2000 mg.L⁻¹. When analyzed microscopically, all tested concentrations stimulated the germination of the pathogen's conidia. However, even with the influence on germination, it was not possible to observe the formation of appressoria. In tests performed with leaf discs, it was observed that the group with the lowest disease severity indices were the leaves that came into contact with the pathogen after seven days of protection with the formulation. The neem root extract, combined with clove essential oil, has an effect on the mycelium of *Colletotrichum* spp. and does not interfere with the germination of the fungus's conidia.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*; Mycelial growth; Natural products.

Resumo: O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é amplamente cultivado no território brasileiro, especialmente no Nordeste do país. Porém, alguns problemas fitossanitários como a antracnose do cajueiro podem prejudicar a produção das plantas e medidas de manejo são necessárias para reduzir as epidemias da doença. Apesar de haver registros de fungicidas no

controle da doença, a introdução de produtos naturais é uma alternativa a ser utilizada no manejo integrado da doença. O presente trabalho visou a aplicação da carta-patente “Fungicida natural para uso farmacológico e fitossanitário, Número do Depósito: BR 102018072793-1” no controle *in vitro* do fungo. O uso do extrato inibiu o crescimento micelial do fungo em 85,82% na concentração de 2000 mg.L⁻¹. Quando analisado microscopicamente, todas as concentrações testadas estimularam a germinação dos conídios do patógeno. Contudo, mesmo com a influência na germinação, não foi possível observar a formação de apressório. Já nos testes realizados com disco de folha foi observado que o grupo com menores índices de severidade da doença foram as folhas que entraram em contato com o patógeno após sete dias de proteção com a formulação. O extrato da raiz neem e conjunto com o óleo essencial de cravo-da-índia, tem efeito sobre o micélio de *Colletotrichum* spp. e não interfere na germinação dos conídios do fungo.

Palavras-chaves: *Colletotrichum gloeosporioides*; Crescimento micelial; Produtos naturais.

5.1 Introdução

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta frutífera amplamente disseminada no Nordeste brasileiro, se destacando pela produção de castanhas e aproveitamento do pedúnculo, que pode ser consumido como fruta *in natura* e na indústria como um todo (Serrano & Pessoa, 2016).

A produção é dependente de vários fatores e está intrinsecamente ligada à escolha do material genético e dos tratamentos culturais (Vidal Neto et al., 2013). Algumas outras questões podem comprometer a produção de caju com destaque para a formação de pomares com mudas de pé franco e manejo negligente da cultura sobre os aspectos fitotécnicos e fitossanitários (Martins; Cardoso; Viana, 2016; Serrano; Oliveira, 2013). Além das pragas que interferem na produção do cajueiro, as doenças ocasionadas por fungos representam ainda um dos grandes entraves na produção lucrativa de castanhas e pedúnculos (Freire et al., 2002).

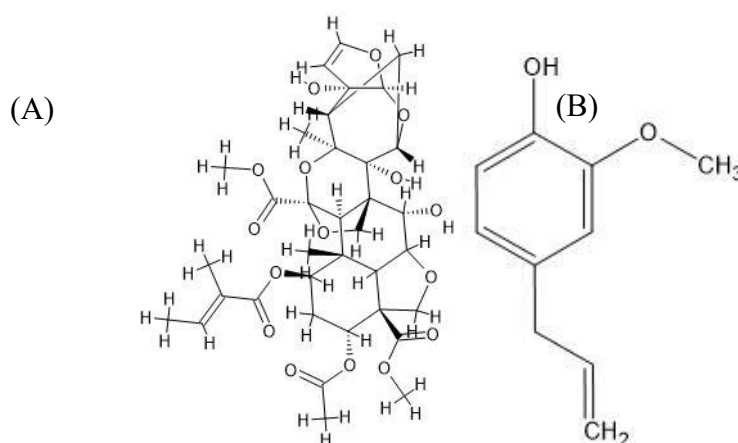
Dessas, a antracnose, causada pelo complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* representa uma importante doença por diminuir a produção e por causar infecção em diferentes órgãos comerciáveis da planta como as castanhas e o pedúnculo. A antracnose se desenvolve em todas as fases fenológicas da planta, mas são as brotações novas

consideradas as mais suscetíveis, onde o fungo é capaz de completar todo o seu ciclo e causar sintomas que prejudicam a frutificação da planta (Freire et al., 2002).

O manejo da cultura baseado em poda de limpeza e eliminação de ramos doentes; o manejo genético baseado em uso de clones resistentes; e o manejo químico baseado em uso de fungicidas, seja esse natural ou sintético, são estratégias que podem ser usadas dentro do manejo integrado. Além de fungicidas sintéticos que são recomendados e registrados para o controle da antracnose do cajueiro (AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2025), apenas um produto natural com poder fungicida como o óleo essencial de *Melaleuca*, está registrado para o controle dessa doença junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). A base de fungicidas naturais para o cajueiro é muito limitada e a adequação desse manejo satisfaz as demandas exigidas na agricultura não convencional.

Sendo assim, o neem indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) e o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) com eficiência comprovada em controlar pragas entram como uma alternativa natural no controle de fungos como relatado na literatura (Amede et al., 2015; Neglo et al., 2022). Entre os compostos do neem a azadirachtina (Figura 9a) se destaca como composto majoritário que vem sendo alvo de estudos no âmbito medicinal, cosmetológico e no controle de pragas (Melo et al., 2022).

Figura 9 - Representação estrutural da Azadirachtina (A) e do eugenol (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em estudos realizados por Khan et al. (2021) usando dissulfeto de propilo, uma molécula volátil isolada do extrato da semente do neem, foi observado que o composto ativo

tem o potencial de inibição para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* em mangas. Em outro estudo realizado por Motallebi e Negahban (2024) com foco no controle da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum nymphaeae* em morangos foi observado que o extrato alcoólico da semente do neem inibiu o crescimento do fungo em 80,66%, demonstrando seu potencial como molécula com atividade antifúngica.

O craveiro da Índia (*Syzygium aromaticum*), é pertencente à família das mirtáceas (*Myrtaceae*), é fonte do óleo essencial que possui como composto principal o eugenol, ou, 4-alil-2-metoxifenol (Figura 9b) que tem reconhecida atividade antimicrobiana (Bueno et al., 2023). Já na fitopatologia, em ensaios realizados por Guerra et al., (2021) utilizando o óleo essencial de cravo-da-índia foi descrito que o óleo possui ação antifúngica sobre o patógeno *Colletotrichum orbiculare* nas concentrações de 400 e 800 $\mu\text{L/L}^{-1}$. Lopes et al. (2022), utilizaram o óleo essencial de cravo-da-índia frente ao *Colletotrichum theobromicola*, onde o óleo obteve um percentual de inibição de crescimento fúngico em 49,26%.

Mesmo com os estudos em meio de cultura na inibição de fitopatógenos com produtos naturais ser muito bem consolidada para fases iniciais de pesquisas é interessante entender como será a interação dos mesmos no tecido vegetal antes de uma aplicação em larga escala em campo. Galvino e Martins (2025) demonstram que essa metodologia é uma alternativa viável utilizando o tecido vegetal vivo do disco de folha do cajueiro-anão. Os autores definem que “A técnica se baseia em confeccionar um disco a partir de tecido sadio foliar da planta a ser estudada e, após desinfestação superficial da folha, inocular o patógeno de interesse”. Isso permite um ensaio com um ambiente de desenvolvimento mais controlado, possibilitando uma montagem e avaliação de forma mais prática, diminuindo os custos e o tempo de ensaio (Holder-John et al. 2021).

Não foi identificado na literatura trabalhos com o uso de extrato de neem e óleo essencial de cravo-da-índia indicando sua eficiência na inibição de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose no cajueiro-anão. Logo, o objetivo desse trabalho foi verificar a capacidade de formulação desenvolvida à base de extrato etanólico das raízes do neem, óleo essencial de cravo e agentes emulsificantes, em inibir *in vitro* e *in vivo* o agente causal da antracnose do cajueiro.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Formulação

A formulação foi preparada de acordo com a metodologia descrita na carta-patente “Fungicida natural para uso farmacológico e fitossanitário, Número do Depósito: BR 102018072793-1, Data do Depósito: 06/11/2018; Data da Publicação Nacional: 26/05/2020” desenvolvida por (Romão, 2019).

5.2.2 Ensaio de inibição in vitro do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. submetidos a formulação em diferentes concentrações (200-2000 mg.L⁻¹)

Foi utilizado o isolado do fungo *Colletotrichum* spp., (LF200) extraído de folhas com antracnose no cajueiro-anão. A eficiência da formulação foi avaliada a partir do crescimento micelial em meio de cultivo conforme metodologia descrita por Menten, (1976). O Agente Fungicida Natural a base de Neem e Óleo essencial de Cravo-da-índia (AFN) foi adicionado ao meio Batata Dextrose Ágar (BDA) de acordo com as concentrações expressas na Tabela 1 e vertido em placa de Petri. Para efeito comparativo da atividade fungicida da formulação dos extratos foi utilizado um controle negativo (CP) com fungo plaqueado em meio de cultura apenas com BDA e controle positivo (CN) com fungo plaqueado em meio de cultura BDA adicionado de fungicida comercial Nativo[®] (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹)). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos, com três repetições (três placas de Petri). Os valores de diâmetro micelial em centímetro do patógeno foram utilizados no cálculo do Crescimento Radial (CR) conforme Fortí (1997). Em seguida, foi realizado o cálculo de Crescimento Radial Diário (CRD). Além disso, para medir quanto o crescimento micelial foi reduzido em função do extrato, foi calculado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) conforme a fórmula utilizada por Menten (1976).

5.2.3 Ensaio de inibição in vitro da germinação de conídios do fungo *Colletotrichum* spp. submetidos a formulação em diferentes concentrações (200-2000 mg.L⁻¹)

Para avaliação da germinação de conídios o AFN foi incorporado ao meio Ágar-Ágar nas concentrações descritas na Tabela 2 e vertido em placa de Petri até a formação de uma fina camada. Com o meio solidificado, foram cortados discos de 20 mm de diâmetro e acomodados em lâmina de microscopia aclimatadas em caixas gerbox (4 lâminas por caixa) com algodão embebido em água destilada autoclavada para controle de umidade. Em seguida, foi depositada sobre o meio uma alíquota de 50 mg/ml⁻¹ de suspensão de conídios do fungo a uma concentração de 1x10⁴ CFU/ml⁻¹. O experimento com 12 tratamentos foi realizado seguindo o mesmo delineamento do crescimento micelial com três repetições (cada repetição = 1 caixa gerbox com 4 lâminas) para cada concentração/dose da AFN e dos controles positivo e negativo. A avaliação dos conídios foi realizada com 12 e 24 h de incubação à temperatura de 25 °C. Considerou-se como germinados, os conídios que apresentaram o tubo germinativo maior ou igual à sua largura. Com dados obtidos foram calculados a porcentagem de conídios germinados conforme os tratamentos aplicados. Os dados de CR, CRD, PIC e porcentagem de germinação dos conídios foram submetidos à análise de variância e regressão linear utilizando o programa RStudio.

Tabela 2 - Concentrações utilizadas de AFN e TN para os ensaios do crescimento micelial e germinação de conídios do fungo *Colletotrichum spp*

Agente Fungicida Natural (Concentração mg.L ⁻¹)									
200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000
Fungicida Nativo® (Concentração mg.L ⁻¹)									
50									

FONTE: Elaborado pelo autor

5.2.4 Ensaio de inibição in vivo em disco de folhas do agente causal da antracnose do submetidos a formulação em diferentes concentrações (1200-2000 mg.L⁻¹)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com três grupo de tempo (dia 0, dia 3 e dia 7) e com cinco tratamentos da formulação (1200; 1400; 1600; 1800 e 2000 mg.L⁻¹) e três controles, sendo eles, o branco (somente água), positivo (fungicida comercial Nativo® (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹)) e negativo (apenas água e fungo) e doze repetições (em três placas de Petri contendo ágar-ágar e quatro discos de folhas em cada placa) para cada dia.

A metodologia foi adaptada de Galvino e Martins (2025), onde a produção dos discos de folhas foi realizada em câmara de fluxo laminar utilizando-se de folhas tenras e medianas (aproximadamente 30 dias de idade) de mudas do clone de cajueiro ‘BRS 265’ e cortadas com

20 mm de diâmetro. Após os discos serem cortados, foi realizada a desinfecção, submergindo os discos em álcool 70 por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1,5% por 3 minutos e tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Quatro discos foram acomodados com a face abaxial voltada para cima em placas de Petri com meio de cultura ágar-ágar. Em seguida, as cinco concentrações da formulação natural e os três controles, foram aplicados com o auxílio de um borrifador de mão (três borrifadas por placa de Petri) em todos os três grupos (dia 0, dia 3 e dia 7) no dia 0.

A solução de conídios foi preparada a partir da raspagem de placas Petri previamente plaqueadas com o fungo LF.200 em meio de cultura ágar-ágar com uma solução de água destilada Tween-20 a 2,5 %. A suspensão obtida foi levada à câmara de Neubauer® para contagem e ajuste de concentração para 1×10^6 CFU/ml⁻¹. A suspensão de conídios foi aplicada nos discos de folhas nos tempos (dias 0, 3 e 7) com o auxílio de um borrifador de mão. Foram aplicadas 3 borrifadas por placa.

Apartir do segundo dia foram avaliados o período de incubação (PI – período de tempo entre a inoculação e o surgimento dos sintomas) e o período latente (PL – período de tempo entre a inoculação e a esporulação) a cada 24 horas durante os sete dias de experimento para cada grupo de tempo (dia 0, dia 3 e dia 7).

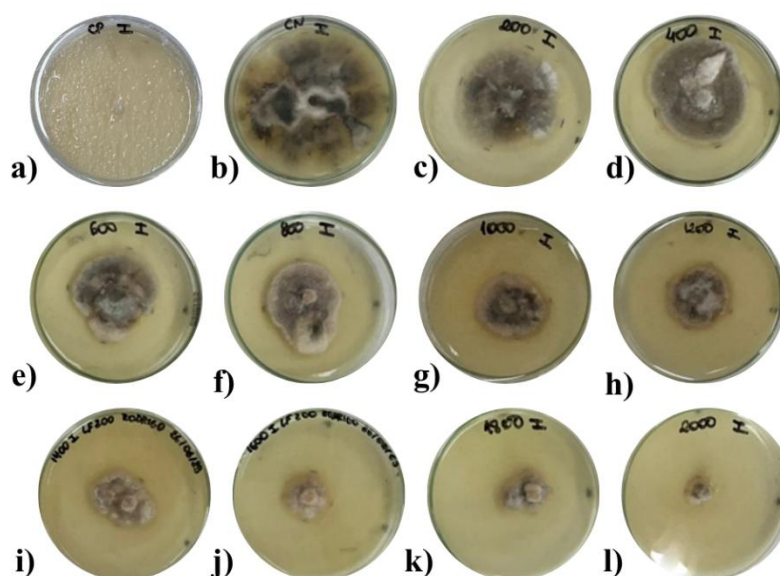
Após o sétimo dia de avaliação de PI e PL de cada grupo de tempo foi realizada avaliação visual da severidade da doença (porcentagem do tecido afetado pelo patógeno) nos discos de folha, seguindo uma escala de porcentagem de tecido infectado (Imagem X), onde, 0 = 0-2%, 1 = 25%, 2 = 50%, 3 = 75% e 4 = 100% de tecido afetado, A análise de severidade da doença nos discos de folhas foi feita pelo software R utilizando o Rstudio®.

Foi realizada também a quantificação de conídios dos discos de folha a partir de uma suspensão obtida pela agitação de 4 discos de folha por 1 minuto no Vórtex® colocadas em 10 mL de uma solução de água destilada Tween-20 a 2,5 %. A suspensão obtida foi posteriormente levada à câmara de Neubauer® para a quantificação. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o uso do programa Rstudio®.

5.3 Resultados e discussão

Diante dos dados coletados foi possível observar que houve efeito inibitório nas concentrações testadas sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Para o grupo sem a adição do antifúngico o patógeno cresceu até atingir a extremidade da placa de Petri. Já para o grupo no qual foi utilizado o fungicida comercial, não ocorreu o crescimento do fungo. Nas concentrações testadas do fungicida, a inibição do crescimento radial (CR) de *Colletotrichum* spp. foi diretamente proporcional à medida que houve o aumento da concentração, de acordo com a Figura 10. Na Figura 2 é possível verificar uma relação linear negativa em função do aumento da concentração. O CR pode ser explicado pela variável independente significando um bom ajuste do modelo de acordo com o coeficiente de determinação R^2 de 88% (Figura 11).

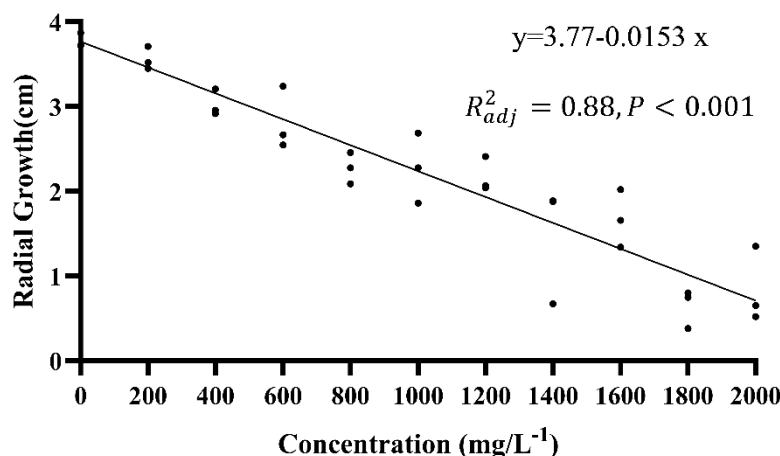
Figura 10 - Efeito das diferentes concentrações da formulação (200-2000 mg.L⁻¹), controle negativo (apenas fungo) e controle positivo (fungicida comercial) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em meio BDA



Fonte: Elaborado pelo autor.

*Concentrações (mg.L⁻¹): (A) Controle negativo; (B) Controle positivo fungicida comercial (trifloxystrobina (100 g.L⁻¹) + tebuconazole (200 g.L⁻¹); (C) 200; (D) 400; (E) 600; (F) 8000; (G)1000; (H) 1200; (I) 1400; (J) 1600; (K) 1800 e (L) 2000.

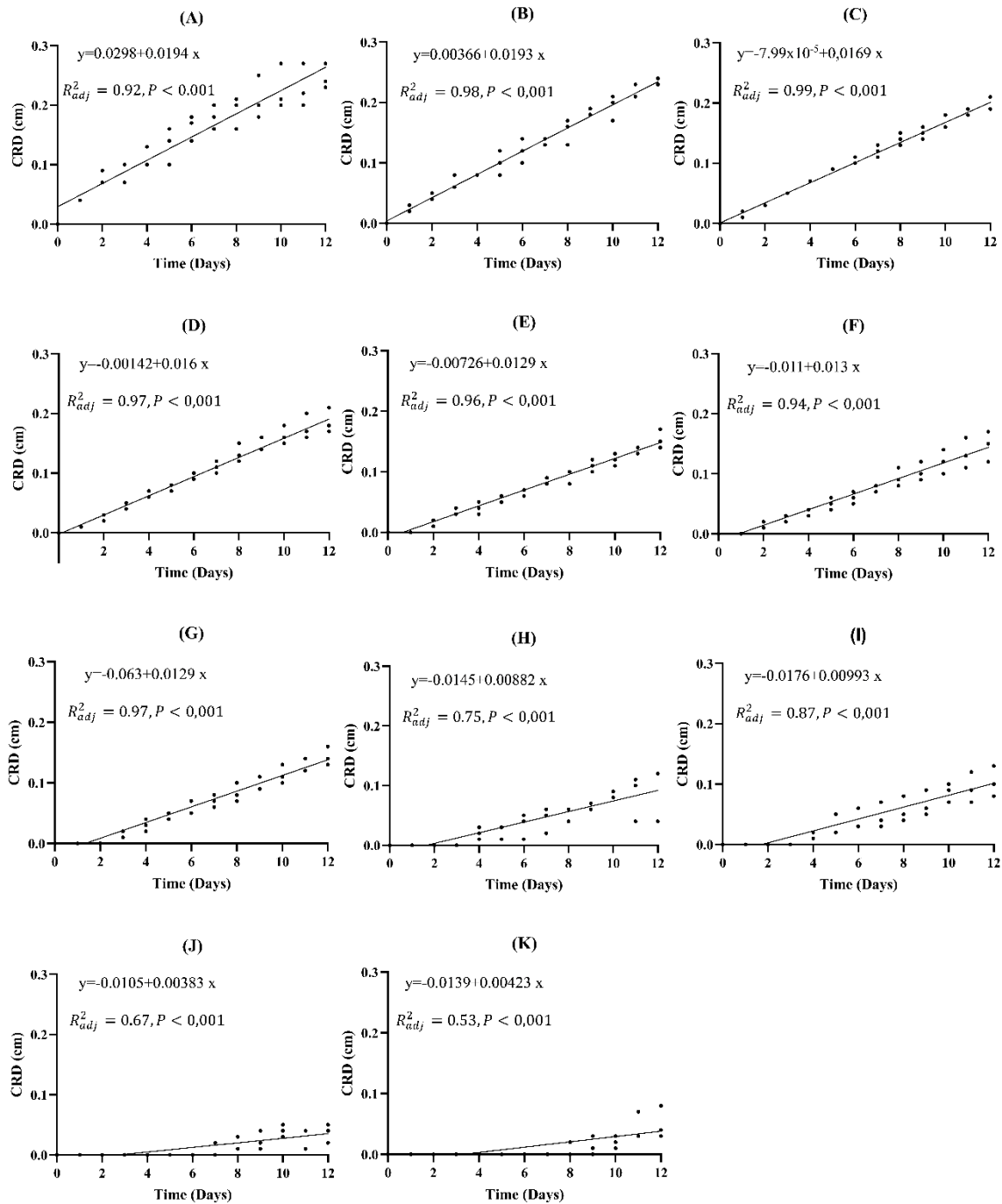
Figura 11 - Figura 2. Atividade do antifúngico natural/AFN (200-2000 mg.L⁻¹) sobre o crescimento radial do micélio de *Colletotrichum* spp. *in vitro* (14 dias)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observado que houve efeito da formulação sobre o crescimento radial diário. A velocidade do crescimento radial foi inversamente proporcional ao aumento da concentração/dose utilizada. Semelhante ao grupo negativo, a formulação nas concentrações 200, 400 e 600 mg.L⁻¹, não influenciaram na inibição do crescimento micelial no primeiro dia de avaliação. Nas doses anteriormente citadas, o fungo continuou o seu crescimento durante todo o período de avaliação, demonstrando ausência de efeito da formulação sobre o fungo. Menores taxas de crescimento micelial foram observadas a partir de 800 mg.L⁻¹ até a terceira avaliação. Entretanto, a partir terceira avaliação as doses entre 200 e 1000 mg.L⁻¹ não apresentaram capacidade de inibir o crescimento micelial do fungo. Nas doses mais elevadas 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 mg.L⁻¹ (Figura 12g-k), observou-se atrasos no crescimento micelial medidos nos 3, 4, 4, 7 e 8 dias, respectivamente. Os modelos de equação linear explicam significativamente o efeito da variável independente para as concentrações entre 200 e 1600 mg.L⁻¹. Nas duas doses mais elevadas (1800 e 2000 mg.L⁻¹) o efeito residual da formulação tem maior poder de inibir o crescimento micelial por muito mais tempo e a equação linear explica apenas uma parte do crescimento do fungo, como pode ser verificado pelo R² de 0,67 (Figura 12j) e 0,53 (Figura 12k) para as concentrações de 1800 e 2000 mg.L⁻¹, respectivamente.

Figura 12 - Efeito do tempo de exposição sobre o crescimento radial diário in vitro de *Colletotrichum* spp. às diferentes doses da formulação



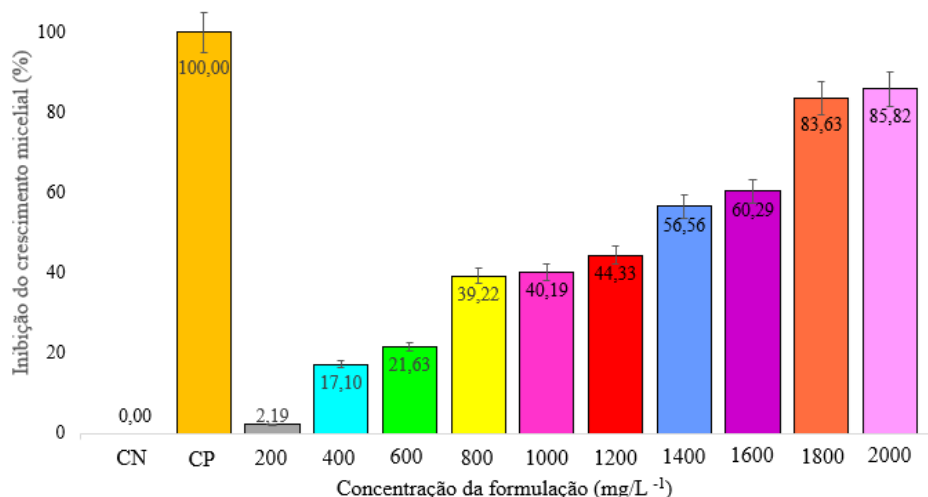
Fonte: Elaborado pelo autor.

*Concentrações (mg.L^{-1}): (B) 200; (C) 400; (D) 600; (E) 800; (F) 1000; (G) 1200; (H) 1400; (I) 1600; (J) 1800; (K) 2000 e (A) controle negativo;

O percentual de inibição de crescimento micelial (ICM) do fungo é diretamente proporcional ao aumento das doses da formulação. Na menor concentração (200 mg.L^{-1}) houve 2,19% de inibição sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Nas duas maiores concentrações (1800 e 2000 mg.L^{-1}) ficou demonstrado melhores resultados de inibição sobre

o crescimento radial e crescimento radial diário, tendo havido inibição de crescimento micelial do fungo na ordem de 83,63 e 85,82% (Figura 13).

Figura 13 - Efeito das doses da formulação (200-2000 mg.L⁻¹), controle positivo e controle negativo sobre o percentual de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura BDA, em 14 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

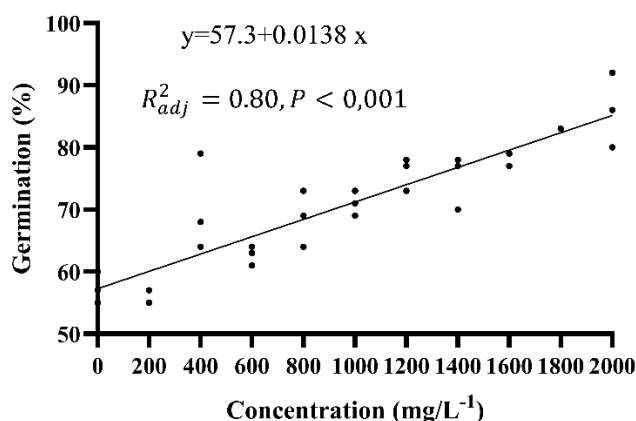
Em ensaios realizados por Alves et al., (2024) com óleo essencial extraído da semente do araticum (*Annona glabra* L.) foram observados que todas as concentrações elencadas para o ensaio se mostraram eficientes na inibição do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, destacando-se a concentração de 7,5 mg.L⁻¹ com ação inibitória chegando a 80%. Em estudos anteriores, realizados por Romão et al. (2023), revelaram que o extrato hidroetanólico das raízes do neem apresentaram alta atividade inibitória contra o fungo *Trichophyton rubrum* (cepas 0204, 0209 e 0210).

Em um estudo comparativo realizado por Mossini et al. (2009) entre o óleo da semente e do extrato da folha do neem, foi observada a capacidade de inibição do crescimento e da esporulação dos fungos *Penicillium verrucosum* e *P. brevicompactum* para ambos os compostos. Contudo, o óleo extraído da semente foi eficiente em todos os níveis testados. Enquanto o extrato das folhas se mostrou menos eficiente na inibição do crescimento micelial do fungo e, potencializou a germinação de conídios.

Os resultados obtidos no presente estudo para a germinação dos conídios foram semelhantes aos relatados por Mossini et al. (2009) para o extrato da folha em relação a viabilidade dos conídios. Para a presente pesquisa os resultados permitem inferir que a

germinação de conídios foi diretamente proporcional a concentração/dose do AFN. Vale ressaltar que quanto maior a concentração, maior foi a germinação de conídios. Esse comportamento foi explicado pelo modelo de regressão linear avaliado a partir da variação da germinação em função das concentrações/dose do extrato (Figura 14). Mesmo com a germinação acontecendo em todas as concentrações (200-2000 mg.L⁻¹) após 24h de ensaio (Tabela 3), não foi possível observar a formação de apressórios nos conídios germinados em nenhuma concentração, indicando que os extratos talvez interfiram no processo de infecção do fungo prejudicando o desenvolvimento da doença.

Figura 14 - Efeito das doses (200-2000 mg.L⁻¹) da formulação sobre a germinação dos conídios de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura BDA, após 24 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Porcentagem de conídios germinados de *Colletotrichum* spp. após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do antifúngico natural (A-N)

	Formulação (mg.L ⁻¹)										Controle negativo	Controle positivo (mg.L ⁻¹)
	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	Apenas água	50
12 h	38	43	43	48	46	52	42	54	57	72	38	0
24 h	55	66	62	69	71	76	77	77	82	88	58	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

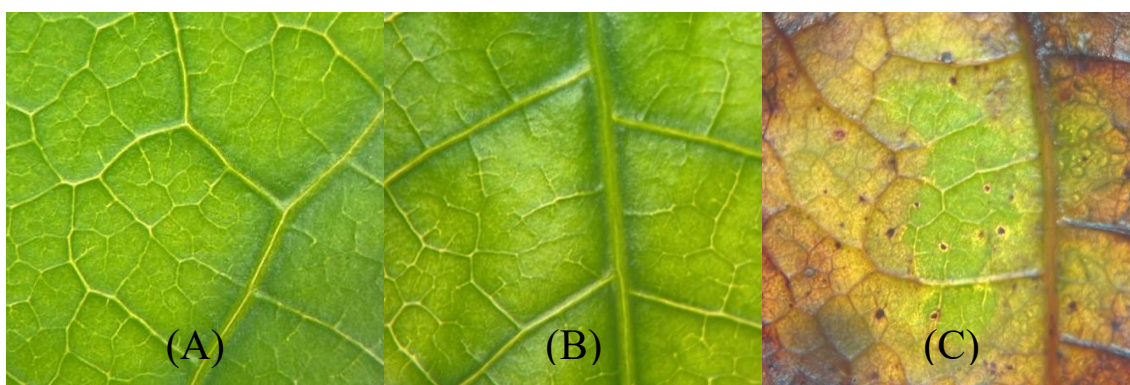
Outros autores também encontram resultados semelhantes para a germinação de conídios. Rodrigues *et al.* (2006) em estudo *in vitro* avaliando o extrato aquoso de gengibre

sobre a germinação de conídios de *Helminthosporium* spp. demonstrou maior germinação nas concentrações de 20 e 40% quando comparado a concentrações de 1, 5 e 10%.

Bonaldo *et al.* (2007) relatam estímulo na germinação de conídios dos fungos *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium* em contato com preparações desenvolvidas a partir do extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, mesmo com a germinação, não houve formação de apressório. O efeito da germinação dos esporos em contato com extrato pode estar relacionado com a presença de compostos com ação estimulante presentes no extrato (Bonaldo e Pascholati, 2007).

Para os ensaios com disco de folha é possível observar que o tratamento apenas com água (Figura 15A) apresenta tecido vegetal sadio com coloração verde uniforme e sem apresentar sintomas característicos de antracnose, de forma semelhante, o disco tratado com fungicida comercial (Figura 15B) também não desenvolveu sintomas demonstrando assim, sua eficiência na inibição da infecção por *Colletotrichum* spp. em tecido vegetal. Em contrapartida, as folhas inoculadas com o patógeno (Figura 15C) exibiram lesões circulares, distribuídas ao longo de limbo foliar, com presença de algumas lesões como indicativo de progressão da ação do fungo sobre o tecido.

Figura 15 - Aspecto visual de discos de folha de *Anacardium occidentale* submetidos a diferentes tratamentos e inoculação com *Colletotrichum* spp



*(A) disco de folha tratado apenas com água; (B) disco de folha tratado com fungicida comercial (controle positivo) e (C) disco inoculado apenas com o patógeno (controle negativo). Fonte: Elaborado pelo autor.

Vanderplank (1963) denomina “período de incubação” como o tempo estabelecido entre o contato do patógeno com o tecido vegetal e o aparecimento dos primeiros sintomas. Nesse contexto, sintoma é a exteriorização da doença visível a olho nu (Bergamin Filho; Amorim, 2002).

Para o período de incubação, de acordo com os dados coletados, é possível inferir que o efeito antifúngico da formulação foi influenciado pelo tempo entre sua aplicação e a inoculação do patógeno. Os dados expressos na Tabela 4 demonstraram que, quando o patógeno entra em contato com o disco de folha em que foi aplicada a formulação no dia 0 ou 3 dias antes, é possível observar um maior desenvolvimento da doença em comparação aos tratamentos em que foi inoculado o fungo após 7 dias de aplicação do extrato, diferindo estatisticamente como representado na Figura 16B. As concentrações testadas não apresentam diferenças estatísticas significativas entre si (Figura 16A), contudo a dose de 1600 demonstra menor período de incubação do patógeno sobre o disco de folha protegido.

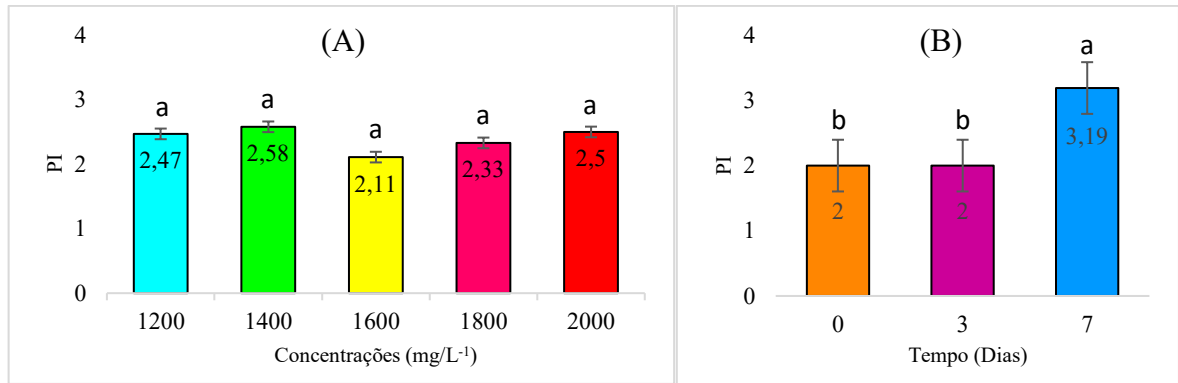
Tabela 4 - Período de incubação de *Colletotrichum* spp. em discos de folha de *Anacardium occidentale* submetidos a diferentes concentrações do produto natural e tempos de inoculação

Período de incubação						
TEMPO	Concentrações (mg.L ⁻¹)					MÉDIA
	1200	1400	1600	1800	2000	
0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0b
3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0b
7	3,41	3,75	2,33	3,0	3,5	3,19a
MÉDIA	2,47a	2,58a	2,11a	2,33a	2,5a	

C.V. 18,27%

*Valores com mesma letra, minúscula nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Efeito das diferentes concentrações da formulação sobre o período de incubação do *Colletotrichum* spp. em discos de folha de cajueiro (A) e influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) no período de incubação do *Colletotrichum* ssp em discos de folha de cajueiro (B)



*Valores com a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$). PI – período de incubação em dias para surgimento dos sintomas

Fonte: Elaborado pelo autor.

Silva (2023) relata que o período incubação do *Colletotrichum* spp. em discos de folhas do cajueiro-anão é cerca de 24 horas, onde após esse tempo o tecido vegetal já apresentava sintomas iniciais. É possível inferir de acordo com os dados do presente estudo que a aplicação da formulação retarda em, pelo menos 24 horas, o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Vale ressaltar que o período de incubação do *Colletotrichum* spp. pode variar de acordo com o hospedeiro e das condições do órgão acometido pelo patógeno (melhorar isso aqui).

O período latente refere-se ao intervalo de tempo entre a infecção inicial do fungo sobre o tecido vegetal e o surgimento de estruturas reprodutivas capazes de iniciar novas infecções (Leifert; Cassells, 2001), durante esse período o patógeno encontra-se ativo colonizando o tecido do hospedeiro, apresentando sinais macroscópicos evidentes (Barnes; Shaw, 2002).

Os resultados expressos na Tabela 5 demonstram que as diferentes concentrações (200-2000 mg.L⁻¹) da formulação não apresentaram alteração significativa para o período de latência do *Colletotrichum* spp. nos discos de folhas, uma vez que todas as médias estatísticas foram semelhantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 17A).

Tabela 5 - Período de latência de *Colletotrichum* spp. em discos de folha de *Anacardium occidentale* submetidos a diferentes concentrações de produto natural e tempos de inoculação

Período de latência						
Concentrações (mg.L ⁻¹)						
TEMPO	1200	1400	1600	1800	2000	MÉDIA
	2,47	2,58	2,11	2,33	2,5	

0	3,66	3,41	3,75	3,25	3,58	3,53c
3	5,33	6,08	5,00	4,41	4,33	5,03b
7	7,16	6,16	6,58	6,33	7,25	6,69a
MÉDIA	5,19a	4,48a	5,11a	4,66a	5,06a	
C.V. 26,25%						

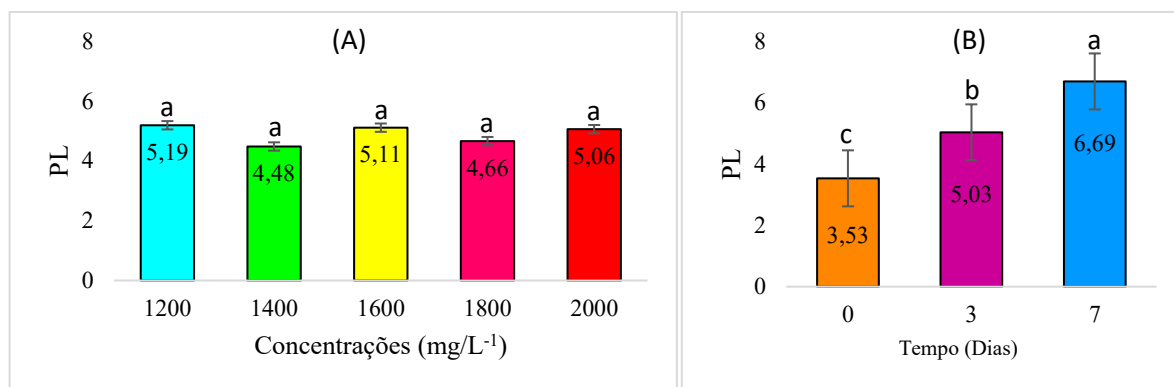
*Valores com mesma letra, minúscula nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em contra partida, o tempo de inoculação após a aplicação da formulação influenciou significativamente o período de latência do patógeno no tecido vegetal. Foi observado que os discos de folha inoculados nos dias 0 e 3 apresentam período de latência menor quando comparados com o grupo inoculado após 7 dias (Figura 17B). Contudo, todos os grupos diferem estatisticamente entre si, sendo assim, o aumento progressivo do período de latência está relacionado com o intervalo da aplicação da formulação e a exposição do tecido vegetal ao patógeno. Tal comportamento demonstra que a formulação precisa de um maior tempo sobre o tecido vegetal para se tornar mais ativa, retardando antracnose desenvolvimento da doença.

Em estudos com disco de folha de cajueiro-anão inoculados com uma suspensão de conídios de *Colletotrichum* spp. Galvino e Martins (2025) foi observado que o período de latência do fungo sobre o tecido vegetal sem ferimento ocorreu em torno de 3 dias, o que se assemelha com os resultados encontrados para o grupo deste experimento que foi inoculado no mesmo dia em que ocorreu a proteção dos discos de folha com a formulação. É possível observar a partir da Figura 17B que quando o patógeno entra em contato com os discos protegidos após 3 e 7 dias seu período de latência se estabelece em torno de 5 e 6 dias respectivamente, demonstrando retardo da ação fúngica quando utilizado sobre os discos de folhas.

Figura 17 - Efeito das diferentes concentrações da formulação sobre o período de latência do *Colletotrichum* spp. em discos de folha de cajueiro (A) e influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) no período de latência do *Colletotrichum* spp. em discos de folha



*Valores com a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$). PL – período latente em dias para a esporulação do fungo. Fonte: Elaborado pelo autor.

A severidade da doença em plantas é definida como a porcentagem da área da superfície do tecido afetado pela doença que apresenta sintomas (Bergamim filho et al., 2018).

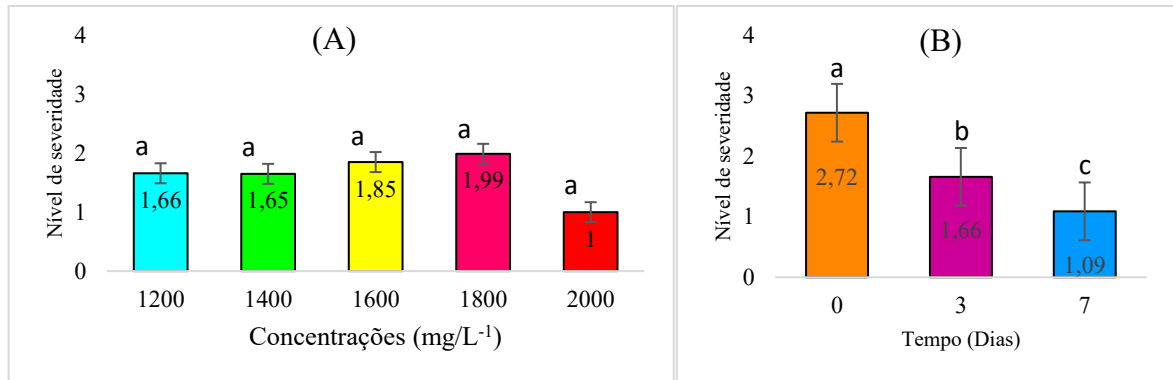
De acordo com a Tabela 6 é possível identificar que a análise estatística da severidade não demonstrou diferença significativa entre as concentrações testadas (1200-2000 mg.L⁻¹), conforme demonstrados pelas letras minúsculas iguais pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 18a). A figura 18B evidenciou uma redução progressiva e estatisticamente significativa na severidade da antracnose nos discos de folha à medida que aumenta o intervalo de tempo entre a aplicação da formulação e o contato do patógeno com o tecido vegetal.

Tabela 6 - Severidade da antracnose causada por *Colletotrichum* spp. em discos de folhas de *Anacardium occidentale* submetidos a diferentes concentrações da formulação e tempos de inoculação

Severidade						
Concentrações (mg.L ⁻¹)						
TEMPO	1200	1400	1600	1800	2000	MÉDIA
0	2,83	2,41	2,41	3,16	2,83	2,72a
3	1,16	1,5	2,0	1,91	1,75	1,66b
7	1,0	1,41	1,16	0,91	1,0	1,09c
MÉDIA	1,66a	1,65a	1,85a	1,99a	1,86a	
C.V. 25,82%						

*Valores com mesma letra, minúscula nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Efeito de diferentes concentrações do produto natural sobre a severidade da antracnose causada por *Colletotrichum* spp. em discos de folha de *Anacardium occidentale* (A) e Influência do tempo de inoculação (0, 3 e 7 dias) sobre a severidade (B)



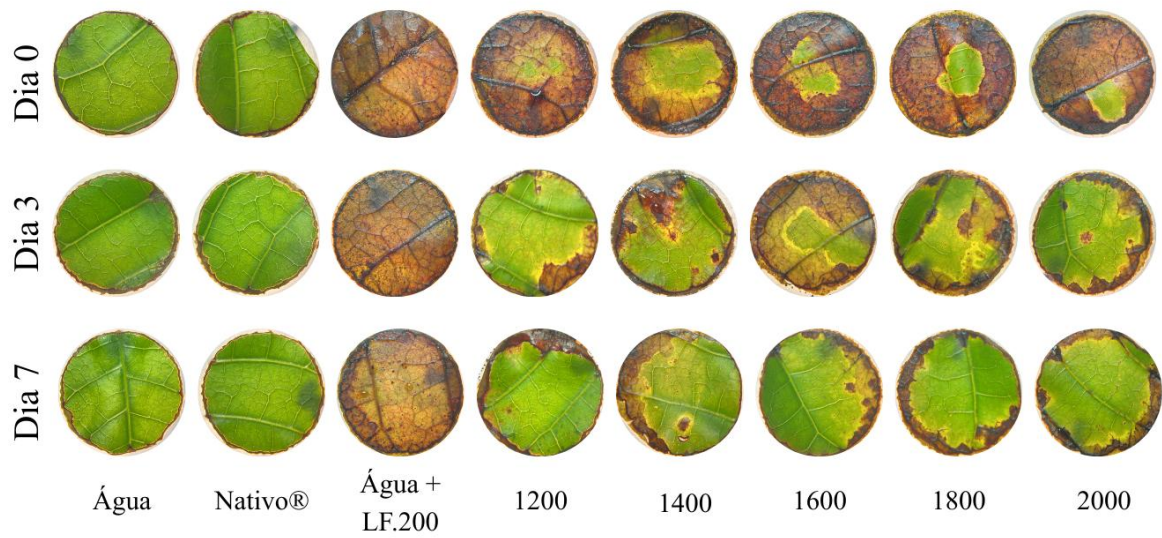
Fonte: Elaborado pelo autor.

*Valores com a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os dados elucidaram que a severidade da antracnose causada pelo *Colletotrichum* spp. não sofreu influência das concentrações da formulação como o observado no Figura 18A, entretanto, a severidade no sétimo dia foi significativamente reduzida com o aumento do intervalo de tempo entre a proteção do disco de folha e a inoculação do fungo (Figura 19B).

É possível observar o nível de severidade na Figura 19, onde, no dia 0 a formulação não foi eficiente no controle da antracnose. Os discos do dia 0 apresentam lesões com coloração marrom-escuro, com coalescência, indicando elevadas taxas de colonização do tecido vegetal. Já para o dia 3 é notório que as lesões são menos expressivas e há um menor escurecimento difuso do tecido em comparação com o dia 0. Entre as variáveis de tempo, a que se mostrou mais eficiente foi o grupo 7, demonstrando uma porcentagem girando em torno de 75% de área preservada para as concentrações testadas.

Figura 19 - Comparação visual da severidade da antracnose sob diferentes concentrações da formulação (1200-2000 mg.L⁻¹), controle negativo (apenas fungo) e controle positivo (fungicida comercial) e períodos de inoculação em dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

Galvino e Martins (2025) ao avaliarem a severidade de discos de folha do cajueiro anão inoculados com suspensão de conídios de *Colletotrichum* spp foi observado que a área de tecido foliar acometido pelo fungo chegou a cerca de 50%, resultado duas vezes maior quando comparado com os dados do grupo inoculado após 7 dias de proteção, demonstrando a eficiência da formulação. Já para a avaliação de severidade em outras culturas Santos *et al.* (2007) estudaram o extrato aquoso proveniente de folhas de lobeira infectadas com *Crinipellis perniciososa* sobre tecido vegetal do cefeieiro, onde foi observado uma redução na severidade de 27% para a ferrugem e 46% para cercosporiose. Os resultados encontrados se aproximam do efeito para a redução da severidade da ferrugem do cafeeiro tratado com o extrato folhas de lobeira infectadas com *Crinipellis perniciososa*.

Os dados sobre a quantificação de conídios de *Colletotrichum* spp. expressos na tabela 7 demonstram efeito significativo do tempo de incubação sobre a esporulação, enquanto as concentrações testadas não diferem estatisticamente entre si. No tempo 0 (Figura 20B) foi possível notar uma produção elevada na produção de conídios, diferindo estatisticamente dos tempos 3 e 7. Essa diminuição no dia 3 demonstra que a formulação promoveu uma acelerada inibição da esporulação. Efeito esse que se repete no dia 7, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os dois períodos. Esses valores são expressos visualmente na Figura 19, onde no grupo 0 apresentou maiores sinais de severidade da doença sobre o tecido

graças ao elevado número de conídio. Já para o efeito da concentração, mesmo existindo uma variação numérica, não existe significância estatística entre si, pois todas as concentrações apresentam a mesma letra no teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 20A),

Tabela 7 - Produção média de conídios de *Colletotrichum* spp. sob diferentes concentrações (mg L^{-1}) e tempos de incubação

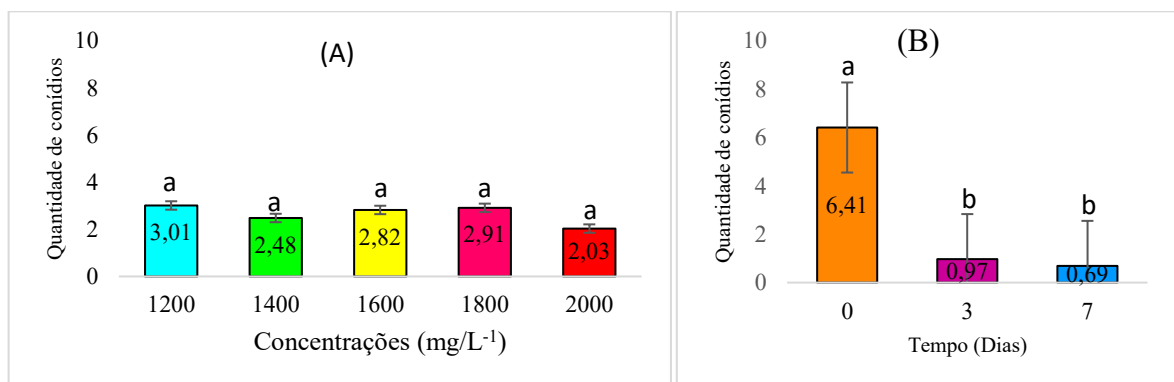
Quantificação de conídios						
TEMPO	Concentrações (mg.L^{-1})					MÉDIA
	1200	1400	1600	1800	2000	
0	8,03	5,86	7,2	7,53	3,44	6,41a
3	0,86	1,33	0,63	0,9	1,13	0,97b
7	0,16	0,26	0,63	0,3	1,13	0,69b
MÉDIA	3,01a	2,48a	2,82a	2,91a	2,03a	

C.V. 25,53%

*Valores com mesma letra, minúscula nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Efeito das concentrações do tratamento sobre a produção de conídios de *Colletotrichum* spp. (A) e produção média de conídios em diferentes períodos de inoculação (B)



*Valores com a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Conclusão

A formulação à base de extrato etanólico de neem e óleo essencial de cravo-da-índia nas duas maiores doses tem potencial de retardar o crescimento do fungo *Colletotrichum* spp. e inibir em mais de 80% a formação de tubo germinativo, em meio de cultura. No entanto a formulação não se mostra eficiente na inibição da germinação dos conídios da espécie estudada. A proteção do disco de folha com a formulação foi eficiente apenas com um intervalo de 7 dias entre a proteção e a inoculação do patógeno em questão.

REFERÊNCIAS

AGROFIT – SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.**

ALVES, W. F. *et al.* Controle alternativo de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. com óleo essencial de araticum (*Annona glabra* L.) da Amazonia Ocidental. **Scientia Naturalis**, v. 6, n. 2, 30 nov. 2024.

AMEDE, S. C. *et al.* Morfo-anatomia e histoquímica foliar de *Azadirachta indica* A. JUSS (Neem) (*Meliaceae*), cultivadas em Goiás. **Revista Uniaraguaia**, p. 65–89, 2015.

BARNES, S. E.; SHAW, M. W. Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *Primula x polyantha*. **Plant Pathology**, v. 51, n. 6, p. 746–754, 1 dez. 2002.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 561–565, nov. 2002.

BONALDO, S. M. *et al.* Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum*

sublineolum e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 233–238, set. 2007.

BUENO, N. G. *et al.* Extração e caracterização de óleos essenciais do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*). **Journal of Exact Sciences-JES**, v. 37, n. 1, p. 8–10, 2023.

COLCOL, J. F. *et al.* Sensitivity of erysiphe necator to demethylation inhibitor fungicides in Virginia. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 111–116, 1 jan. 2012.

FORTÍ, J. A. **Aspectos patológicos, epidemiológicos y culturales de Acremonium cucurbitacearum** Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez. Tesis Doctoral—Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 1997.

FREIRE, F. C. O. *et al.* Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, n. 6, p. 489–494, 1 jul. 2002.

GALVINO, M. E. C. M.; MARTINS, M. V. V. Bioensaio no estabelecimento e desenvolvimento da antracnose do cajueiro-anão. 2025.

GUERRA, M. S. *et al.* Uso de óleos essenciais no controle do fungo *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (1957). **Acta Biológica Catarinense**, v. 8, n. 3, p. 4–12, 28 set. 2021.

HOLDER-JOHN, A. W. B.; ELIBOX, W.; UMAHARAN, P. A rapid leaf-disc vacuum-infiltration screening for assessing resistance to bacterial leaf spot disease in anthurium. **Scientia Horticulturae**, v. 288, p. 110344, 15 out. 2021.

KHAN, M. R. *et al.* Antifungal activity of propyl disulfide from neem (*Azadirachta indica*) in vapor and agar diffusion assays against anthracnose pathogens (*Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*) in mango fruit. **Microorganisms** **2021**, Vol. **9**, Page **839**, v. 9, n. 4, p. 839, 14 abr. 2021.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **2001** **37:2**, v. 37, n. 2, p. 133–138, 2001.

LOPES, K. A. S. *et al.* Eficiência de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum Theobromicola* *in vitro*. 2022. Acesso em: 25 out. 2025

MARTINS, M. V. V.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. **Sistema de produção do caju–doenças do cajueiro.**

MELO, E. G. *et al.* Atividade antimicrobiana da planta *Azadirachta indica* (nim indiano) – uma revisão integrativa. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, p. 2615–2636, 2022.

MENTEN, J. O. M. *et al.* Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57–66, 1976.

MOSSINI, S. A. G.; ARROTÉIA, C. C.; KEMMELMEIER, C. Effect of neem leaf extract and neem oil on *Penicillium Growth*, sporulation, morphology and ochratoxin a production. **Toxins** **2009**, Vol. **1**, Pages **3-13**, v. 1, n. 1, p. 3–13, 23 jul. 2009.

MOTALLEBI, P.; NEGAHBAN, M. Neem (*Azadirachta indica*) seed extract formulation for managing anthracnose and gray mold diseases in strawberry. **South African Journal of Botany**, v. 169, p. 66–71, 1 jun. 2024.

NEGLO, D. *et al.* Antibiofilm activity of *Azadirachta indica* and *Catharanthus roseus* and their synergistic effects in combination with antimicrobial agents against fluconazole-resistant candida albicans strains and MRSA. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, n. 1, p. 9373524, 1 jan. 2022.

RODRIGUES, B. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 18, n. 1, p. 123–127, 2006.

SERRANO, L. A. L. ; PESSOA, P. F. A. P. **Sistema de produção do caju – aspectos econômicos da cultura do cajueiro.**

SERRANO, L. A.; OLIVEIRA, V. H. Aspectos botânicos, fenologia e manejo da cultura do cajueiro. *In*: ARAÚJO, J. P. P. (Org.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 77–175.

SILVA, J. A. Aplicação da microscopia eletrônica de varredura na caracterização do processo infeccioso de *Colletotrichum* em folhas de clones de cajueiro. 2023.

VIDAL NETO, F. C. *et al.* Melhoramento genético e cultivares de cajueiro. *In*: ARAÚJO, J. P. P. (Org.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 481–508.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto no presente trabalho é possível afirmar que a formulação possui atividade antifúngica frente ao *Colletotrichum* agente causal da antracnose do cajueiro. Sua eficiência foi comprovada frente a metodologia a) *in vitro* inibindo o crescimento micelial do patógeno, mesmo intensificando a germinação dos tubos germinativos dos conídios, contudo não foi identificado a presença de apressórios nos tubos germinados; e b) *in vivo* em discos de folhas que tiveram contato com o patógeno após 7 dias de proteção. A formulação tem potencial se der utilizada como produto antifúngico por produtores de caju no combate da antracnose.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. *et al.* Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146–161, 14 maio 2012c.

ALMEIDA, Luiza H. F. de *et al.* Viabilidade econômica da produção de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Nativa**, v. 5, n. 1, 2017.

ALVES, Amanda Lucia. CONTROLE ALTERNATIVO DE ANTRACNOSE NO CAJUEIRO. **Anais II CONIDIS**, v. 3322, n. 83, p. 3222, 2017.

AMEDE, S. C. *et al.* Morfo-anatomia e histoquímica foliar de *Azadirachta indica* a. juss (neem) (meliaceae), cultivadas em goiás. **Revista Uniaraguaia**, p. 65–89, 2015.

BERNARDI, N. O.; MEURER, M.; ARANTES, V. P. Estudo da atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Azadirachta indica* “neem” frente a cepa padrão de *Streptococcus pyogenes* atcc 19615. **Arquivo Ciência e Saúde UNIPAR**, v. 16, 2012.

BUENO, N. G. *et al.* Extração e caracterização de óleos essenciais do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*). **Journal of Exact Sciences-JES**, v. 37, n. 1, p. 8–10, 2023.

CARDOSO, J. E. *et al.* Doenças do cajueiro. *In*: ARAÚJO, J. P. P. de (Org.). **Agronegócio do Caju: práticas e inovações**. Embrapa, 2013.

CARVALHO, P. R. S. Extratos vegetais: potencial elicitador de fitoalexinas e atividade antifúngica em antracnose do cajueiro. 28 abr. 2010.

COSTA, A. R. T. *et al.* Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240–245, 2011.

DOS VENTUROSOS, L. R. *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18–23, jan. 2011.

EID, S. Y. *et al.* Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1307–1314, 15 nov. 2012.

FERREIRA, I. *et al.* Bioprospecção farmacológica: avaliação fitoquímica do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 16, p. 215–226, 2020.

FREIRE, F. C. O. *et al.* Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, n. 6, p. 489–494, 1 jul. 2002.

GAMARRA-ROJAS, G. *et al.* Contexto, agricultura e interação no agroecossistema familiar do caju no Semiárido brasileiro.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de Castanha-de-caju (cultivo)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>>. Acesso em: 2 fev. 2026.

KASPER, A. A. M. *et al.* Vista do Comparação da atividade antifúngica do óleo comercial e do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* Juss) frente a fungos fitopatogênicos. **Ibero-American Journal of Environmental Sciences**, v. 9, n. 6, p. 54–62, 2018.

KIPLE, K. F.; ORNELAS, K. C. The History and Culture of Food and Drink in Asia. **The Cambridge World History of Food**, p. 1140–1151, 1999.

LIMA, R. R.; SILVA, F. P. Nim (*Azadirachta indica*): uma abordagem sobre uso como inseticida natural. **Revista Científica Acertte - ISSN 2763-8928**, v. 2, n. 10, p. e21099–e21099, 5 out. 2022.

MACHADO, P. P.; HARALAMPIDOU, G. C. V.; MACHADO, R. A. Uso da própolis e óleo de nim no controle dos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloesporioides*: principais patógenos que acometem os frutos da manga. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 31–37, 2015.

MARTINS, M. V. V.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. **Sistema de produção do caju–doenças do cajueiro.**

MELO, E. G. *et al.* Atividade antimicrobiana da planta *Azadirachta indica* (nim indiano) – uma revisão integrativa. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, p. 2615–2636, 2022.

MENEZES, R. M. S. *et al.* Extração, caracterização, prospecção por CG-EM e efeito bactericida do óleo essencial de NIM (*Azadiracht indica*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e507101523154, 2 dez. 2021.

NEGLO, D. *et al.* Antibiofilm Activity of *Azadirachta indica* and *Catharanthus roseus* and Their Synergistic Effects in Combination with Antimicrobial Agents against Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strains and MRSA. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, n. 1, p. 9373524, 1 jan. 2022.

NEGREIROS, R. J. Z. *et al.* Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-’prata’ com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 51–58, 2013.

OLUFEMI, A. D.; ABANUM, N. B.; CHRISTERBETH, O. E. Emergence and Morphological Response of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Treated Nuts as Influenced by Some Fungicides on Young Seedlings. **Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research**, v. 10, n. 3, p. 1–8, 8 mar. 2023.

ROMÃO, A. L. E. *et al.* Perfil metabólico, atividade antimicrobiana e de toxicidade das raízes de *Azadirachta indica*. **Ciência Rural**, v. 53, n. 5, p. e20210683, 2023.

SERRANO, L. A.; OLIVEIRA, V. H. Aspectos botânicos, fenologia e manejo da cultura do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. (Org.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 77–175.

SINGARAVELU, S. *et al.* Effect of *Azadirachta indica* crude bark extracts concentrations against gram-positive and gram-negative bacterial pathogens. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 38–42, 1 jan. 2019.

SANTOS, L. G. M. *et al.* Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecno-Lógica**, v. 11, n. 11, p. 11–14, 20 dez. 2007.

SOUZA, A.; VIEIRA, G.; NEVES, L. Uso de óleos essenciais no controle do *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose no caju. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1709–1715, 30 jun. 2019.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. **Planta Medica**, v. 77, n. 11, p. 1168–1182, 2011.

VENTUROSOS, L. R. *et al.* Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 499–505, 2010.

VIDAL NETO, F. C. *et al.* Melhoramento genético e cultivares de cajueiro. *In*: ARAÚJO, J. P. P. (Org.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 481–508.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 97–110, 1 mar. 2009.