



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

JULIANA TRINDADE LIMA

**USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE
FUNGOS EM SEMENTES CRIOULAS**

VITÓRIA - ES

2023

JULIANA TRINDADE LIMA

**USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE
FUNGOS EM SEMENTES CRIOULAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hildegardo Seibert França

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Fernando de Souza

VITÓRIA - ES

2023

L732u LIMA, Juliana, 1988-
Uso de extratos vegetais para o controle de fungos em
sementes crioulas / Juliana LIMA. - 2023.
111 f. : il.

Orientador: Hildegardo França.

Coorientador: Antonio Souza.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. metabólitos secundários. 2. Agroecologia. 3. Fungos. 4.
Antioxidantes. I. França, Hildegardo. II. Souza, Antonio. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

ATA DE DEFESA DE TESE DO CURSO DE DOUTORADO EM BIOLOGIA VEGETAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - ATA Nº 45 – 24/02/2023

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e três, em sessão pública, realizada através de webconferência, conforme previsto na Portaria Normativa nº 08 da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFES, de 01 de junho de 2021, procedeu-se a avaliação da tese da aluna **Juliana Trindade Lima**. Às catorze horas, o Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (UFES), Orientador e Presidente da Comissão Examinadora de Defesa de Tese, deu início aos trabalhos, convidando a compor a banca os Examinadores Internos: Prof^ª. Dr^ª. Viviana Borges Corte e Prof. Dr. Stéfano Zorzal de Almeida, e os Examinadores Externos: Prof. Dr. Jean Carlos Vencioneck Dutra (SEDU) e Prof. Dr. Leonardo Faria Silva (FEST). Com a presença também do Coorientador, professor Dr. Antonio Fernando de Souza (UFES). A seguir, o Presidente solicitou à doutoranda que fizesse uma explanação de seu trabalho intitulado "**USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE FUNGOS EM SEMENTES CRIOULAS**". Finalizada a apresentação, o Presidente passou a palavra aos examinadores, que procederam à arguição da candidata. Ao final, a Comissão, em sessão reservada, deliberou pela **APROVAÇÃO** da referida tese nos termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e alertou que a aprovada somente terá direito ao título de Doutora após entrega da versão final de sua tese, em meio digital, à Secretaria do Programa. Encerrada a sessão, eu, Prof. Dr. Hildegardo Seibert França, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente ata que vai assinada digitalmente, por mim e pelos demais componentes da Comissão.

Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (UFES)  **HILDEGARDO SEIBERT FRANÇA**
Data: 27/02/2023 15:44:46-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>


Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Viviana Borges Corte (UFES)

Examinadora Interna

Prof. Dr. Stéfano Zorzal de Almeida (UFES)

Examinador Interno

 **JEAN CARLOS VENCIONECK DUTRA**
Documento assinado digitalmente
Data: 01/03/2023 19:02:35-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Jean Carlos Vencioneck Dutra (SEDU)

Examinador Externo

Prof. Dr. Leonardo Faria Silva (FEST)

Examinador Externo



Documento assinado digitalmente:
LEONARDO FARIA SILVA
Data: 28/02/2023 13:45:25-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Secretaria Integrada de Programas de Pós-Graduação – SIP

Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo situada à Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras - 29075-910
– Vitória/ES. Tel.: (27) 4009-2524 – sip.ufes2@gmail.com – www.secretaria.cchn.ufes.br.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por

VIVIANA BORGES CORTE - SIAPE 2699666

Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN Em
27/02/2023 às 20:55

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658327?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo <https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658327?tipoArquivo=O>

Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por

STEFANO ZORZAL DE ALMEIDA - SIAPE 1099750

Departamento de Oceanografia e Ecologia - DOE/CCHN Em
01/03/2023 às 09:03

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/659286?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), pela oportunidade de fazer o curso.

À agência de fomento à pesquisa que subsidiou a bolsa de pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À agência de fomento que subsidiou o projeto de pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES)- APES/SEAG (Processo 76449130/16)

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) *campus* Vila Velha e Santa Teresa, pelo espaço cedido para a realização das análises experimentais.

Ao Laboratório de Petrolômica e Química Forense da UFES pelas análises químicas.

Ao meu orientador Dr. Hildegardo Seibert França, pela credibilidade e apoio no curso.

Ao meu coorientador Dr. Antonio Fernando de Souza, pelo projeto e atendimentos.

Ao LASEF, à professora Dra. Viviana por ceder o espaço para a realização da pesquisa e ao Dr. Josinei por toda ajuda com as análises.

Aos colegas de laboratório: Maria Gabriela, Plúcia e Tiago pela colaboração na realização das análises .

Aos membros da banca de defesa, pelas contribuições.

A todos os professores que participaram direta ou indiretamente na minha aquisição de conhecimento.

À minha família que sempre me apoiou e compreendeu as minhas ausências. À Deus, pela sabedoria e força.

RESUMO

As sementes crioulas podem ser definidas como aquelas variedades tradicionais de plantas cultivadas e adaptadas aos locais onde se desenvolveram por muitos anos. Constituem uma importante forma de recuperação e preservação da base genética de muitas espécies de plantas cultivadas. As condições precárias de armazenamento em cultivos agroecológicos podem contribuir para a ocorrência de diversos fungos que infestam as sementes crioulas. Estes organismos são capazes de promover a deterioração mais rápida das sementes colhidas e afetar sua germinação, logo os agricultores recorrem às sementes melhoradas e/ou tratadas com fungicidas químicos colocando em risco a sobrevivência desse patrimônio genético armazenado *in vivo*. A aplicação extensa e repetida desses agroquímicos sintéticos pode levar a efeitos negativos, como fungos resistentes, contaminação ambiental e de organismos não alvos. Portanto, criam um ímpeto para a busca de medidas alternativas de controle naturalmente seguras, como extratos de plantas com potencial antifúngico. Os extratos de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) e alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) têm demonstrado efeito inibidor no crescimento de fungos de pós-colheita. Com isso, o objetivo foi avaliar os efeitos de extratos vegetais no controle de fungos e na qualidade fisiológica de sementes crioulas de feijão e milho antes e após o armazenamento. As folhas de aroeira e alfavaca-cravo foram coletadas na Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Viana, ES. Os extratos etanólicos foram obtidos por maceração em etanol e posterior fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Foram investigados os extratos etanólicos e suas respectivas frações de polaridades crescentes de folhas de ambos os vegetais quanto à composição química, atividade antioxidante e antifúngica *in vitro* sobre os fungos associados a sementes crioulas durante o armazenamento. O extrato etanólico e a fração diclorometano de ambas as plantas apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento *in vitro* fúngico de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. A fração butanol da aroeira exibiu a maior capacidade antioxidante, porquanto na alfavaca-cravo o extrato etanólico este efeito foi mais acentuado. Diante dos resultados antifúngicos, os extratos de alfavaca-cravo foram mais ativos contra os fungos testados. As sementes foram adquiridas do banco de

sementes do Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Santa Teresa, ES. As sementes foram submetidas ao extrato etanólico e fração diclorometano de folhas de alfavaca-cravo e a nanoemulsão de eugenol e armazenadas em recipientes de plásticos a temperatura ambiente. Foi realizado o teste de sanidade e germinação das sementes, no pré e pós-armazenamento. Os fungos encontrados nas sementes são dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Nas sementes de feijão o tratamento com nanoemulsão de eugenol foi mais eficaz na redução da incidência dos patógenos, por outro lado, nas sementes de milho, o extrato etanólico e a fração diclorometano foram mais ativos. A fração diclorometano e a nanoemulsão de eugenol afetaram negativamente o vigor das sementes de ambas as culturas. Os resultados indicam potencial do uso de extratos de *O. gratissimum* na preservação de sementes armazenadas.

Palavras-chave: Agroecologia • fitopatógenos • metabólitos secundários • pesticidas • sementes

ABSTRACT

Creole seeds can be defined as those traditional varieties of plants cultivated and adapted to the places where they have developed for many years. They constitute an important way of recovering and preserving the genetic base of many species of cultivated plants. Precarious storage conditions in agroecological crops can contribute to the occurrence of several fungi that infest native seeds. These organisms are able to promote faster deterioration of harvested seeds and affect their germination, so farmers resort to improved seeds and/or seeds treated with chemical fungicides, putting the survival of this genetic heritage stored *in vivo* at risk. Extensive and repeated application of these synthetic agrochemicals can lead to negative effects such as resistant fungi, environmental and non-target organism contamination. Therefore, they create an impetus for the search for alternative control measures that are naturally safe, such as plant extracts with antifungal potential. Aroeira extracts (*Schinus terebinthifolia* Raddi) and clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) have demonstrated an inhibitory effect on the growth of post-harvest fungi. Thus, the objective was to evaluate the effects of plant extracts on fungal control and on the physiological quality of native bean and corn seeds before and after storage. Mastic and clove basil leaves were collected at the Reginaldo Conde Agricultural Engineer Experimental Farm (FERC) at the Capixaba Institute for Research, Technical Assistance and Rural Extension (INCAPER), Viana, ES. The ethanolic extracts were obtained by maceration in ethanol and subsequent fractionation with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). Ethanol extracts and their respective fractions of increasing polarity of leaves of both plants were investigated for chemical composition, *in vitro* antioxidant and antifungal activity on fungi associated with creole seeds during storage. The ethanolic extract and the dichloromethane fraction of both plants showed the best results for inhibiting the *in vitro* fungal growth of *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. The butanol fraction of aroeira showed the highest antioxidant capacity, as in clove basil the ethanolic extract had this effect more pronounced. In view of the antifungal results, clove clove extracts were more active against the fungi tested. Seeds were purchased from the Instituto Federal of Espírito Santo seed bank, *campus* Santa Teresa, ES. The seeds were submitted to ethanolic extract and dichloromethane fraction of clove basil leaves and eugenol nanoemulsion and stored in plastic containers at room temperature. The

sanity and germination test of the seeds was carried out, in the pre and post storage. The fungi found in the seeds are of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*. In bean seeds, treatment with eugenol nanoemulsion was more effective in reducing the incidence of pathogens, on the other hand, in corn seeds, ethanolic extract and dichloromethane fraction were more active. The dichloromethane fraction and the eugenol nanoemulsion negatively affected the seed vigor of both crops. The results indicate potential use of *O. gratissimum* extracts in the preservation of stored seeds.

Keywords: Agroecology • pesticides • phytopathogens • Secondary metabolites • seeds

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEtOH e FDCM em diferentes concentrações.....	50
Figura 2: Cromatogramas com os compostos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa a partir do extrato etanólico e das frações hexânica e diclorometano das folhas de <i>S. terebinthifolia</i>	55

Capítulo 3

Figura 1: Incidência de fungos em sementes crioulas de feijão (a) e milho (b).....	97
Figura 2: Incidência de fungos (%) em sementes crioulas de feijão (a-c- e) e milho (b-d-f) submetidas ao tratamento com diferentes produtos e armazenadas em dois períodos (0 e 60 dias)..	99
Figura 3: Teor de água (b.u.%) de sementes crioulas de feijão (a) e milho (b) armazenadas em dois períodos.....	100

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos grupos químicos pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD).....	46
Tabela 2: Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. submetidos a diferentes concentrações do extrato etanólico e frações de folhas de <i>S. terebinthifolia</i>	49
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEtOH e FDCM de folhas de <i>S. terebinthifolia</i> contra o o crescimento de <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	50
Tabela 4: Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante por DPPH e ABTS do extrato etanólico e frações de folhas de <i>S. terebinthifolia</i>	51
Tabela 5: Prospecção fitoquímica por cromatografia de camada delgada do extrato etanólico e suas frações de folhas de <i>S. terebinthifolia</i>	52
Tabela 6: Compostos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa a partir dos extratos etanólico e das frações hexano e diclorometano das folhas de <i>S. terebinthifolia</i>	54

Capítulo 2

Table 1: Systems and revealing reagents of the respective chemical groups using the thin layer chromatography (TLC) technique.	72
Table 2: Mycelial growth inhibition percentage (GIP) of <i>Aspergillus</i> sp. and <i>Rhizopus</i> sp. submitted to different ethanolic extract concentrations and fractions from <i>O. gratissimum</i> leaves	74
Table 3: Minimum Inhibitory Concentration (mg/mL) of extracts from <i>O. gratissimum</i> leaves.	75
Table 4: Antioxidant capacity of the ethanolic extract and fractions from <i>O. gratissimum</i> leaves.....	76
Table 5: Phytochemical prospection by thin layer chromatography of the ethanolic extract and fractions from <i>O. gratissimum</i> leaves.....	77

Table 6:Compounds identified by GC/MS from the ethanolic extract and the hexane and dichloromethane fractions from *O. gratissimum* leaves.....78

Capítulo 3

Tabela 1: Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Primeira contagem de germinação (PCG), Emergência (E), Índice de velocidade de emergência (IVE), Comprimento de raiz (Raiz), Comprimento de caule (Caule) de acordo com os tratamentos em cada tempo de armazenamento de sementes de feijão e milho crioulas..... 102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2. OBJETIVO GERAL.....	19
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 Sementes crioulas.....	20
4.2 Armazenamento de sementes.....	21
4.3 Metabólitos secundários.....	23
4.4 <i>Ocimum gratissimum</i>	25
4.5 <i>Schinus terebinthifolia</i>	27
5. REFERÊNCIAS	30
CAPITULO 1 – POTENCIAL FUNGICIDA E ANTIOXIDANTE DE <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIA</i> NO CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS A SEMENTES ARMAZENADAS	
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS.....	59
CAPITULO 2 –NATURAL ALTERNATIVE FROM <i>OCIMUM GRATISSIMUM</i> AGAINST FUNGI ASSOCIATED WITH TRADITIONAL SEEDS DURING STORAGE.....	
RESUMO	63
ABSTRACT.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	66

3. RESULTADOS	74
4. DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS	83
CAPITULO 3 – PROTEÇÃO DE SEMENTES ARMAZENADAS COM EXTRATOS DE ALFAVACA-CRAVO (<i>OCIMUM GRATISSIMUM L.</i>)	
RESUMO	87
ABSTRACT	88
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	90
3. RESULTADOS	91
4. DISCUSSÃO	96
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS	106
1. INTRODUÇÃO.....	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

As variedades de sementes tradicionais, crioulas ou *landraces* podem ser definidas como aquelas variedades tradicionais de plantas adaptadas aos locais onde são produzidas, que não sofreram modificações genéticas por meio de melhoramento. São importantes na sobrevivência de pequenos agricultores, como base alimentar, econômica e na preservação histórico-cultural em comunidades tradicionais (ANTONELLO et al., 2009; DJAU, 2012; BARBOSA et al., 2015).

Estas sementes são adquiridas por meio de trocas com vizinhos, feiras, bancos ou de sua própria produção. Parte dessas sementes é armazenada para o uso doméstico e para plantio na safra seguinte (LEITE et al., 2018). No entanto, durante este processo os agricultores enfrentam dificuldades na conservação fisiológica e sanitária devido às condições inadequadas de armazenagem e ao ataque de pragas e doenças, principalmente os fungos fitopagênicos (STEFANELLO et al., 2015; GAROFOLO et al., 2018; LEITE et al., 2018;).

Condições de altas temperaturas e umidade durante o armazenamento favorecem o desenvolvimento de diversos fungos associados externamente às sementes, como aqueles pertencentes aos gêneros, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium* (BEGUM et al., 2013; STEFANELLO et al., 2015). Tais patógenos são capazes de acelerar a deterioração das sementes reduzindo a sua capacidade germinativa e vigor, assim afetando a produção. Além disso, alguns fungos ainda podem produzir micotoxinas, inviabilizando o consumo (BEGUM et al., 2013).

Diante disso, os agricultores recorrem às sementes melhoradas e/ou tratadas com fungicidas químicos (LIMA et al., 2014) colocando em risco a sobrevivência desse patrimônio genético *in vivo* nas comunidades rurais e manutenção de aspectos culturais locais que garantem a soberania alimentar dessas comunidades.

A Instrução Normativa nº 17 de 18 de junho de 2014 estabelece que, a partir de 2016, toda semente e mudas obtida por produtores orgânicos, deverão ser originadas apenas do sistema orgânico de produção, ou seja, que não tenham recebido a aplicação de produtos químicos sintéticos (BRASIL, 2014; CORSINI et al., 2014).

Portanto, pesquisas com extratos de plantas estão sendo desenvolvidas em busca de medidas alternativas de controle, ambientalmente seguras e aceitáveis,

contra pragas agrícolas. O óleo essencial e extratos de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) apresentam substâncias bioativas com propriedades antifúngicas contra *Malassezia furfur* (OLIVEIRA et al., 2018) e *Paracoccidioides brasiliensis* (JOHANN et al., 2010). A alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) é constituída por compostos fenólicos, flavonóides, terpenoides, ácidos graxos, taninos, alcaloides com potencial biológico (MANN, 2012; NASSAZI et al., 2020). O efeito fungicida já foi determinado no óleo essencial alfavaca-cravo (MOHR et al., 2017). Contudo, apesar de muitas pesquisas desenvolvidas sobre a bioatividade dos extratos de aroeira e alfavaca-cravo contra fitopatógenos, pouco se sabe sobre a eficiência dessas plantas na proteção de sementes crioulas contra fungos durante o armazenamento.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de extratos vegetais de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) e *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) no controle de fungos e na qualidade fisiológica de sementes crioulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays* L.) pré e pós-armazenamento.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos vegetais etanólicos e suas frações de polaridades crescentes de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) e *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo);
- Estudar o potencial antioxidante e antifúngico *in vitro* dos extratos e frações obtidas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) e *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo);
- Identificar os extratos com melhores atividades biológicas *in vitro*, potencial antioxidante e antifúngico;
- Avaliar a presença das classes de metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais mais ativos nos testes biológicos;
- Investigar os efeitos dos extratos mais ativos na germinação e no crescimento de sementes crioulas;
- Avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes crioulas armazenadas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sementes crioulas

Sementes crioulas ou sementes da paixão são aquelas sementes que não foram modificadas geneticamente por meio de técnicas em laboratório, ou seja, que não sofreram mudanças como de melhoramento genético, inclusive, nesse contexto, pela transgenia (BARBOSA et al., 2015).

De acordo com a Lei N°. 10.711, de 5 de agosto de 2003, no seu Artigo segundo, as sementes crioulas foram definidas como: variedade desenvolvida, adaptada ou produzida por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, com características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), considerados também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizam como substancialmente semelhantes às cultivares comerciais (BRASIL, 2003).

As sementes crioulas são consideradas como parte de um patrimônio genético e cultural de diversos povos tradicionais, indígenas, quilombolas e de agricultores familiares, e são fundamentais para a conservação *in situ* dos recursos e da agrobiodiversidade. As sementes são consideradas recursos básicos e relevantes para autonomia, segurança alimentar e nutricional, necessárias para permanência do homem no campo com a diversificação produtiva (ARAÚJO et al., 2013).

Em geral, estas sementes são adquiridas por meio de trocas com vizinhos, feiras, bancos ou de sua própria produção. Parte dessas sementes é armazenada para o uso doméstico e para plantio na safra seguinte (LEITE et al., 2018). Este armazenamento das sementes, por agricultores familiares tem sido uma forte resistência à simplificação dos sistemas produtivos e, sobretudo à erosão genética causada pela perda de variedades crioulas (GAROFALO et al., 2018). Em muitas situações observa-se perda de viabilidade da semente devido ao armazenamento inadequado e ao ataque de pragas e doenças que acabam afetando a disponibilidade das sementes para o agricultor, assim como a perda de variedades tradicionais locais importantes. A forma de armazenamento mais comum pelos

agricultores tem sido o realizado em garrafas polietileno tereftalato (PET) (GAROFOLO et al., 2018).

4.2 Armazenamento de sementes

As sementes são uma etapa importante do ciclo de vida, pois garantem a sobrevivência da planta em condições ambientais desfavoráveis e a transferência da informação genética dos pais para os descendentes (KUREK et al., 2019). O armazenamento é o componente central das práticas de pós-colheita (AFFOGNON et al., 2015). A razão fundamental para o armazenamento de sementes é manter sua qualidade fisiológica durante todo o período de armazenamento, minimizando a deterioração (DELOUCHE, 2022).

O armazenamento da semente é influenciado pela manutenção da viabilidade e vigor das sementes, como qualidade fisiológica inicial das sementes, condições climáticas no momento da maturação, umidade relativa do ar, temperatura de armazenamento das sementes, ação de microrganismos, tipo de material de embalagem e período de armazenamento (TOLEDO et al., 2009).

Sementes armazenadas em alto teor de umidade determinam altas taxas de respiração e ataque de fungos o que resulta no declínio da viabilidade e vigor das sementes (KAMBOJ et al., 2022). Em sementes metabolicamente ativas, a alteração na respiração mitocondrial leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e, conseqüente, a peroxidação lipídica, o principal fator que influencia a deterioração das sementes, além da oxidação de proteínas, danos no DNA e RNA e danos no sistema de reparo. O excesso de EROs ataca os ácidos graxos polissaturados da membrana o que afeta a permeabilidade da membrana e a homeostase iônica, além da produção de energia para a germinação das sementes (LI et al., 2022). A eliminação eficiente de EROS é dependente da expressão e operação efetiva de vários antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos (CHANDRA; KESHAVKANT, 2018).

Condições de altas temperaturas e umidade favorecem o desenvolvimento de fungos na fase de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, entre outros. Os fungos associados a sementes durante o armazenamento podem estar presentes em pequenos números antes da colheita, ou podem contaminar os grãos e sementes durante a colheita. Durante o

armazenamento pode ocorrer o aumento em números em condições que favorecem o crescimento desses fungos em detrimento do crescimento de outros grupos (MANNAA; KIM, 2017). Estes microrganismos aceleram o processo de deteriorização de sementes em decorrência de alterações bioquímicas, como degradação de carboidratos, proteínas e gorduras, aumento de ácidos graxos livres, assim levando a redução da taxa de germinação (BEGUM et al., 2013). Além disso, as micotoxinas produzidas por alguns fungos, como *Aspergillus* sp., no processo de infecção de alimentos são potencialmente tóxicas com alto risco de envenenamento para o ser humano e animais (BEGUM et al., 2013; MANNAA; KIM, 2017).

Com a diminuição da porcentagem de germinação, a velocidade de germinação também diminui o que causa perda de vigor das sementes, resultando em baixa qualidade das sementes. Sementes de baixa qualidade pode potencialmente diminuir a porcentagem de germinação e emergência de plântulas, impedindo o estabelecimento no campo e, portanto, levar à perda de rendimento (KAMBOJ et al., 2022).

O uso de fungicidas no tratamento de sementes é uma prática amplamente utilizada no manejo em todas as culturas (BEGUM et al., 2013). Um dos principais fungicidas comumente usados para o tratamento de sementes é o tiofanato metílico Cercobin[®] (Dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene)(3-thioallophanate). É um fungicida sistêmico pertencente à família dos benzimidazóis, que atua inibindo a formação de tubulina na mitose celular, com amplo espectro, embora com risco de resistência alto (LAMICHHANE et al., 2020). Os fungicidas formam uma zona de proteção sobre a superfície da semente, reduzem o apodrecimento das sementes e a ferrugem das mudas, resultando em mudas saudáveis e vigorosas (BEGUM et al., 2013).

O uso intensivo e inadequado desses agroquímicos tem despertado a preocupação de cientistas e público em muitos níveis por afetarem a saúde pública, pois permanecem no solo, recursos hídricos e culturas e podem ser transferidos para a cadeia alimentar e toxicidade para organismos não alvo. Por outro lado, o surgimento de resistência em patógenos para pesticidas levanta a questão da sua eficácia (LAMICHHANE et al., 2020; BASAID et al., 2021). Uma resposta a essas preocupações está no uso de compostos derivados de plantas como extratos e óleos essenciais. São promissores como agentes de biocontrole por serem

biodegradáveis, causam efeitos mínimos sobre organismos não alvos e retardam a ocorrência de resistência em pragas (BASAID et al., 2021).

4.3 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários vegetais são subprodutos naturais dos processos do metabolismo primário (Figura-1). Metabólitos secundários não têm papel direto no crescimento, metabolismo e desenvolvimento da planta, mas desempenham um papel significativo no mecanismo de defesa da planta, portanto rotulados como "compostos secundários" (KHARE et al., 2020). Esses compostos protegem as plantas contra agressões externas bióticas e abióticas, como infecções microbianas, herbivoria e radiação ultravioleta. Além de desempenhar um papel na atração de polinizadores, alelopatia e sinalização (BASAID et al., 2021).

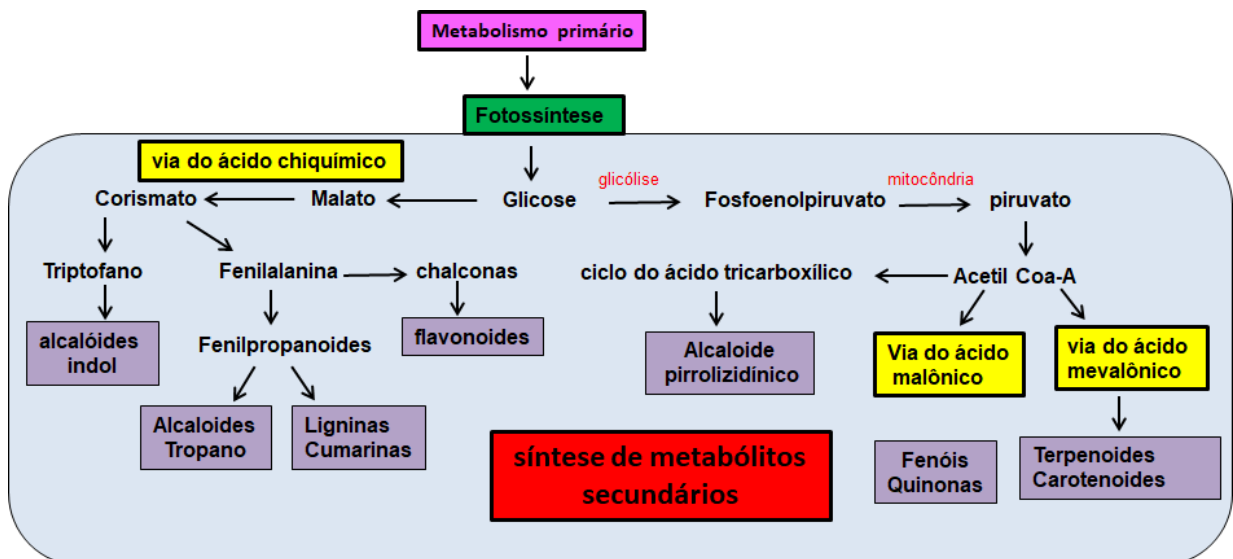


Figura 1: Biossíntese de metabólitos secundários e sua interconexão com metabólitos primários
Fonte: adaptado de Khare et al. (2020)

Os compostos secundários são diversos grupos de baixo peso molecular que são sintetizados em baixa concentração por policetídeos sintases multimodulares e peptídeos sintetases não ribossomais ou enzimas como preniltransferases e dimetilalil triptofano sintases (KHARE et al., 2020). Os metabólitos secundários são classificados em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos

e compostos nitrogenados, sintetizados por vias alternativas, conforme figura - 1(OLIVOTO et al., 2017).

Os terpenos, também conhecidos como isoprenóides, são a maior classe de metabólitos secundários. Essas substâncias são formadas pela fusão de cinco unidades de carbono que possuem um esqueleto ramificado. Estes podem ser divididos em monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos). Os terpenos são sintetizados a partir de metabólitos primários por pelo menos duas vias diferentes: a via do mevalonato (junção de três moléculas de Acetil-CoA) e a via não mevalonato, que produzem difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) (OLIVOTO et al., 2017). Vários terpenos provaram ser ativos contra uma ampla variedade de espécies fúngicas. Os terpenos causam disrupção em fungos, devido às suas propriedades lipofílicas. No entanto, esses compostos podem também induzir alterações estruturais em hifas e micélios, diminuindo assim a produção de toxinas (ACHEUK et al., 2022).

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que contêm um grupo funcional hidroxila em um anel aromático; tais substâncias são conhecidas como compostos fenólicos. Os fenóis são um grande grupo de compostos que podem ser divididos em cinco subgrupos: cumarinas, ligninas, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos. São um grupo importante de fitoquímicos que apresentam forte atividade antioxidante e antifúngica (OLIVOTO et al., 2017). As propriedades antifúngicas dos fenólicos são atribuídas à sua lipofilicidade e/ou à ocorrência de grupos hidroxila em suas estruturas. Devido às suas propriedades de ligação a aderências a proteínas, eles são qualificados para romper membranas, inativar enzimas e íons metálicos complexos, exibindo assim efeitos sobre fungos (ACHEUK et al., 2022).

Os compostos de nitrogênio são uma grande variedade de metabólitos secundários que possuem nitrogênio em suas estruturas. Os principais compostos nitrogenados encontrados nas plantas são alcalóides, glicosídeos e aminoácidos não protéicos: estes são geralmente sintetizados a partir dos aminoácidos comuns (OLIVOTO et al., 2017). A atividade antifúngica dos alcalóides se deve ao fato de que esses se intercalam na parede celular e/ou no DNA do fungo (ACHEUK et al., 2022).

As plantas são geralmente expostas a vários estresses bióticos e abióticos, como seca, salinidade, metais pesados, radiação ultravioleta, patogênese e

herbicidas. Vários estresses alteram a morfologia e aumenta o nível de pigmentos fenólicos, atividade antioxidante, vazamento de eletrólitos, favonóides, prolina, acúmulo de tocoferol que dificulta o crescimento da planta. Em resposta aos vários estresses bióticos e abióticos, o nível de ROS aumenta no sistema celular e induz o estresse oxidativo que, conseqüentemente, leva à peroxidação lipídica, inativação de enzimas e danos ao DNA. Em resposta aos estresses, ocorre síntese de ampla gama de produtos secundários que servem como ferramentas de resistência (KHARE et al., 2020).

4.4 *Ocimum gratissimum*

Ocimum gratissimum L. é conhecida como alfavaca-cravo, é uma erva aromática pertencente à família Lamiaceae. É encontrada na América do Sul, África e Ásia (MOHR et al., 2017). *O. gratissimum* tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional como larvicida, analgésica e antiséptica (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, é usada para fins médicos e condimentos culinários (LORENZI; MATOS, 2008). Febre, gripe e problemas renais são tratados com as folhas dessa planta em infusões (PENIDO et al., 2016). O óleo essencial da folha é usado como ingrediente ativo em cremes dentais e enxaguatórios bucais (UYOH et al., 2013).

O óleo e os extratos têm várias propriedades farmacológicas, incluindo anticancerígena (NASSAZI et al., 2020), inseticida (BENELLI et al., 2019), antibacteriana (HAMMA et al., 2020), antioxidante (ONYEBUCHI; KAVAZ, 2020), antifúngica (MOHR et al., 2017) e alelopática (MIRANDA et al., 2015).

O. gratissimum contém componentes fitoquímicos, como esteróides, saponinas, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cardíacos e taninos que possuem efeitos antimicrobianos (HAMMA et al., 2020; NASSAZI et al., 2020). O extrato das folhas de *O. gratissimum* possuem compostos fenólicos, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumarílico, ácido gentísico, ácido gálico, ácido protocatecúico e ácido clorogênico ácido, rutina e kaempferol e a quercetina sendo o composto majoritário (ELISÉE et al., 2020). Onyebuchi e Kavaz (2020) verificaram maiores quantidades de compostos bioativos, incluindo sabineno, terpeneno, timol, copaeno, cariofileno, humuleno, selineno, óxidos de carifileno e fitol nas mostras obtidas a partir dos extratos etanólicos e metanólicos do que o extrato aquoso folhas de *O.*

gratissimum. Os óleos essenciais incluem eugenol, linalol e ácido n- hexadecanóico (FARIA et al., 2006; MOHR et al. 2017; UCHEGBU et al., 2018).

Na literatura tem sido descrito a eficácia *in vitro* do óleo e extratos de alfavaca-cravo na proteção de produtos contra patógenos durante o armazenamento (NGUEMTCHOUIN et al., 2013; OGENDO et al., 2008). Em estudo realizado por Bankole e Somorin (2010) demonstraram 53,4% de inibição do crescimento micelial de fungos de armazenamento, isolados de grãos de arroz, após a exposição ao extrato aquoso de *O. gratissimum*.

Outro estudo mostrou que compostos fenólicos das folhas desta planta possuíam atividade antifúngica contra alguns contaminantes de pós-colheita, espécies de *Fusarium*, fungos que sintetizam toxina (ELISÉE., et al., 2020). Pesquisas realizadas *in vitro* com o óleo essencial de folhas de *O. gratissimum* por Faria et al. (2006) associou o eugenol, componente principal, à atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos, *Botryosphaeria rhodina*, *Rhizoctonia* sp. e, Dambolena et al. (2010) contra *Fusarium verticillioides* e inibição da micotoxina.

O extrato etanólico de *O. gratissimum* foi descrito como ativo contra diferentes espécies de fungos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Galactomyces candidum*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Trichoderma viride* (ONAEBI et al., 2020), enquanto o óleo essencial contra os fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Rhizoctonia solani* (MOHR et al., 2017). Uchehgbu et al. (2018), avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo das folhas de *O. gratissimum* e obtiveram valores da CIM (concentração inibitória mínima) iguais a 34 µg/ml para *Aspergillus niger*, 38 µg/ml para *Fusarium oxysporum* e 70 µg/ml para *Colletotrichum* spp. Nwofor et al. (2021) encontraram CIM do extrato metanólico de *O. gratissimum* entre 25 - 200 mg/ml para *Fusarium linchenicola*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus welwitschiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus aculeatus*, *Penicillium citrinum* e *Absidia* spp.

As folhas de *O. gratissimum* têm capacidade antioxidante por meio dos ensaios de eliminação dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico) (ABTS) e capacidade de redução de metal (FRAP). Venuprasad et al. (2014), em análise do extrato etanólico encontraram IC₅₀ de 470 ± 28.6 e 133 ± 7.2 µg/mL para DPPH e ABTS, respectivamente. Nassazi et al.

(2020), ao avaliar a capacidade antioxidante do extrato metanólico pelo método DPPH encontraram IC_{50} igual a $5,79 \pm 0,13$ mg/ml, foi o menor como em comparação com ácido ascórbico ($0,06 \pm 0,01$ mg/ml).

A atividade antioxidante foi relatada por Ouyang et al. (2013) após fracionamento do extrato etanólico de folhas de *O. gratissimum* usando diferentes solventes (etanol, éter de petróleo, *n*-butanol e água). Nesta investigação a fração acetato de etila obtida apresentou resultados mais promissores entre os diferentes solventes para os métodos ABTS, DPPH e FRAP. A capacidade antioxidante dos extratos de *O. gratissimum* é atribuída aos compostos fenólicos (ELISÉE et al., 2020). Onyebuchi e Kavaz (2020) descreveram em estudo com folhas da mesma espécie vegetal que capacidade antioxidante está associada a fatores como o tipo de solvente e temperatura de extração.

O potencial bioherbicida dessa espécie vegetal vem sendo investigado. Neto et al. (2018), demonstram a redução significativa da germinação e do desenvolvimento do capim braquiária (*Urochloa brizantha*), planta daninha, após o tratamento com o óleo essencial de alfavaca-cravo. Miranda et al. (2015), verificaram decréscimos na germinação, no índice de velocidade de germinação e nos comprimentos das plântulas (parte aérea e raiz) de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas ao óleo essencial de *O. gratissimum* e ao seu componente principal (eugenol), que exibiu efeito mais acentuado corroborando com a atual pesquisa. A investigação alelopática do extrato metanólico parcialmente purificado de *O. gratissimum* mostrou que os flavonoides são fitotóxicos na germinação e crescimento das plântulas das sementes de feijão e milho (IGHODARO et al., 2010). Outra pesquisa verificou inibição da germinação e do índice de velocidade de germinação da planta daninha *Euphorbia heterophylla* com o aumento da concentração do extrato *O. gratissimum* pela modificação na permeabilidade da membrana celular causado pelo eugenol (MARTENDAL et al., 2018).

4.5 *Schinus terebinthifolia*

Schinus terebinthifolia Raddi (Sin.: *Schinus terebinthifolius* Raddi) (*Anacardiaceae*) é conhecida como aroeira ou pimenta rosa. É uma espécie

amplamente distribuída ao longo da costa brasileira. Seus frutos são utilizados como condimento e possuem alta demanda no mercado internacional. No Brasil, grande parte da produção do fruto tem origem na exploração extrativista, principalmente no Espírito Santo e Rio de Janeiro (ARAUJO GOMES et al., 2020).

S. terebinthifolia também é amplamente utilizada na medicina popular devido às suas diversas atividades biológicas, anticancerígena, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, anticanceriana, inseticida (ARAUJO GOMES et al., 2020; BELHOSSAINE, et al., 2022; MOHAMED et al., 2020; OLIVEIRA, et al., 2018; ULIANA et al., 2016). Estudos fitoquímicos descreveram a presença de ácido gálico, flavonoides, galotaninos, terpenos, taninos, antocianinas e heterosídeos (ARAUJO BITENCOURT et al., 2021; ARAUJO GOMES et al., 2020). O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolia* possuem alto teor de hidrocarbonetos sesquiterpenos (BELHOSSAINE, et al., 2022).

Em extrato obtido a partir de resíduos composto principalmente por folhas, frutos inutilizáveis e cascas de frutas de *S. terebinthifolia* foram encontradas nas frações apolares triterpenos como componentes principais e os extratos foram caracterizados por altos teores de compostos fenólicos, especialmente galotaninos, ácido gálico e flavonoides (ARAUJO GOMES et al., 2020). No óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolia* coletadas no município de Vitória (Espírito Santo, Brasil) foram identificados -3-careno (68,78%), E-cariofileno (8,22%), mirceno (6,78%) e pineno (4,05%) como compostos principais. Análises de espectrometria de massa revelaram que os ácidos ferúlico e caféico, e quercetina foram os componentes majoritários (ULIANA et al., 2016). Os principais compostos identificados no óleo de ramos de *S. terebinthifolia* coletadas no Egito foram o terpinen-4-ol (18,25%), cis- β -terpineol (15,60%), γ -terpineno (12,46%), sabineno (9,83%), α -terpineno (8,56%) e 4-tujanol (6,71%) (MOHAMED et al., 2020).

O óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolia* mostrou atividade inibitória eficaz contra os patógenos fúngicos, *Bipolaris oryzae* e *Rhizoctonia solani* (MOHAMED et al., 2020). Em investigação *in vitro* com o extrato etanólico e diclorometânico das folhas foi observada atividade antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, com CIM entre 800 e 900 $\mu\text{g/mL}$ (EL-MASSRY et al., 2009). Em estudo por Oliveira et al. (2018), o extrato mais ativo contra o fungo *Malassezia furfur* foi o obtido com o diclorometano, seguido do óleo

essencial e extrato hexânico dos frutos (IC_{50} = 250, 500 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em pesquisa realizada com óleo essencial e extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolia* houve efeito antifúngico contra *Candida albicans* com CIM igual a 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ULIANA et al., 2016). A lectina isolada das folhas de *S. terebinthifolia* apresentou atividade antifúngica contra o fungo patogênico *Candida albicans* (GOMES et al., 2013) e Johann et al. (2010) relacionaram a atividade antifúngica de *S. terebinthifolia* ao schinol contra *C. albicans*.

Os óleos têm mostrado atividade antioxidante relativamente baixa, expressa em IC_{50} ; especialmente, o óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolia* que revelaram uma concentração de $3,292 \pm 2,82$ mg/mL pelo teste DPPH (BELHOSSAINE, et al., 2022). O extrato hidroetanólico de folhas de *S. terebinthifolia* apresentou atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos, DPPH e ABTS (IC_{50} = $4,87 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ e $5226,48 \pm 25,86$ μM Trolox/g de extrato, respectivamente), redução do fosfomolibdeno [% da atividade antioxidante relativa (%RAA) com ácido ascórbico: $39,64 \pm 0,32$; %RAA com rutina: $151,98 \pm 1,12$] e íons metálicos (Fe^{+3} a Fe^{+2} , $7457,34 \pm 171,95$ μM ferroso sulfato/g de extrato) (IWANAGA et al., 2018). Em estudo que avaliou o extrato etanólico obtido por maceração e ultrassom verificou capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH com IC_{50} = 15.43 $\mu\text{g/mL}$ e IC_{50} = 92.00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto para o óleo essencial os valores não foram encontrados (ULIANA et al., 2016).El-Massry et al. (2009) revelaram que a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolia* foi maior do que extratos de metanol e diclorometano pelo ensaio DPPH.

5. REFERÊNCIAS

ACHEUK, F. et al. Status and prospects of botanical biopesticides in Europe and Mediterranean countries. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 311, 2022.

AFFOGNON, H. et al. Unpacking postharvest losses in sub-Saharan Africa: a meta-analysis. **World development**, v. 66, p. 49-68, 2015.

ANTONELLO, L.M. et al. Influência do tipo de embalagem na qualidade fisiológica de sementes de milho crioulo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.75-86, 2009.

ARAÚJO, S. L et al. Guardiões e guardiãs da agrobiodiversidade nas regiões do Cariri, Curimataú e Seridó Paraibano. **Cadernos Agroecológicos**, v. 8, n.2, p. 1-5. 2013.

BANKOLE, S.A.; SOMORIN, Y.M. Antifungal activity of extracts of *Ocimum gratissimum* and *Aframomum danielli* against moulds isolated from stored rice. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 425, p. 578, 2010.

BARBOSA, V. L.; VIDOTTO, R. C; ARRUDA, T. P. Erosão Genética e Segurança Alimentar. In: **Anais do SICI –Simpósio Internacional De Ciências Integradas**, Campus Guarujá, Artigo, p.03. 2015.

BASAID, K. et al. Biological activities of essential oils and lipopeptides applied to control plant pests and diseases: A review. **International Journal of Pest Management**, v. 67, n. 2, p. 155-177, 2021.

BANKOLE, S.A., SOMORIN, Y.M. Antifungal activity of extracts of *Ocimum gratissimum* and *Aframomum danielli* against moulds isolated from stored rice. **Julius-Kühn-Archiv** v. 425, p.578, 2010.

BEGUM, M.A.J. et al. Storage fungi in groundnut and the associate seed quality deterioration-a review. **Plant Pathology Journal (Faisalabad)**, v. 12, n. 3, p. 127-134, 2013.

BELHOSSAINE, O. et al. Chemical composition, antioxidant, insecticidal activity, and comparative analysis of essential oils of leaves and fruits of *schinus molle* and *schinus terebinthifolius*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 377-385, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 17 de 18 jun. 2014. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-17-de-18-de-junho-de-2014.pdf/view>>. Acesso em: 13 mai. 2018.

BRASIL. Lei N°. 10711, de 05 de agosto de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

CHANDRA, J; KESHAVKANT, S. Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 75-87, 2018.

CORSINI, I. et al. Tratamento natural visando a conservação de sementes crioulas para produção agroecológica. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 6 E SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO IFSULDEMINAS, 3, 2014. Pouso Alegre, MG. **Anais eletrônicos.**, Pouso Alegre: Sistema Eletrônico de Administração de Conferências, 2014. Disponível em: <<https://jornada.ifsuldeminas.edu.br/index.php/jcpoa/jcpoa/paper/view/826>>. Acesso em: 15 julho 2022.

DA SILVA, A.O et al. Armazenamento de grãos na agricultura familiar: principais problemáticas e formas de armazenamento na região nordeste paraense. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e36610111835-e36610111835, 2021.

DAMBOLENA, J.S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.

DELOUCHE, J. C. et al. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Technology Papers**, v. 205, p. 671- 700, 2021.

DE ARAUJO BITENCOURT, G. et al. Fitoquímica e Alelopatia da Aroeira-Vermelha (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na Germinação de Sementes. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 02-08, 2021.

DE ARAUJO GOMES, R. B. et al. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia Raddi*) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity

of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111430, 2020.

ELISÉE, K. K. et al. Total Phenolic Compounds Extraction in Leaves of *Ocimum gratissimum* L. and Their Potential Activity against Some Agricultural Contaminants. **Asian Research Journal of Agriculture**, p. 1-10, 2020.

EL-MASSRY, KF. et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5265-5270, 2009.

FARIA, T. J. al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L.(eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

GAROFOLO, A. C.; RISSO, I.A.M.; BARBOSA, D. Conservação on farm de variedades crioulas em bancos familiares localizados em assentamentos rurais em território da cidadania no estado do Rio de Janeiro. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

GOMES,F.S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology** , v.114, 672-679, 2013.

HAMMA, I. I. et al. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of the Crude Extract of Scent Leaf (*Ocimum gratissimum*) on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Asian Plant Research Journal**, p. 1-7, 2020.

IGHODARO, O.; AGUNBIADE, S.; AKINTOBI, O. Phytotoxic and anti-microbial activities of flavonoids in *Ocimum gratissimum*. **Life Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 45-48, 2010.

IWANAGA, C. C et al. In vitro antioxidant potential and in vivo effects of *Schinus terebinthifolia* Raddi leaf extract in diabetic rats and determination of chemical composition by HPLC-ESI-MS/MS. **Natural product research**, v. 33, n. 11, p. 1655-1658, 2018.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2010.

KAMBOJ, S.; KAUR, M.; SIDHU, G. B. K. Seed quality as affected under different temperature regimes using different packings in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.)

Millsp.) during storage. **The Pharma Innovation Journal**, v.11, n7, p. 2802-280 2022.

KHARE, S. et al. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 203-216, 2020.

KUREK, K.; PLITTA-MICHALAK, B.; RATAJCZAK, E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. **Plants**, v. 8, n. 6, p. 174, 2019.

LAMICHHANE, J. R. et al. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, p. 610-623, 2020.

LEITE, K. et al. Óleos essenciais no tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. durante o armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 2, p. 186-199, 2018.

LI, W. et al. Advances in the Understanding of Reactive Oxygen Species-Dependent Regulation on Seed Dormancy, Germination, and Deterioration in Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 291, 2022.

LIMA, V.C.S. et al. Produção orgânica de sementes: desafios e perspectivas. **Cadernos de Agroecologia**, v.9, n.4, p.1-5, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**; Plantarum: Nova Odessa. 2002.

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

MANN, A. et al. Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) grown in Nigeria. **International Journal of plant research**, v. 2, n. 1, p. 51-58, 2012.

MANNA, M.; KIM, K. D. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 240-254, 2017.

MARTENDAL, C.O. et al. Effects of *Ocimum gratissimum* L. extract on the germination, respiration and growth of *Euphorbia heterophylla* L. **Allelopathy Journal**, v. 45, n. 1, p. 29-44, 2018.

MIRANDA, C.A.S.F. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 1783-1797, 2015.

MOHAMED, A.A. et al. Phytochemical compounds of branches from *P. halepensis* oily liquid extract and *S. terebinthifolius* essential oil and their potential antifungal activity. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 330, 2020.

MOHR, F. B. M. et al. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genet. Mol. Res**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

NASSAZI, W. et al. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of African Basil (*Ocimum gratissimum*) leaves. **Asian J Appl Chem Res**, v. 6, n. 4, p. 1-18, 2020.

NETO, A.T. et al. Alelopatia do óleo essencial de alfavaca em sementes de capim-braquiária. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 3, p. 332-338, 2018.

NGUEMTCOUIN, M.G.M. et al. *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 57-62, 2013.

NIEDER, R. et al. **Soil components and human health**. Berlin, Germany: Springer, p. 223-255, 2018.

NWOFOR, C.N. et al. Phytochemical analysis and in vitro screening of antifungal activity of *Jatropha multifida*, *Euphorbia hirta*, *Occimum gratissimum* and *Mitracarpus scaber* leaves extract. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 098-112, 2021.

OGENDO, J.O. et al. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 328–334, 2008.

OLIVEIRA, M. S. D. et al. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. **Revista Fitos**. v.12, n. 2, p. 135-146, 2018.

OLIVOTO, T. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 71-84, 2017.

ONAEBI, C. et al. Antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* L. and *Carica papaya* L. against postharvest pathogens of avocado pear (*Persea americana* Mill.). **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 319-325, 2020.

ONYEBUCHI, C.; KAVAZ, D. Effect of extraction temperature and solvent type on the bioactive potential of *Ocimum gratissimum* L. extracts. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

OUYANG, X. et al. Antioxidant properties and chemical constituents of ethanolic extract and its fractions of *Ocimum gratissimum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 3, p. 1124-1130, 2013.

PENIDO, A. B. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 345-354, 2016.

STEFANELLO, R. et al. Physiological and sanitary qualities of maize landrace seeds stored under two conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 339-347, 2015.

TOLEDO, M.Z. et al. Physiological quality and storage of bean seeds as affected by late side dressing nitrogen. **Pesquisa agropecuaria tropical**, v.39, p.124- 133, 2009.

UCHEGBU, R. I.; AKALAZU, J. N.; SOKWAIBE, C. E. An Evaluation of the Chemical Compositions and Antifungal Activity of *Ocimum gratissimum* (Nchuanwu) Leaves against Some Plant Pathogens. **Asian Journal of Applied Chemistry Research**, p.1-7, 2018.

ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

UYOH, E. A. et al. Evaluation of antioxidant capacity of two *Ocimum* species consumed locally as spices in Nigeria as a justification for increased domestication. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p. 221-229 2013.

VENUPRASAD, M. P. et al. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. **South African Journal of Botany** v.92, p. 151-158, 2014.

CAPITULO 1 – Potencial fungicida e antioxidante de *Schinus terebinthifolia* no controle de fungos associados a sementes armazenadas

Autores: Juliana Trindade Lima¹ • Hildegarde Seibert Françar² • Antonio Fernando de Souza³

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

(2) Instituto Federal do Espírito Santo – *campus* Vila Velha, CEP 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil.

(3) Instituto Federal do Espírito Santo - *campus* Santa Teresa, CEP 29660-000, Santa Teresa, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: julianatrindade111@gmail.com

Periódico a ser submetido: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA), fevereiro, 2023.

RESUMO

Schinus terebinthifolia é uma planta pertencente à família *Anacardiaceae*. Seus frutos são utilizados como condimento alimentar bem como no tratamento de enfermidades. Este estudo objetivou investigar a composição química, a atividade antioxidante e antifúngica *in vitro* do extrato etanólico e de suas respectivas frações de polaridades crescentes de folhas de *S. terebinthifolia*. A planta foi coletada na Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Viana, ES. O efeito antifúngico foi determinado *in vitro* pelo método de difusão em ágar, sobre os fungos associados a sementes crioulas durante o armazenamento, *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. Determinou-se o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante pelos ensaios ABTS e DPPH. Foram identificados 16 compostos, sendo os marjoritários, linolato de etila, limoneno, sitosterol e palmitato de etila. O extrato etanólico e a fração diclorometano apresentaram o maior percentual de inibição do crescimento fúngico de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. com valores da CIM entre 2.5 e 0.625 mg/mL. A fração butanol exibiu a maior capacidade antioxidante e a fração acetato de etila o maior teor de compostos fenólicos (630.6±4.1 mg EAT/g). *S. terebinthifolia* pode ser um recurso útil para o desenvolvimento de formulação de um biofungicida contra pragas em sistemas agroecológicos.

Palavras-chave: Antioxidantes • diclorometano • pesticidas • fitopatógenos • fitoquímica

ABSTRACT

Schinus terebinthifolia is a plant belonging to the *Anacardiaceae* family. Its fruits are used as a food condiment as well as in the treatment of diseases. This study aimed to investigate the chemical composition and *in vitro* antioxidant and antifungal activity of the ethanolic extract and its respective fractions of increasing polarity of *S. terebinthifolia* leaves. The plant was collected at the Reginaldo Conde Agricultural Engineer Experimental Farm (FERC) at the Capixaba Institute for Research, Technical Assistance and Rural Extension (INCAPER), Viana, ES. The antifungal effect was determined *in vitro* by the agar diffusion method, on fungi associated with native seeds during storage, *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. Total phenol content and antioxidant capacity were determined by ABTS and DPPH assays. Sixteen compounds were identified, including marjoritates, ethyl linolate, limonene, sitosterol and ethyl palmitate. The ethanolic extract and the dichloromethane fraction showed the highest percentage of inhibition of the fungal growth of *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. with MIC values between 2.5 and 0.625 mg/mL. The butanol fraction exhibited the highest antioxidant capacity and the ethyl acetate fraction the highest content of phenolic compounds (630.6±4.1 mg EAT/g). *S. terebinthifolia* can be a useful resource for the development of a biofungicide formulation against pests in agroecological systems.

Keywords: Antioxidants • dichloromethane • pesticides • phytopathogens • phytochemistry

1. INTRODUÇÃO

Os agroecossistemas sofrem com pragas fungícas que aceleram o processo de deterioração de sementes e grãos armazenados, afetando negativamente a produção agrícola (Kumar et al., 2020, Saeed et al., 2020). O meio mais eficaz para o manejo de pragas é o uso de fungicidas sintéticos, que estão prontamente disponíveis para os agricultores. Os efeitos nocivos desses agroquímicos no meio ambiente e na saúde humana (Nieder et al., 2018), bem como fitopatógenos resistentes a pesticidas (Aktar et al., 2009), estão promovendo a necessidade de controle seguro e sustentável de pragas.

Os pesticidas botânicos apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e com mecanismos de ação diferentes, podem ser uma alternativa viável aos agroquímicos na agricultura sustentável (Nieder et al., 2018). Seus variados modos de ação são atribuídos à composição fitoquímica em diferentes plantas (Belhoussaine et al., 2022, Gupta, et al., 2021, Uliana et al., 2016). Com isso, extratos e óleos essenciais de plantas foram testados em busca de potenciais produtos de controle de patógenos (Dias et al., 2019, Yu et al., 2022).

Schinus terebinthifolia Raddi (Sin.: *Schinus terebinthifolius* Raddi) é conhecida como pimenta rosa ou aroeira. Seus frutos são usados como condimento alimentar (Araujo Gomes et al., 2020). Esta planta é amplamente usada na medicina popular dada a sua ação antioxidante, antifúngica, antibacteriana e anticanceriana (Araujo Gomes et al., 2020, Mohamed et al., 2020, Uliana et al., 2016). Em investigações anteriores, a atividade antioxidante constatada foi relacionada aos fenóis de *S. terebinthifolia* (El-Massry et al., 2009, Uliana et al., 2016). O óleo essencial das folhas mostrou atividade inibitória eficaz contra os patógenos fungícos, *Bipolaris oryzae* e *Rhizoctonia solani* (Mohamed et al., 2020).

Estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolia* identificaram a presença de terpinenol, galotaninos, ácido gálico e flavonoides, ácidos ferúlico e cafeico, quercetina (Araujo Gomes et al., 2020, Mohamed et al., 2020, Uliana et al., 2016). Fatores tais como, radiação, temperatura, disponibilidade de nutrientes, umidade, luz, salinidade, temperatura e patógenos podem interferir na síntese dos metabolitos secundários (Khare et al., 2020) e, assim, afetar as propriedades biológicas da espécie vegetal. Embora estudos descrevam a atividade antifúngica de *S. terebinthifolia*, a grande maioria se limita ao estudo de óleos essenciais

(Belhoussaine et al., 2022, Mohamed et al., 2020, Uliana et al. 2016), e pouco se sabe sobre as potencialidades dos extratos obtidos a partir de solventes de diferentes polaridades.

Considerando a importância de todos compostos da planta, polares e apolares, e possíveis sinergias entre eles, foi realizado o rastreamento fitoquímico do extrato etanólico e frações de polaridades crescentes de folhas de *S. terebinthifolia* e avaliado o potencial antioxidante e o antifúngico *in vitro* sobre fungos associados a sementes crioulas durante o armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e identificação botânica da espécie vegetal

Folhas de *S. terebinthifolia* foram coletadas na Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Viana, ES. As folhas foram coletadas no período da tarde e levadas para o Laboratório de Química do Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) *campus* Vila Velha, onde permaneceram armazenadas em ultra freezer. A espécie foi identificada por pesquisadores da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a exsicata foi depositada com o código VIES 36158 (*Schinus terebinthifolia* Raddi) no Herbário Vies do Departamento de Ciências Biológicas da Ufes.

2.2. Preparação do extrato etanólico e frações

Os extratos vegetais foram preparados no Laboratório Ifes *campus* Vila Velha. As folhas coletadas foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24h e em seguida trituradas. Para a obtenção do extrato etanólico (EEtOH), as folhas foram maceradas em etanol 96%, na proporção de 1:10 (droga vegetal:etanol), à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-3 CH 9230 Flawil 1, Switzerland). O solvente recuperado foi adicionado ao resíduo das folhas e

remacerado até o esgotamento total da droga vegetal. O resíduo concentrado (EEtOH) obtido foi armazenado em vidro âmbar sob refrigeração a 4°C.

Para a obtenção das frações de diferentes polaridades, parte do EEtOH foi ressuspenso em mistura de etanol-água (8:2) e submetido às sucessivas partições líquido-líquido, com solventes orgânicos de polaridades crescentes, que após retirada total dos solventes, foram obtidas as frações: hexano (FHex), diclorometano (FDCM), acetato de etila (FACOH), *n*-butanol (FBuOH) e o residual após as partições foi denominado de fração aquosa (FAq).

2.3. Preparação das amostras

Para a avaliação da atividade antifúngica foram preparadas soluções estoques a partir do extrato etanólico e frações na concentração de 15 mg/mL em dimetilsufóxido (DMSO). Para os testes antifúngicos *in vitro*, as amostras foram diluídas para as concentrações de 0,1; 5,0 e 10,0 mg/mL. Como controle negativo foi usada uma solução de DMSO a 0.5% e o controle positivo foi o fungicida comercial Cercobin[®], a base de tiofanato metílico (Dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene) (3-thioallophanate) a 0,8 g/L, conforme recomendação da bula do produto. Estas soluções foram esterilizadas por filtração através de membrana Milipore[®] de 0,45 µm. Para os testes de antioxidantes e quantificação dos fenóis totais foram preparadas soluções em diferentes concentrações de 1000,0; 500,0; 250,0; 125,0 e 62,5 µg/mL.

2.4. Atividade Antifúngica *in vitro*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Ifes *campus* Vila Velha. Para a avaliação *in vitro* da atividade antifúngica foi utilizado o método de difusão em ágar. O extrato etanólico e frações foram testados sobre *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp., isolados a partir de sementes tradicionais de feijão e milho do banco de sementes do Ifes *campus* Santa Teresa. Os patógenos fúngicos foram identificados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças de Plantas do Ifes *campus* Santa Teresa.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 6x3 +2, com três repetições. O fator A foi composto por seis diferentes extratos (EEtOH; FHex; FDCM; FAcOH; FBuOH; e FAq) e o fator B por três concentrações (0,1; 5,0 e 10,0 mg/mL), mais dois tratamentos adicionais, um controle negativo e outro positivo. Como controle negativo foi usada uma solução de DMSO a 0,5% e o controle positivo foi o fungicida comercial a base de tiofanato metílico Cercobin[®] (Dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene) (3-thioallophanate) a 0,8 g/L, conforme recomendação da bula do produto.

Para a avaliação da atividade antifúngica, as soluções estoques esterilizadas (15mg/mL) foram diluídas em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) esterilizado, em estado fundente para obtenção das concentrações finais de 0,1; 5,0 e 10,0 mg/mL para cada um dos respectivos extratos. Em seguida, as soluções finais foram vertidas em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro dentro da capela de fluxo laminar. Após a solidificação do meio, um disco de 0,5 cm de diâmetro da cultura dos respectivos isolados com 120h de incubação, foi repicado para o centro de cada placa de Petri. As placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12h, até que o crescimento micelial dos respectivos fungos, no tratamento controle negativo, atingisse a borda da placa.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada por meio da medição diária do diâmetro (em cm) das colônias. Os dados obtidos foram utilizados na determinação do percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) que foi estimado por meio da equação (Kordali et al., 2003):
$$PIC (\%) = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

Onde, D_c = Diâmetro médio micelial do controle negativo (cm); D_t = Diâmetro médio micelial dos tratamentos (cm).

2.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Entre todos os tratamentos, o extrato etanólico e a fração diclorometano foram considerados os mais promissores devido a maior eficácia na atividade antifúngica *in vitro*. Logo, esses tratamentos foram selecionados para a determinação da concentração inibitória mínima. A CIM foi estipulada pela menor

concentração dos tratamentos que preveniu o crescimento micelial das colônias, visível a olho nu (Talibi et al., 2012). O teste consistiu em diluições seriadas decrescentes a partir de soluções estoques de 15 mg/mL. Estas soluções foram solubilizadas em meio de cultura BDA até a obtenção de concentrações finais de 5,00; 2,50; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg/mL, em seguida, realizado o método de difusão em ágar como mencionado anteriormente. A menor concentração que inibiu o crescimento visível do organismo testado após avaliação macroscópica foi determinada como CIM. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

2.6. Capacidade antioxidante *in vitro*: teste DPPH

A capacidade antioxidante do extrato etanólico e frações de *S. terebinthifolia* pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi determinada conforme Casagrande et al. (2007), com modificações. Nesse ensaio, avalia-se a capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH, formando o radical difenil-picril-hidrazina. O ensaio consistiu na mistura de 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 250 µM, mais 30 µL de soluções contendo concentrações decrescentes dos extratos em etanol (1000,0; 500,0; 250,0; 125,0 e 62,5 µ/mL), 1000 µL de tampão acetato 0.1M e 1000 µL de etanol absoluto. A solução denominada “branco” foi preparada com mistura de etanol-DPPH. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida contra um branco a 517 nm em espectrofotômetro UV-Visível (UV/VIS - Biospectro SP-220). A atividade de captura do radical DPPH foi expressa por meio da porcentagem de inibição (IC%_(DPPH)): IC%_(DPPH) = 100 –

$$\frac{A_{\text{AMOSTRA}}}{A_{\text{CONTROLE}}} \times 100$$

Onde, A_{AMOSTRA} é a absorbância da reação dos tratamentos, e A_{CONTROLE} é a absorbância do controle (contendo todos reagentes, exceto a amostra dos tratamentos). A atividade antioxidante foi avaliada com base no valor de IC₅₀ (µg/mL), concentração de extrato necessário para capturar 50% do radical livre DPPH por regressão linear utilizando-se os valores de concentração (µg/mL) *versus* porcentagem de inibição (IC%).

2.7. Capacidade antioxidante *in vitro*: teste ABTS

A capacidade antioxidante do extrato etanólico e frações de *S. terebinthifolia* frente ao radical livre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi realizada de acordo com Sánchez–González et al. (2005). O cátion ABTS^{•+} foi produzido reagindo 7 mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. Diluiu-se a solução de ABTS em tampão fosfato (pH 7.4) para obter uma absorvância entre 0,7 a 730 nm. As amostras foram diluídas em etanol, gerando soluções com concentrações variando de 62,5 a 1000,0 µg/mL. Após a adição de 10µL de amostra diluída, as leituras de absorvância a 730 nm em espectrofotômetro foram realizadas após 6 minutos de reação. O poder antioxidante foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical ABTS (IC%_(ABTS)), de acordo com a equação:

$$IC\%_{(ABTS)} = 100 - \frac{A_{AMOSTRA}}{A_{CONTROLE}} \times 100$$

Onde, $A_{AMOSTRA}$ é a absorvância da reação dos tratamentos, e $A_{CONTROLE}$ é a absorvância do controle (contendo todos reagentes, exceto a amostra dos tratamentos). A atividade antioxidante foi avaliada com base no valor de IC₅₀ (µg/mL), concentração de extrato necessário para capturar 50% do radical livre ABTS por regressão linear utilizando-se os valores de concentração (µg/mL) *versus* porcentagem de inibição (IC%).

2.8. Determinação do conteúdo fenólico total (CFT)

Para a determinação de fenóis totais, utilizou-se o método com o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme Makkar (2003), com modificações. Como padrão foi utilizado o reagente ácido tânico (Sigma Aldrich). A curva de calibração foi construída utilizando-se concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0 e 50,0 µg/mL de ácido tânico ($R^2 = 0,99$). Em seguida, em tubos de ensaio adicionaram-se 0,2 mL do extrato, 0,8 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) e 2,5 mL de solução de carbonato de sódio (Sigma Aldrich) a 5%. O branco continha todos os reagentes, exceto as amostras. As amostras foram homogeneizadas, guardadas no escuro e, após 40 min, a absorvância foi

medida a 725 nm em espectrofotômetro. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os teores de fenóis totais foram expressos como mg equivalente de ácido tânico por g de extrato (mg EAT/g).

2.9. Análise fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato e frações das folhas de aroeira foram submetidos à análise por cromatografia de camada delgada (CCD) no intuito de prospectar os principais grupos do metabolismo secundário quanto à presença de alcaloides, derivados de antraceno, cumarinas, lignanas, mono e diterpenos, flavonoides, naftoquinonas, triterpenos e esteroides, conforme tabela 1. Para isso utilizou-se cromatoplaças de gel de sílica 60 ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV254, 10 x 10 cm, com bandas de aplicação de 0,5 cm para as amostras e eluição da fase móvel de 8,0cm. Com auxílio de uma micropipeta Hamilton 705SN de 50µL, foram aplicados 10µL das amostras. Os sistemas de eluentes e os reveladores para cada grupo químico foi caracterizado de acordo com a tabela 1 (Wagner e Bladt, 1996).

Tabela 1: Sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos grupos químicos pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD)

Grupos químicos	Sistemas de eluição	Reveladores
Alcaloide	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (7:2:1)	Reagente Dragendorff
Derivados antrocênicos	Acetato de etila:metanol:água (10:1,35:1)	Reagente KOH etanólico 10%
Antroquinonas	Éter etílico:acetato de etila:ácido fórmico (7,5:2,5:0,1)	Reagente Ácido fosfomolibdico
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1:1 saturado com 10% De Ácido acético)	Reagente KOH etanólico 10%
Flavonoides e taninos	Acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reagente de NEU mais UV 365
Ligninas	Clorofórmio: metanol: água (7:3:0,4)	Reagente vanila fosfórica com aquecimento
Mono e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (9,3:0,7)	Reagente vanila sulfúrica com aquecimento
Naftoquinonas	Tolueno: ácido formico (9,9:0,1)	Reagente KOH etanólico 10%
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (4:4:1)	Reagente Liebermann-Burchard

2.10. Análise fitoquímica por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do LabPetro, da Universidade Federal do Espírito Santo.

As frações apolares que apresentaram maiores efeitos biológicos foram analisados por um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas da Agilent 7890B (Agilent, California, USA) e detector massa modelo 5977A MSD com impacto de elétrons de 70eV. A coluna utilizada foi uma HP-5 de 30 m x 250 µm x 0,25 µm. O injetor foi ajustado para uma temperatura de 290 °C e o detector para 310 °C. A eluição foi iniciada numa rampa de aquecimento iniciando a 40 °C com taxa de aquecimento de 5°C/min até 280 °C, seguido com taxa de aquecimento de 15°C/min até 310 °C permanecendo nessa temperatura por 10min.

Para caracterização foi utilizado padrão de alcano de C10 a C40 que foram submetidos às mesmas condições cromatográficas. Os compostos foram identificados através da comparação com a biblioteca da base NIST seguido pela comparação dos índices de retenção da literatura (El-Sayed, 2018, NIST, 2018).

2.11. Análise estatística

Os dados de porcentagem de inibição de crescimento micelial foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Analisou-se a interação entre os fatores e, em seguida, procedeu-se aos necessários desdobramentos, onde aplicou-se o teste Tukey $P < 0.05$, com o auxílio do software RStudio (RStudio, 2020).

Os valores de IC_{50} foram obtidos por análise de regressão linear. A atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e o conteúdo de compostos fenólicos totais foram submetidos à ANOVA, em seguida, aplicou-se o teste Tukey ($P < 0.05$), com o auxílio do software RStudio (RStudio, 2020).

3. RESULTADOS

3.1 Atividade Antifúngica *in vitro*

Os resultados dos ensaios antifúngicos do EEtOH e frações de aroeira contra *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. encontram-se na tabela 2. Entre as amostras de aroeira, a FDCM e o EEtOH foram mais eficazes em inibir o crescimento de *Aspergillus* sp. em todas as concentrações avaliadas.

No *Rhizopus* sp., os tratamentos mais eficazes foram obtidos com a aplicação da FDCM, seguido da Face e FBuOH nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg/mL, sendo a 10 mg/mL os maiores valores de inibição com 69,5, 45,1 e 34,4% para FDCM, Face e FBuOH, respectivamente. O fungicida sintético inibiu 9,8% do crescimento micelial. Na menor concentração, somente a FDCM (6,7%) apresentou efeito semelhante ao controle positivo (tiofanato metílico).

Tabela 2: Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. submetidos a diferentes concentrações do extrato etanólico e frações de folhas de *S. terebinthifolia*

Tratamentos	<i>Aspergillus</i> sp.			<i>Rhizopus</i> sp.		
	Concentração mg/mL			Concentração mg/mL		
	0.1	5.0	10.0	0.1	5.0	10.0
EEtOH	6,3±1,7 ^b	11,1±2,3 ^b	14,3±3,2 ^b	3,4±1,2 ^b	6,4±1,8 ^d	20,3±5,1 ^d
FHex	1,2±0,5 ^{cd}	4,0±1,1 ^{cd}	7,0±1,5 ^c	3,0±1,9 ^{bc}	5,7±1,2 ^d	10,6±2,5 ^e
FDCM	3,1±1,3 ^c	11,0±2,4 ^b	15,3±2,7 ^b	6,7±2,1 ^{ab}	54,6±7,3 ^a	69,5±4,3 ^a
FAce	2,1±0,9 ^{cd}	5,3±1,7 ^c	7,4±1,6 ^c	1,1±0,3 ^c	31,6±3,6 ^b	45,1±3,9 ^b
FBuOH	0,0±0,0 ^d	3,4±1,3 ^{cd}	6,3±2,1 ^c	0,0±0,0 ^c	22,0±2,4 ^c	34,4±1,5 ^c
FAq	0,0±0,0 ^d	1,6±0,3 ^{de}	1,8±0,7 ^d	0,0±0,0 ^c	5,3±1,1 ^{de}	2,2±0,8 ^f
DMSO	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^e	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^e	0,0±0,0 ^f
Tiofanto metílico	23,0±4,6 ^a	23,0±4,6 ^a	23,0±4,6 ^a	9,8±2,6 ^a	9,8±2,6 ^d	9,8±2,6 ^e

EEtOH: extrato etanólico; FHex: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FAce: fração acetato de etila; FBuOH: fração butanol; FAq: fração aquosa; DMSO: controle negativo; Fungicida: Tiofanto metílico cercobin. Os valores são apresentados como média ± D.P. (n=3). Médias seguidas por diferentes letras minúscula na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A FDCM foi considerada a mais promissora em virtude da alta ação antifúngica nos testes de suscetibilidade e o EEtOH por conter todos os grupos químicos do metabolismo secundário presentes na planta, assim foram selecionados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (tabela-3, figura-1). O EEtOH apresentou CIM com valor igual a 2,50 mg/mL para os ambos os fungos, enquanto o valor observado na FDCM foi igual 1,25 mg/mL para *Aspergillus* sp. e 0,625 mg/mL para *Rhizopus* sp.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEtOH e FDCM de folhas de *S. terebinthifolia* contra o crescimento de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp.

Extratos	MIC (mg/mL)	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
EEtOH	2,50	2,50
FDCM	1,25	0,625

EEtOH:extrato etanólico; FDCM: fração diclorometano

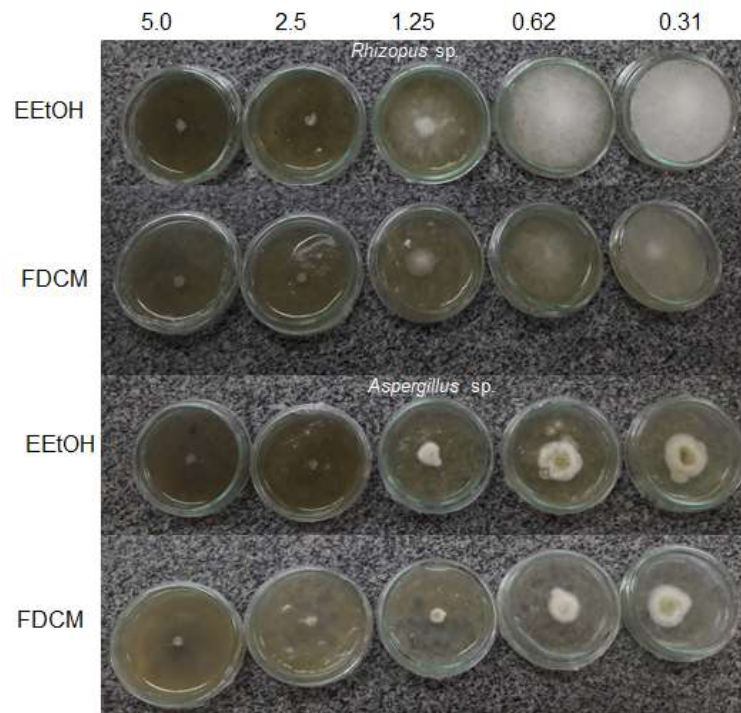


Figura 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEtOH e FDCM em diferentes concentrações 5,00; 2,50; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg/mL contra o o crescimento de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp.

3.3 Capacidade antioxidante in vitro

O resultado do potencial antioxidante dos extratos de *S. terebinthifolia* foi estudado por meio dos testes de radicais sintéticos, DPPH e ABTS, conforme tabela 4. A maior capacidade antioxidante foi obtida na FBUOH pelos dois métodos avaliados, DPPH e ABTS, cujos valores dos IC₅₀ são 35,29 e 36,83 µg/mL, respectivamente. No entanto, para o ensaio DPPH, o EEtOH também

apresentou capacidade antioxidante com IC₅₀ igual a 128,84 µg /mL. No ABTS, além da FBUOH, a FAce exibiu potencial antioxidante com IC₅₀ igual 119,79 µg/mL.

Tabela 4: Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante por DPPH e ABTS do extrato etanólico e frações de folhas de *S. terebinthifolia*.

Tratamentos	CFT (mg EAT/g)	DPPH IC ₅₀ (µg /mL)	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)
EEtOH	400,80±5,7 ^c	128,84 ^b	236,94 ^d
FHex	30,3±2,4 ^e	-	-
FDCM	120,9± 1,7 ^d	-	213,87 ^c
FAce	630,6±4.1 ^a	160,11 ^c	119,79 ^b
FBUOH	510,3±3.9 ^b	35,29 ^a	36,83 ^a
FAq	190,4±2,3 ^d	910,69 ^d	-
Quercetina	-	78,04	-

CFT: conteúdo de fenóis totais; EEtOH: extrato etanólico; FHex: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FAce: fração acetato de etila; FBUOH: fração butanol; FAq: fração aquosa; EAT: Equivalente em ácido tânico; (-) : valores não foram encontrados. Os valores são apresentados como média ± D.P. (n=3). Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p <0.05).

3.4 Conteúdo fenólico total (CFT)

O conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos de *S. terebinthifolia* foram estimados usando o ensaio de Folin-Ciocalteu, e os resultados obtidos foram expressos como µg de equivalentes de ácido tânico por mg de extrato (µg EAT/mg), usando a seguinte equação de regressão linear da curva de calibração traçada para ácido tânico: $Y = 0,0017 + 0,0198x$ e $R^2 = 0,99$. Os maiores teores de fenóis totais foram obtidos na FAce (630,6±4 mg EAT/g), seguido da FBUOH (510,3±3,9 mg

EAT/g) e no EEtOH ($400,80 \pm 5,7$ mg EAT/g) (Tabela 4). A FHex exibiu o menor teor entre todos produtos com $30,3 \pm 2$ µg EAT/mg (Tabela 4).

3.5 Análise fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato etanólico e as suas frações da espécie estudada foram submetidos à análise por CCD e foi possível caracterizar a presença dos principais grupos químicos, conforme Tabela 5. Nas amostras de aroeira foi identificado lignanas no EEtOH e em todas as frações, por outro lado não foi rastreado a presença de derivados de antracenos nas amostras. Os alcalóides e naftoquinonas só foram identificadas no EEtOH. As cumarinas não foram identificadas na fração aquosa. Os monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides estão presente no EEtOH e nas FHex e FDCM . Os flavonoides estão presentes no EEtOH e nas FHex, FDCM e FAc.

Tabela 5: Prospecção fitoquímica por cromatografia de camada delgada do extrato etanólico e suas frações de folhas de *S. terebinthifolia*

Grupos químicos	Tratamentos					
	EEtOH	FHex	FDCM	FAce	FBUOH	FAq
Alcaloides	+	-	-	-	-	-
Derivados de antracenos	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+	+	-
Lignanas	+	+	+	+	+	+
Mono e sesquiterpenos	+	+	+	-	-	-
Naftoquinonas	+	-	-	-	-	-
Triterpenos e esteroides	+	+	+	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	-	-

EEtOH= extrato etanólico, FHex = fração hexano; FDCM = fração diclorometano; FAcOH = fração acetato de etila; FBUOH = fração butanólica e FAq = fração aquoso

3.6 Análise fitoquímica por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

Para o EEtOH e as FHex e FDCM de *S. terebinthifolia*, os perfis cromatográficos pelo método de CG/EM demonstra a presença de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, assim como derivados de ácidos graxos (Tabela 6 e Figura-2).

Nas amostras de EEtOH e FHex foi possível identificar 54,37% e 50,74% das substâncias, respectivamente, sendo o palmitato de etila, o sitosterol, o fitol, linoleato de etila e a vitamina E (tocoferol) presentes numa porcentagem maior que 3%. O linolenato de etila foi o composto identificado em maior porcentagem relativa no EEtOH (15,84%) e na FHex (11,38%), uma vez que esse mesmo composto encontra-se a 2,05% na FDCM.

Na FDCM foi possível identificar a presença do monoterpene limonen-1,2-diol com 10,36% dos 24,24% do total de substâncias caracterizadas. O eugenol também foi identificado nessa fração. Na FHex foram identificados dois álcoois de sesquiterpenos o rosifoliol, cadinol e mais 2 acetatos de sesquiterpenos, o acetato de guaiol e acetato de eudesmol, além do selineno que está presente também no EEtOH. O ácido hexadecanoico está presente somente nas frações apolares com 1,93% na FHex e 3,51 no FDCM.

Nos tempos de retenções acima de 43 minutos do extrato etanólico e da FHex foi possível estimar, através do perfil de fragmentação de massas dos picos, que o grupo químico presentes nessa região do cromatograma trata-se de derivados de triterpenos.

Tabela 6: Compostos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa a partir dos extratos etanólico e das frações hexano e diclorometano das folhas de *S. terebinthifolia*.

Número	Tempo de retenção(min)	Compostos identificados	KI ^a	Amostras de aroeira com % das áreas dos cromatogramas		
				EEtOH	FHex	FDCM
1	16.99	Limoneno-1,2-diol	1338	-	-	10,36
2	17.478	Eugenol	1356	-	-	1,55
3	23.647	Rosifoliol	1604	-	1,09	-
4	24.716	Cadinol	1652	-	1,34	-
5	26.299	acetato de guaiol	1723	1,24	1	-
6	27.44	δ-Selineno	1776	1,45	0,84	-
7	27.622	acetato de eudesmol	1784	-	1,33	-
8	31.228	ácido hexadecanóico	1962	-	1,93	3,51
9	31.866	Palmitato de etila	1995	9,26	7	-
10	34.051	fitol	2113	5,67	6,4	-
11	34.938	Éster etílico de ácido linoleico	2162	4,15	3,47	-
12	35.057	linolenato de etila	2169	15,84	11,38	2,05
13	42.659	Ácido octadecanóico, éster 2,3-dihidroxipropil	2716	1,5	-	3,82
14	43.255	esqualeno	2832	2,55	1,86	-
15	44.682	Vitamina E	3151	3,99	4,23	-
16	45.808	γ-Sitosterol	3357	8,72	8,87	2,95
Total				54,37	50,74	24,24
(%)						

^a Índice de retenção obtido como referência padrão de n-alcenos usando em coluna HP-5MS. EEtOH: extrato etanólico; FHex: fração hexano; FDCM: fração diclorometano

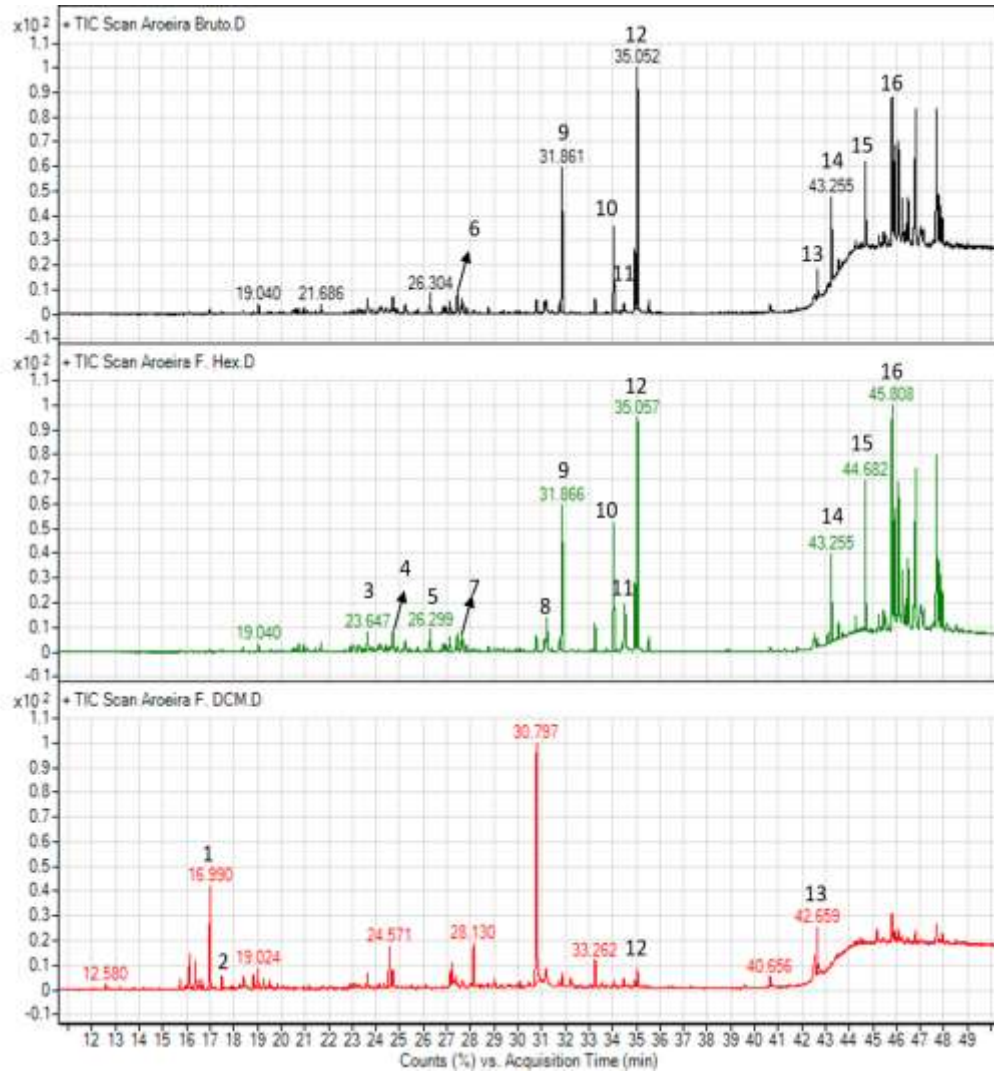


Figura 2: Cromatogramas com os compostos identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa a partir do extrato etanólico e das frações hexânica e diclorometano das folhas de *S. terebinthifolia*

4. DISCUSSÃO

Os resultados revelaram a atividade antimicrobiana do EEtOH e frações de *S. terebinthifolia* contra os fungos isolados de sementes utilizadas em sistemas agroecológicos. Os patógenos fúngicos isolados, *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp., são os agentes causais de deterioração mais comumente associados a sementes e grãos na pós-colheita, principalmente durante o armazenamento. O *Aspergillus* sp. pode sintetizar micotoxinas que têm um efeito tóxico na saúde humana e animal (Begum et al., 2013). O EEtOH e as frações FDCM e FAce exibiram atividade antifúngica superior aos outros produtos. Esses resultados corroboram relatos anteriores na literatura que demonstraram potencial antifúngico de *S. terebinthifolia* (Johann et al., 2010, Mohamed et al., 2020, Belhoussaine et al., 2022).

A FDCM apresentou a maior atividade antifúngica contra os patógenos testados, o que está de acordo com os achados de El-Massry et al. (2009). Eles relataram maior eficácia de inibição da FDCM contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Candida albicans*. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com o óleo essencial e extratos de frutos de *S. terebinthifolia* contra *Malassezia furfur* (Oliveira et al., 2018). Em estudo anterior, por outro lado, a atividade antifúngica foi identificada na fração hexânica de folhas de *S. terebinthifolia* contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Johann et al., 2010). Deste modo, inferi-se que os extratos de *S. terebinthifolia* que apresentam substâncias apolares têm sido mais eficazes como antifúngicos.

Os maiores valores da CIM foram encontrados para o EEtOH contra *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. (2,50 mg/mL) e a FDCM apresentou a CIM mais baixa entre 1,25 a 0,625 mg/mL contra os fungos testados. Estes resultados da FDCM de folhas *S. terebinthifolia* contra os patógenos testados concordam com os dados reportados por El-Massry et al. (2009) com CIM de 0,80 mg/mL para *Candida albicans* e, com Uliana et al. (2016) que testaram extrato etanólico de folhas e encontraram valor igual a 750 µg/mL para *C. albicans*. Extratos de plantas com valores da CIM variando entre 1,25 a 10 mg/mL possuem alto potencial antimicrobiano (Nguedia e Shey, 2014). Sendo assim, os resultados da pesquisa atual são promissores para investigações para a identificação dos princípios ativos responsáveis pela atividade antifúngica.

A atividade antimicrobina de *S. terebinthifolia* tem sido atribuída principalmente aos terpenos (Mohamed et al., 2020, Silva Dannenberg et al., 2019). Em pesquisa anterior, a atividade antifúngica de folhas de *S. terebinthifolia* foi associada ao triterpeno shinol contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Johann et al., 2010). No presente estudo, a FDCM apresentou como componente majoritário o limoneno-1,2-diol (10.36%). O monoterpeneo limoneno apresentou atividade antifúngica promissora contra outros fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum* (Dias et al., 2019), *Cryptococcus neoformans* (Leitão et al., 2020) e *Candida tropicalis* (Yu et al., 2022).

A atividade antifúngica do limoneno tem sido atribuída à destruição da membrana celular, ao aumento a permeabilidade da membrana e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Gupta et al., 2021). É importante ressaltar que entre as cepas fúngicas testadas, *Rhizopus* sp. foi mais suscetível a ação antifúngica da FDCM. Essa diferença na suscetibilidade dos organismos testados pode ser explicada pela variação na taxa de penetração do monoterpeneo e na característica estrutural da membrana (Cox et al., 2000).

A deterioração de sementes ocorre do processo de respiração celular levando a aumento de espécies reativas de oxigênio (Dode et al., 2013) e pela presença de fungos que podem intensificar esse processo com a degradação de biomoléculas (Begum et al., 2013). A deterioração de sementes pode ser prevenida com o uso de produtos ricos em antioxidantes (Chandra et al., 2018). Os resultados deste estudo revelaram que os extratos de solventes de polaridades crescentes de *S. terebinthifolia* exibiram a capacidade de eliminação de radicais livres.

A maior capacidade sequestrante dos radicais DPPH e ABTS pelos extratos de *S. terebinthifolia* foi registrada pela FBuOH, sendo o IC₅₀ igual a 35,29 µg/mL para o DPPH, maior poder antioxidante comparado ao do padrão quercetina (78,04 µg/mL). E para o ABTS o IC₅₀ foi igual a 36,83 µg/mL. A FHex apresentou o menor potencial de eliminação de radicais livres nos dois métodos avaliados. Em trabalhos prévios, a maior capacidade antioxidante de folhas de *S. terebinthifolia* foi mostrado no EEtOH (Ceruks et al., 2007, El-Massry et al., 2009). Iwanaga et al. (2018) testaram extratos hidroalcoólicos de folhas de *S. terebinthifolia* para os testes DPPH e ABTS e encontram IC₅₀ = 4,87 µg/mL e 5226,48 µM Trolox/g de extrato, respectivamente. Os valores variaram em cada estudo, pois o potencial antioxidante desses extratos está relacionado com sua composição química. Esses resultados,

bem como os nossos, mostram que as partes aéreas da planta têm forte atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos possuem grupos hidroxila, têm sido descritos por seu potencial antioxidante devido à sua capacidade de eliminar radicais livres, alto poder redutor e capacidade de inibir a oxidação lipídica (El-Massry et al., 2009; Uliana et al., 2016). No atual estudo, o maior conteúdo de compostos fenólicos foi obtido na Face ($630,6 \pm 4.1$ mg EAT/g), seguida da FBUOH ($510,3 \pm 3.9$ mg EAT/g), enquanto o menor teor foi observado na FHex ($30,3 \pm 2.4$ mg EAT/g). Apesar de a Face ter apresentado concentração mais elevada de compostos fenólicos, os melhores resultados da capacidade antioxidante nos testes realizados foram observados na FBUOH. Isso sugere que a ação antioxidante não depende apenas da concentração, entretanto, depende da estrutura e da interação entre os antioxidantes incluídos (Kannan et al., 2016).

Os metabólitos secundários são os compostos que não afetam o crescimento e desenvolvimento normal de uma planta, mas que funcionam na proteção contra fitopatógenos (Khare et al., 2020). Na pesquisa atual, a composição química de folhas *S. terebinthifolia* revelou uma ampla gama de classes químicas, flavonoides, fenóis, cumarinas, terpenos e derivados de ácidos graxos. Na literatura, a composição química de folhas de *S. terebinthifolia* se limita ao estudo de óleos essenciais e/ou partições que compõe o óleo essencial (Belhoussaine et al., 2022; El-Massry et al., 2009; Uliana et al., 2016). Esse estudo, no entanto, faz um rastreamento por partição líquido-líquido de todos os compostos, polares e apolares, conduzindo a identificação das classes de metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas testadas e de um possível sinergismo entre eles.

A análise por CG/EM revelou 16 compostos nas folhas de *S. terebinthifolia*, caracterizadas principalmente por linolenato de etila (15,84%), limoneno-1,2-diol (10,36%), palmitato de etila (9,26%) e sitosterol (8,72%). Belhoussaine et al. (2022) identificaram o limoneno como componente mais abundante do óleo essencial de folhas de *S. terebinthifolius* corroborando a atual pesquisa. O óleo essencial de folhas coletadas em Vitória - ES (sudeste do Brasil) revelou a presença principalmente de careno (68,78%), seguido do cariofileno (8,22%), mirceno (6,78%) e pineno (4,05%) (Uliana et al., 2016) divergindo do presente estudo. Tais variações nos fitoquímicos e suas quantidades podem ser explicadas por variações nos fatores

abióticos, como radiação, temperatura, disponibilidade de nutrientes, umidade, luz, salinidade, e por bióticos, patógenos (Khare et al., 2020).

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, a utilização de reagentes orgânicos de polaridades crescentes para a obtenção de extratos de *S. terebinthifolia* possibilitou a identificação da fração diclorometano e a fração butanol de folhas de *S. terebinthifolia* com atividade antifúngica e antioxidante *in vitro*, respectivamente. Futuros estudos para isolamento dos componentes ativos dos extratos poderão elucidar os mecanismos de ação das atividades antifúngica e antioxidante bem como testes *in vivo* no tratamento de sementes na pós-colheita para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção de fungos fitopatogênicos durante o armazenamento de grãos e sementes.

6. REFERÊNCIAS

- Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol* 2: 1-12.
- Begum MAJ, Venudevan B, Jayanthi M. 2013. Storage fungi in groundnut and the associate seed quality deterioration-a review. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*. 12: 127-134.
- Belhoussaine O, El Kourchi C, Harhar H, Bouyahya A, El Yadini A, Fozia F, Tabyaoui M. 2022. Chemical Composition, Antioxidant, Insecticidal Activity, and Comparative Analysis of Essential Oils of Leaves and Fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022.
- Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Borin MF, Lopez RF, Fonseca M.J. 2007. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International journal of pharmaceutics* 328(2): 183-190.
- Ceruks M, Romoff P, Fávero OA, Lago JHG. 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae). *Química Nov* 30: 597-599.
- Chandra J, Keshavkant S. 2018. Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. *Physiol Mol Biol Plants* 24(1):75–87.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J. Appl. Microbiol* 88: 170–175.
- da Silva Dannenberg G, Funck GD, da Silva WP, Fiorentini ÂM. 2019. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius Raddi*): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. *Food control* 95: 115-120.
- de Araujo Gomes RB, de Souza ES, Barraqui NSG, Tosta CL, Nunes APF, Schuenck RP, Kuster RM. 2020. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia Raddi*) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. *Industrial Crops and Products* 143: 111430.
- Dias A LB, Sousa WC, Batista HRF, Alves CCF, Souchie EL, Silva FG, Miranda ML D. 2019. Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three Citrus species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Brazilian Journal of Biology* 80: 460-464.
- Dode JS, Meneghello GE, Timm FC, Moraes DM, Peske ST. 2013. Respiration test soybean seed as related of physiological quality. *Ciência Rural* 43, 193–198.
- El-Massry KF, El-Ghorab AH, Shaaban HA, Shibamoto T. 2009. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared

from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. Journal of agricultural and food chemistry 57(12):5265-5270.

El-Sayed AM.2018. The Pherobase: database of pheromones and semiochemicals. Available in: <http://www.pherobase.com> (Accessed april 2022).

Gupta A, Jeyakumar E, Lawrence R. 2021. Journey of limonene as an antimicrobial agent. J Pure Appl Microbiol 15(3): 1094-1110.

Iwanaga CC, Ferreira L dos AO, Bernuci KZ, Fernandez CMM, Lorenzetti FB, Sehaber CC, Vieira Frez FC. 2019. In vitro antioxidant potential and in vivo effects of *Schinus terebinthifolia* Raddi leaf extract in diabetic rats and determination of chemical composition by HPLC-ESI-MS/MS. Natural Product Research 33(11): 1655–1658.

Johann S, Sá NP, Lima LA, Cisalpino OS, Cota BB, Alves T & Zani CL 2010. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 9(1): 1-6.

Kannan M, Kumar TS, Rao MV. 2016. Antidiabetic and antioxidant properties of *Waltheria indica* L., an ethnomedicinal plant. International Journal of Pharma Research and Health Sciences 4(5): 1376-1384.

Khare S, Singh NB, Singh A, Hussain I, Niharika K, Yadav V, Bano C, Yadav RK Amist N. 2020. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. J. Plant Biol 63:203–216.

Kordali S, Cakir A, Zengin H, Duru ME. 2003. Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey. Fitoterapia 74: 164-167.

Kumar DEEPAK, Singh KN, Shamim M, Kumar MAHESH, Siddiqui MW, Srivastava, D, Upadhyay PK. 2020. Storage of fungi with rice (*Oryza sativa*)-PRH 10 and their influence on seed quality. Indian J. Agric. Sci 90: 1250-1253.

Leitão SG, Martins GR, Martínez-Fructuoso L, de Sousa Silva D, da Fonseca TS Castilho CVV, Pereda-Miranda R. 2020. Absolute stereochemistry of antifungal limonene-1, 2-diols from *Lippia rubella*. Revista Brasileira de Farmacognosia 30(4): 537-543.

Makkar HPS. 2003. Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method. In: Quantification of tannins in tree and shrub foliage. Springer, Dordrecht 49-51.

Mohamed AA, Behiry SI, Ali HM, EL-Hefny M, Salem MZ, Ashmawy NA. 2020. Phytochemical compounds of branches from *P. halepensis* oily liquid extract and *S. terebinthifolius* essential oil and their potential antifungal activity. Processes 8(3): 330.

Nguedia AJC, Shey ND. 2014. African medicinal plant derived products as therapeutic arsenals against multidrug resistant microorganisms. *J Pharmacogn Phytother* 6(5): 59-69.

Nieder R, Benbi DK, Reichl FX, Nieder R, Benbi DK, Reichl FX. 2018. Health risks associated with pesticides in soils. *Soil Components and Human Health*. Springer, Netherlands 503–573.

NIST National Institute of Standards and Technology. <https://webbook.nist.gov/chemistry> [Consulted February 5, 2022].

Oliveira MSD, Gontijo SM, Teixeira MS, Teixeira IR, Takahashi JÁ, Millan DS, Segura MEC. 2018. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. *Revista Fitos* 12(2): 135-146.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com> [Consulted February 20, 2022].

Saeed MF, Jamal A, Ahmad I, Ali S, Shah GM, Husnain SK, Wang J. 2020. Storage conditions deteriorate cotton and wheat seeds quality: An assessment of Farmers' awareness in Pakistan. *Agronomy* 10(9), 1246.

Sánchez-González, I; Jiménez-Escrig, A & Saura-Calixto F. 2005. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry* 90: 133-139.

Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Saadi B, Aoumar, AAB. 2012 Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop protection* 35: 41-46.

Uliana MP, Fronza M, da Silva AG, Vargas TS, de Andrade TU, Scherer R. 2016. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Industrial Crops and Products* 83: 235-240.

Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.

Yu H, Lin ZX, Xiang WL, Huang M, Tang J, Lu, Y, Liu L. 2022. Antifungal activity and mechanism of d-limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. *LWT* 159: 113144.

CAPITULO 2 –Natural Alternative from *Ocimum gratissimum* against fungi associated with traditional seeds during storage

Autores: Juliana Trindade Lima¹ • Hildegardo Seibert França² • Antonio Fernando de Souza³

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

(2) Instituto Federal do Espírito Santo - *campus* Vila Velha, CEP 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil.

(3) Instituto Federal do Espírito Santo - *campus* Santa Teresa, CEP 29660-000, Santa Teresa, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: julianatrindade111@gmail.com

Periódico submetido: Revista Agronomia Colombiana, dezembro, 2022

RESUMO

Ocimum gratissimum L. é uma erva aromática pertencente à família *Lamiaceae* e utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* as atividades antioxidante e antifúngica do extrato etanólico e suas frações das folhas de *O. gratissimum*. O extrato etanólico foi obtido por maceração em etanol e posterior fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). A concentração inibitória mínima foi determinada para o extrato etanólico e fração diclorometânica, bem como para o eugenol puro. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS, e por FRAP. O efeito antifúngico foi determinado pelo método de difusão em ágar sobre *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp., fungos associados às sementes durante o armazenamento. O perfil fitoquímico foi determinado para todas as amostras por cromatografia em camada delgada e para as amostras de melhores resultados, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). O extrato etanólico apresentou forte capacidade antioxidante para todos os métodos testados (DPPH $371,10 \pm 2,98$ $\mu\text{g/mL}$, ABTS $182,43 \pm 1,10$ $\mu\text{g/mL}$, FRAP $262,39 \pm 3,61$ TEAC). Com relação à atividade antifúngica, o extrato etanólico e a fração diclorometânica apresentaram supressão total (100%) do crescimento fúngico e a CIM variou entre 0,625 a 1,25 mg/mL. Na análise de CG/MS foram detectadas 22 substâncias em todas as amostras avaliadas, com predominância do eugenol. Esses resultados indicaram alto potencial biológico dessa planta, sendo um biofungicida promissor.

Palavras-chave: Antioxidantes • diclorometano • pesticidas • fitopatógenos • fitoquímica

ABSTRACT

Ocimum gratissimum is an aromatic herb that belongs to the *Lamiaceae* family and used in folk medicine for the treatment of several diseases. The aim of the study was to evaluate *in vitro* antioxidant and antifungal activities of the ethanolic extract and their fractions from *O. gratissimum* leaves. The ethanolic extract was obtained by maceration in ethanol and subsequent fractionation with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). The minimum inhibitory concentration was determined for the ethanol extract and dichloromethane fraction, as well as for pure eugenol. The antioxidant capacity was evaluated by DPPH and ABTS free radical scavenging methods, and by FRAP. The antifungal effect was determined by the agar diffusion method on *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. fungi associated with seeds during storage. The phytochemical profile was determined for all samples by thin layer chromatography and for the best results samples, by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The ethanolic extract showed strong antioxidant capacity for all tested methods (DPPH 371.10 ± 2.98 $\mu\text{g/mL}$, ABTS 182.43 ± 1.10 $\mu\text{g/mL}$, FRAP 262.39 ± 3.61 TEAC). Regarding the antifungal activity, the ethanolic extract and dichloromethane fraction showed total suppression (100%) of fungal growth and MIC ranged from 0.625 to 1.25 mg/mL. In the GC analysis, 22 substances were detected in all samples evaluated, with predominance of eugenol. These results indicated high biological potential of this plant, being a promising biofungicide.

Keywords: Antioxidants • dichloromethane • pesticides • phytopathogens • phytochemistry

1. INTRODUCTION

It is estimated that at least 15% of losses during storage occur due to product contamination by insects and fungi (Silva et al., 2021). Extracts and essential oils from plants have demonstrated ability to inhibit the action of phytopathogens or the production of mycotoxins being promising biofungicides capable of mitigating the use of chemical pesticides in the field (Dambolena et al., 2010; Elisée et al., 2020; Mohr et al., 2017), which occurs due to the presence of compounds from the secondary metabolism of plants. These chemical groups are important biological agents that can play antifungal and antioxidant roles (Elisée et al., 2020; Onyebuch & Kavaz 2020, Uchegbu et al., 2018).

The composition and activity of the bioactive components of plants vary according to genotype, geographic location, and vegetative stage, as well as method, solvent and temperature used in the extraction process (Castro et al., 2019; Onyebuch & Kavaz, 2020). The extraction of secondary metabolites can be performed using the fractionation technique, which uses solvents of different polarities and allows the concentration of chemical groups in distinct fractions with completely different chemical characteristics from a single plant (Mann, 2012).

Ocimum gratissimum Linn., popularly known as clove basil, is an aromatic herb that belongs to the *Lamiaceae* family, found in South America, Africa, and Asia (Mohr et al., 2017). It is used as a food condiment and in folk medicine; the infusion of leaves is prepared for the treatment of fever, flu, and kidney problems (Matos 2007; Penido et al., 2016). It has a diversity of chemical groups with proven biological activities, which include anti-inflammatory (Dzoyem et al., 2021), insecticidal (Benelli et al., 2019), antibacterial (Hamma et al., 2020), antioxidant (Onyebuch & Kavaz, 2020) and antifungal properties against several species of fungi, among them *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium expansum* and *Colletotrichum* spp. (Uchegbu et al. 2018).

The chemical profile of this species includes the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannins, sterols, terpenoids, saponins and alkaloids (Hamma et al., 2020; Mann, 2012). The leaves are rich in essential oils, whose main

components contain eugenol, thymol, linalool with antimicrobial activities already documented in the literature (Dung et al., 2021; Faria et al., 2006; Mohr et al., 2017).

Natural plant-based products are a more appropriate strategy in agricultural management, as they are biodegradable, prevent pathogen resistance, and are less harmful to human health when compared to commercial fungicides (Chowdhary et al., 2018; Mohr et al., 2017). Most studies on the control of phytopathogens have focused on the biological properties of essential oils and there are few data in literature based on extracts and the fractionation of their from *Ocimum gratissimum* leaves against phytopathogens (Dambolena et al., 2010; Elisée et al., 2020; Mohr et al., 2017). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* antifungal and antioxidant capacity and the chemical profile of the ethanolic extract and their fractions from *O. gratissimum* leaves.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection and botanical identification of the plant species

O. gratissimum L. leaves were collected at the Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) Experimental Farm of the Institute for Research, Technical Assistance and Rural Extension of Espírito Santo (INCAPER), Viana, Espírito Santo, Brazil, in October 2019.

2.2 Preparation of the ethanolic extract and its fractions

The plant extract was prepared at the Laboratory of the Federal Institute of Espírito Santo (Ifes), Vila Velha campus. Leaves were dried in an oven with air circulation at 40 °C for 24 hours and then crushed. To obtain the ethanolic extract (EEtOH), leaves were macerated in 96% ethanol at 1:8 ratio (dryer plant: ethanol), at room temperature and protected from light. Subsequently, the extract was filtered, and the solvent removed on rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-3 CH 9230 Flawil 1, Switzerland). The recovered solvent was added to the leaf residue and crushed again until the plant drug was depleted. The concentrated residue (EEtOH) obtained was stored in amber glass under refrigeration at 4°C.

To obtain fractions of different polarities, part of the EEtOH was resuspended in an ethanol-water mixture (8:2) and submitted to successive liquid-liquid partitions with organic solvents of increasing polarities, which, after total removal of solvents, the following fractions were obtained: hexane (FHex), dichloromethane (FDCM), ethyl acetate (FAce), *n*-butanol (FBuOH) and the residual after partitions was called aqueous fraction (FAq).

2.3 Antifungal Activity

The experimental design was completely randomized, in a 6x3 +2 factorial scheme, with three replicates. Factor A was composed of six different extracts (EEtOH; FHex; FDCM; FAce; FBuOH and FAq) and factor B was composed of three concentrations (0.1; 5 and 10 mg/mL), plus two additional treatments, negative control, and positive control. The negative control (without EEtOH or fraction) and Cercobin® commercial fungicide based on thiophanate methyl (Dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene) (3-thioallophanate) at 0.8 g/L (positive control).

For the *in vitro* antifungal activity evaluation, the agar diffusion method according to was used (Barros et al., 1995). The ethanolic extract and fractions were tested on *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp., isolated from traditional bean and corn seeds and identified at the Laboratory of Diagnosis of Plant Diseases of Ifes, Santa Teresa campus.

Sterilized stock solutions (15mg/mL) were diluted in sterilized Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium, in a melting state, to obtain final concentrations of 0.1, 5 and 10 mg/mL for each sample. Then, the final solutions were poured onto 5 cm diameter Petri dishes inside. The isolates fungi were spiked into the center of each Petri dish. Plates were incubated in growth chamber (BOD) at 25°C, 12h photoperiod, until the mycelial growth of the respective fungi, in the negative control treatment, reached the edge of the plate. Mycelial growth was evaluated by daily measurement of the diameter (in cm) of colonies. The mycelial growth inhibition percentage (GIP) was estimated using the equation (KORDALI et al., 2003):

$$\text{PIC (\%)} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

Where, D_c = average mycelial diameter of the negative control (cm); D_t = average mycelial diameter of treatments (cm).

2.4 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The ethanolic extract and the dichloromethane fraction from *O. gratissimum* leaves were considered the most promising due to their high antifungal action in susceptibility tests. Therefore, these treatments were selected for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). Furthermore, the mic of the main component of both products, eugenol, was evaluated.

The EEtOH and the FDCM were added to PDA to make 5 mg/mL stock solution. Serial dilution was performed to obtain concentrations of 5.0; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 and 0.1 mg/mL, then the agar diffusion method was performed, as previously mentioned. For evaluation of pure eugenol, a stock solution of 1.0 mg/mL of pure eugenol in 0.5% DMSO was prepared, subsequently serial dilutions were performed with final concentrations of 1.0; 0.75; 0.5; 0.25 and 0.125 mg/mL. Then they were incubated for 48 hours at 25°C. Furthermore, the fungal growth was observed. The lowest concentration, which inhibits the visible growth of tested organism after macroscopic evaluation, was determined as MIC (Talibi et al., 2012). All determinations were run in triplicate.

2.5 In vitro antioxidant capacity: Test DPPH

The antioxidant capacity of the EEtOH and fractions using the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) free radical scavenging was determined according to Casagrande et al. (2007), with modifications. 500 μ L of 250 μ M DPPH ethanolic solution was mixed to 30 μ L of solutions containing decreasing concentrations of the extracts in ethanol (1000; 500; 250; 125 and 62.5 μ g/mL), plus 1000 μ L of 0.1 M acetate buffer and 1000 μ L of absolute ethanol. The so-called "blank" solution was prepared with ethanol-DPPH mixture. After 30 minutes of incubation at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm in

spectrophotometer. The DPPH radical scavenging activity was expressed as inhibition percentage.

$$IC\%_{(DPPH)} = 100 - \frac{A_{AMOSTRA}}{A_{CONTROLE}} \times 100$$

Where, A_{SAMPLE} is the absorbance of treatments, and $A_{CONTROL}$ is the absorbance of control (containing all reagents, except treatment sample).

The antioxidant activity was evaluated based on the IC_{50} value ($\mu\text{g/mL}$), extract concentration necessary to scavenge 50% of the DPPH free radical by linear regression using concentration values ($\mu\text{g/mL}$) versus inhibition percentage (IC%).

2.6 *In vitro* antioxidant capacity: Test ABTS

The antioxidant capacity of the EtOH and fractions using the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical was performed according to Sánchez-González et al. (2005). $ABTS^+$ cation was produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate. The mixture was stored in dark bottle at room temperature for 16 hours before use. The ABTS solution was diluted in phosphate buffer (pH 7.4) to absorbance of 0.7 at 730 nm. The samples were resuspended in ethanol, generating solutions with concentrations ranging from 62.5 to 1000.0 $\mu\text{g/mL}$. After adding 10 μL of each sample standard to 4 mL of diluted $ABTS^+$ solution, absorbance readings at 730 nm were performed after 6 minutes of reaction in spectrophotometer. The antioxidant capacity was calculated by the inhibition percentage of the ABTS radical activity (IC% (ABTS)), according to the following equation:

$$IC\%_{(ABTS)} = 100 - \frac{A_{AMOSTRA}}{A_{CONTROLE}} \times 100$$

Where, A_{SAMPLE} is the absorbance of treatments and $A_{CONTROL}$ is the absorbance of control (containing all reagents, except the treatment sample).

The antioxidant activity was evaluated based on the IC_{50} value ($\mu\text{g/mL}$), extract concentration necessary to scavenge 50% of the ABTS free radical by linear regression using concentration values ($\mu\text{g/mL}$) versus percentage inhibition (IC%).

2.7 *In vitro* antioxidant capacity: Assay Iron reduction (FRAP)

The antioxidant capacity of the EEtOH and fractions was evaluated by FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) based on the method of Sánchez–González et al. (2005), with some modifications. This method is based on the reduction of the ferric ion (Fe^{3+}) to the ferrous ion (Fe^{2+}) by antioxidant molecules present in the extracts and subsequent formation of a colored complex of the Fe^{2+} and 4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ). The FRAP reagent was prepared as follows: 2.5 mL of a 10 mM solution of TPTZ in 40 mM HCl were added to 2.5 mL of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 25 mL of 0.3 mM acetate buffer pH 3.6. The solution was incubated at 37°C for 30 minutes in a water bath. For the evaluation of the antioxidant capacity, 900 μL of the previously prepared FRAP reagent was mixed with 90 μL of distilled water and 10 μL of the sample or standard. The samples were incubated at 37°C for 30 minutes and the reading was performed at 595 nm in a UV-Visible spectrophotometer (Biospectro SP-220). Standard solutions with different concentrations of trolox (0.5; 1; 2.5; 5; 10; 15 and 20 μmol) were used for calibration. Results were expressed as μmol Trolox equivalent/g sample (TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity).

2.8 *Phytochemical analysis by thin layer chromatography (TLC)*

The extract and fractions of clove basil leaves *O. gratissimum* were analyzed by thin layer chromatography (TLC) in order to prospect the main secondary metabolism groups for the presence of alkaloids, anthracene derivatives, coumarins, lignans, mono and diterpenes, flavonoids, naphthoquinones, triterpenes and steroids, as shown in table 1. The eluent systems and revealing reagents for each chemical group were characterized according to table 1 (Wagner & Bladt, 1996).

Table 1: Systems and revealing reagents of the respective chemical groups using the thin layer chromatography (TLC) technique.

Chemical groups	Elution systems	Revealers
Alkaloid	Toluene: Ethyl Acetate: Diethylamine (7:2:1)	Dragendorff reagent
Anthracene derivatives	Ethyl acetate:methanol:water (10:1.35:1)	10% ethanolic KOH reagent
Anthraquinones	Ethyl ether:ethyl acetate: formic acid (7.5:2.5:0.1)	Phosphomolybdic acid reagent
Coumarins	Toluene: ethyl ether (1:1 saturated with 10% acetic acid)	10% ethanolic KOH reagent
Flavonoids and tannins	Ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: water (100:11:11:26)	NEU reagent plus UV 365
Lignins	Chloroform: methanol: water (7:3:0.4)	Vanilla phosphoric reagent with heating
Mono and diterpenes	Toluene: ethyl acetate (9.3:0.7)	Vanilla sulfur reagent with heating
Naphthoquinones	Toluene: formic acid (9.9:0.1)	10% ethanolic KOH reagent
Triterpenes and steroids	Toluene: chloroform: ethanol (4:4:1)	Liebermann-Buchard Reagent

2.9 Phytochemical analysis by Chromatographic analysis by Gas Chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS)

The analyzes by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) were performed at the Laboratory of Chromatography of LabPetro, Federal University of Espírito Santo. The nonpolar fractions that showed the greatest biological effects were analyzed by a Gas Chromatograph coupled to an Agilent 7890B Mass Spectrometer (Agilent, California, USA) and a model 5977A MSD mass detector with electronic ionization of 70eV. The column used was a 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m HP-5 column. The injector was set to a temperature of 290 °C and the detector to 310 °C. Elution was started on a heating ramp starting of 40°C with a heating rate of 5 °C /min to 280 °C , followed by a heating rate of 15 °C/min to 310 °C, remaining at that temperature for 10 min.

For characterization, a C10 to C40 alkane standard were used, and submitted to the same chromatographic conditions. Compounds were identified through

comparison with the National Institute of Standards and Technology (NIST) database library followed by comparison of literature retention rates (Nist 2018).

2.10 Statistical analysis

Mycelial growth inhibition percentage data were submitted to analysis of variance (ANOVA). The interaction between factors was analyzed, later the Tukey test ($P < 0.05$) was applied for the factorial group, and the Dunnett test ($P < 0.05$) was applied for the comparison of means of the factorial group with additional treatments (positive and negative control), using Assistet 7.6 software (Silva & Azevedo, 2009).

The antioxidante activity was evaluated using ANOVA followed by the Tukey test ($P < 0.05$) using Assistat 7.6 software (Silva & Azevedo 2009). All experiments were completed in triplicate to ensure reproducibility.

3. RESULTS

3.1 Antifungal Activity

Antifungal activity of the extracts of *O.gratissimum* at different concentrations against *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. fungi is in Table 2. For the variable percentage of growth inhibition there was a significant interaction between the concentrations and the plant extracts tested.

The results indicate that EEtOH and FDCM at 5 and 10 mg/mL showed high antifungal activity with complete suppression (100%) of the mycelial growth of *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. These were the only treatments with antifungal activity higher to synthetic fungicide against *Aspergillus* sp. *Rhizopus* sp. For *Rhizopus* sp. the inhibition of the synthetic fungicide was 9.8%, lower than EEtOH, FHex, FDCM and Face treatments at 5 and 10 mg/mL. Among the polar fractions, FAcE at 10 mg/mL was the most active with GIP of 37.4% and 61% for *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp., respectively.

Table 2: Mycelial growth inhibition percentage (GIP) of *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. submitted to different ethanolic extract concentrations and fractions from *O.gratissimum* leaves

Treatments	<i>Aspergillus</i> sp.			<i>Rhizopus</i> sp.		
	Concentration mg/mL			Concentration mg/mL		
	0.1	5	10	0.1	5	10
EEtOH	8.6 ^b	100 ^a	100 ^a	5.2 ^a	100 ^a	100 ^a
FHex	7.6 ^{bc}	40.7 ^b	52.5 ^{+ b}	4.9 ^a	36 ^c	47.7 ^c
FDCM	11.9 ^a	100 ^a	100 ^a	6.1 ^a	100 ^a	100 ^a
FAcE	3.7 ^d	19.3 ^c	37.4 ^c	4.7 ^a	44.5 ^b	61 ^b
FBuOH	8.3 ^b	11.3 ^d	21.8 ^d	0 ^{*b}	3.1 ^d	8.6 ^{+ d}
FAq	5.5 ^{cd}	10.5 ^d	19.6 ^d	0 ^{*b}	1.5 ^{*d}	2.8 ^e
DMSO	0	0	0	0	0	0
methyl thiophanate	54	54	54	9.8	9.8	9.8

EEtOH: ethanolic extract; FHex: hexane fraction; FDCM: dichloromethane fraction; FACE: ethyl acetate fraction; FBuOH: butanol fraction; FAq: aqueous fraction; DMSO: negative control. Means followed by different lowercase letters in the column differ statistically from each other by the Tukey's Test ($p < 0.05$). Means followed by * and + do not differ statistically from DMSO and fungicide treatments, respectively (Dunnett; $p > 0.05$).

3.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the *O. gratissimum* extracts and eugenol are shown in Table 3. The MIC ranged from 0.625 to 1.25 mg/mL. FDCM exhibited the lowest MIC for *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. with a value equal to 0.625 mg/mL for both microorganisms, regarding EEtOH, the MIC for *Aspergillus* sp. was 1.25 mg/mL and for *Rhizopus* sp. was 0.625 mg/mL. The MIC of eugenol was 0.125 mg/mL.

Table 3: Minimum Inhibitory Concentration (mg/mL) of extracts from *O. gratissimum* leaves.

Extracts	MIC	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
EEtOH	1.25	0.625
FDCM	0.625	0.625
Eugenol	0.125	0.125

EEtOH: ethanolic extract; FDCM: dichloromethane fraction; Eugenol

3.3 Antioxidant capacity

The result of the antioxidant potential of *O. gratissimum* extracts was studied by means of synthetic radical tests, DPPH and ABTS, and by the FRAP assay, as shown in Table 4. The antioxidant potential of extracts by DPPH and ABTS consisted of the ability to eliminate free radicals by donating a hydrogen atom or an electron. The antioxidant capacity is related to the degree of discoloration of the reaction solution with the synthetic free radical (Sousa et al, 2007; Re et al., 1999).

The EEtOH partition exhibited the highest antioxidant capacity for both DPPH and ABTS assays, followed by nonpolar fractions, FHex and FDCM, respectively. Low potential was identified in polar fractions, among which FAc was significantly lower among all extracts evaluated in the DPPH and ABTS assays. FAq was the only extract that did not show significant potential for scavenging the ABTS radical. The FRAP assay defines antioxidant as any substance in the reaction medium with reducing power, by donating a hydrogen atom (Duh et al., 1999). Thus, EEtOH

presented the highest reducing power and as the polarity is increased, the reduction capacity of samples is smaller, with FAq showing the lowest value.

Table 4: Antioxidant capacity of the ethanolic extract and fractions from *O. gratissimum* leaves.

Treatments	DPPH (IC ₅₀ (µg /mL))	ABTS (IC ₅₀ (µg /mL))	FRAP (TEAC)
EEtOH	371.1±2.98 ^e	182.43±1.1 ^e	262.39± 3.61 ^a
FHex	405.60±3.21 ^e	325.86±3.49 ^d	229.88±1.65 ^b
FDCM	707.11±2.75 ^d	370.00±1.76 ^c	111.51± 5.03 ^c
FAce	2088.33±13.52 ^a	641.06±8.05 ^a	39.62± 1.63 ^e
FBuOH	905.96±5.64 ^c	495.66±5.63 ^b	64.13± 2.29 ^d
FAq	1748.52±8.36 ^b	4816.50±20.35 ^{ns}	27.32±1.9 ^f

EEtOH: ethanolic extract; FHex: hexane fraction; FDCM: dichloromethane fraction; F_{Ace}: ethyl acetate fraction; FBuOH: butanol fraction; FAq: aqueous fraction; DMSO: negative control; ns: not significant. Values are presented as mean ± SD. (n=6). Means followed by different lower case letters in the column differ statistically from each other by the Tukey's Test (p<0.05).

3.4 Phytochemical analysis by thin layer chromatography (TLC)

The ethanolic extract and its fractions from the species under study were submitted to TLC analysis and it was possible to characterize the presence of the main chemical groups, as shown in Table 5. Clove basil samples indicated the absence of chemical groups of alkaloids and anthracene derivatives, while naphthoquinones are present only in EEtOH. Lignans are present in all samples, while coumarins were observed in EEtOH, FHex, FDCM and FAq. In EEtOH and in more nonpolar fractions, the presence of chemical groups derived from terpenes, such as monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes and steroids, can be observed. Flavonoids are absent in FAq.

Table 5: Phytochemical prospection by thin layer chromatography of the ethanolic extract and fractions from *O. gratissimum* leaves.

Chemical groups	Treatments					
	EEtOH	FHex	FDCM	FA _{CE}	FBuOH	FAq
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Anthracene derivatives	-	-	-	-	-	-
Coumarins	+	+	+	+	-	-
Lignans	+	+	+	+	+	+
Mono and sesquiterpenes	+	+	+	-	-	-
Naphthoquinones	+	-	-	-	-	-
Triterpenes and steroids	+	+	+	-	-	-

EEtOH= ethanolic extract, FHex = hexane fraction; FDCM = dichloromethane fraction; FA_{CE} = ethyl acetate fraction; FBuOH = butanolic fraction and FAq = aqueous fraction. *positive (+) and negative (-) signs indicate the presence and absence of chemical groups respectively.

3.5 Phytochemical analysis by Chromatographic analysis by Gas Chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS)

In the GC/MS chromatographic profile EEtOH samples and their nonpolar fractions from *O. gratissimum* leaves, 22 substances were identified, as shown in Table 6. From chromatograms, the presence of eugenol as the major substance in all samples was observed, with the highest relative percentage (61.26%) in the FDCM fraction, followed by the EEtOH extract (59.61%) and FHex fraction (37.65%). The presence of sesquiterpenes in the hexane fraction was characterized, with caryophyllene with 2.28%, germacrene D with 1.5%. In the EEtOH fraction, caryophyllene and germacrene are the only identified with 1.32% and 1.91%, respectively. In the dichloromethane fraction, it was only possible to identify the coniferyl alcohol, in addition to the fatty acid derivative, methyl α -linoleate. Other fatty acid derivatives were characterized in the ethanolic extract and in the FHex fraction, the latter being ethyl linoleate, with the highest percentage (3.14%). Diterpene phytol is present in the EEtOH extract and in the FHex fraction, with 3.08% and 6.97%,

respectively. In the FHex fraction, it was possible to identify the triterpene squalene (10.24%), as well as steroidal derivatives chondrilasterol and sitosterol.

Table 6: Compounds identified by GC/MS from the ethanolic extract and the hexane and dichloromethane fractions from *O. gratissimum* leaves.

Clove basil samples with % of chromatogram areas						
Number	Retention time (min)	Identified compounds	KI ^a	EEtOH	FHex	DCM
1	17.499	Eugenol	1357	59.61	37.65	61.26
2	17.945	α -Copaene	1374	-	0.83	-
3	18.168	(-)- β -Bourbonene	1382	-	0.51	-
4	18.531	Vanillin	1396	-	-	1.22
5	19.045	Caryophyllene	1416	1.32	2.28	-
6	20.617	Germacrene D	1478	1.91	1.5	-
7	21.686	δ -Cadinene	1522	-	1.21	-
8	23.061	Caryophyllene oxide	1580	-	1.42	-
9	25.432	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1683	-	0.74	-
10	26.537	Coniferyl alcohol	1734	-	-	0.86
11	28.758	Phytol derivative	1839	1.52	0.94	-
12	31.207	n-Hexadecanoic acid	1963	-	0.63	-
13	31.861	Ethyl hexadecanoate	1994	0.85	1.72	-
14	34.045	Phytol	2112	3.08	6.97	-
15	34.528	Methyl α -linolenate	2139	-	2.03	1.11
16	34.938	Linoleic acid ethyl ester	2162	-	0.65	-
17	35.052	Ethyl linoleate	2169	1.7	3.14	-
18	35.545	Octadecanoic acid, 17-methyl-, methyl ester	2196	-	0.45	-
19	43.255	Squalene	2832	4.72	10.24	-
20	44.682	Vitamin E	3151	0.81	2.88	-
21	45.445	Chondrillasterol	3297	-	3.18	-
22	45.803	γ -Sitosterol	3356	-	3.05	-
Total (%)				75.52	82.02	64.45

^a Retention index obtained as a standard reference of n-alkanes using HP-5MS column

4. DISCUSSION

The present study demonstrated *in vitro* antifungal activity of the EEtOH extract and the nonpolar fractions from *O. gratissimum* leaves at 5 mg/mL against *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp fungi associated with seeds in the storage phase, which indicates biological potential of extracts obtained from this plant. *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. fungi can accelerate the deterioration process of stored seeds and grains. In addition to the synthesis of toxic metabolites by *Aspergillus* sp., hampering commercialization and consumption (Begum et al., 2013).

In similar study, Onaebi et al. (2020) using the EEtOH at 100 mg/mL from *O. gratissimum* leaves, found reductions in the growth of *Aspergillus flavus* (51.93%) and *Aspergillus niger* (23.7%), but the same did not occur for *Rhizopus delemar* (0%), differing from the present study. This difference in activity can occur as a result of the process of obtaining plant extracts, as well as their preparation in the biological test used. This interferes with the profile of chemical constituents and, consequently, with their biological properties (Onaebi et al., 2020; Onyebuchi & Kavaz, 2020).

In the literature, many studies are carried out on the essential oil of *O. gratissimum*, however, the extract is still little investigated (Zareiyan & Khajehsharif, 2022). In the current research, the MIC of the EEtOH and FDCM extracts ranged from 0.625 to 1.25 mg/mL for the test fungi (table- 3). In work by Nwofor et al. (2021), the MIC of the methanolic extract of *O. gratissimum* against *Penicillium citrinum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Curvularia kusanol* and *Absidia* spp. was equal to 100 mg/ml, differing from the present study. Plant extracts with MIC values between 1.25 and 10.0 mg/mL have high potential (Assob & Nsagha, 2014). Therefore, these results indicate high activity of *O. gratissimum* extracts, which could contribute to future actions as an alternative method for the management of phytopathogens during storage.

The antifungal activity presented by the EEtOH and FDCM extracts may be related to the presence of chemical groups of secondary metabolism, terpenes and phenolic compounds (Table 6), which were identified in preliminary studies as antifungal agents (Dambolena et al., 2010; Elisée et al., 2020; Mohr et al., 2017;

Uchegbu et al, 2018). Chemical analysis by GC/MS revealed the majority presence of eugenol in the most effective extracts against the fungi studied.

The MIC observed indicated that the FDCM fraction from *O. gratissimum* leaves was more effective against both organisms tested when compared to the EEtOH, but lower activity compared to pure eugenol, however with similar values (table-3). Ethanol is a non-selective solvent in the process of extracting compounds from plants, thus allowing greater chemical diversity of constituents in the extracts obtained, but at low concentrations. Often, the greater biological activity attributed to EEtOH is related to the synergistic effect among substances (Galindo et al., 2010).

On the other hand, fractions obtained from the fractionation process with selective solvents of different polarities have higher concentrations and lower diversity of phytochemicals and are more selective in terms of polarity. Nassazi et al. (2020) and Zareiyani & Khajehsharifi (2022) showed that extracts obtained from different solvents or mixtures of solvents may be related to the presence of a certain chemical group over another due to the selectivity of chemical groups in the process of extracting *O. gratissimum* leaves.

Preventing the deterioration of stored seeds and grains caused by fungi that promote oxidative reactions by degrading biomolecules, as well as by the accumulation of toxic derivatives, is essential using products that can be sources of antioxidants (Begum et al., 2013). The results of this study revealed that EEtOH showed the highest antioxidant capacity among samples used for the DPPH, ABTS and FRAP methods. The antioxidant capacity of EEtOH indicates synergism between the antioxidants in the extracts, moreover, it points to the fact that antioxidant action does not depend only on the concentration but, however, depends on the structure and interaction between the included antioxidants (Kannan et al., 2016).

In similar studies, methanolic extracts and FA_{CE} from *O. gratissimum* leaves showed the highest antioxidant activities using the same methods as in this study (Ouyang et al., 2013). The results of the antioxidant activity of the FA_{CE} were divergent, showing that other chemical groups may have antioxidant capacity. In the present study, FA_q showed low capacity to scavenge free radicals, corroborating the

findings of Ouyang et al. (2013), which can be attributed to the low concentration of chemical groups with antioxidant activity (Elisée et al., 2020).

Researchers have attributed this activity to the presence of phenolic compounds, which are easily extracted by these solvents, considered protic polar (Elisée et al., 2020; Nassazi et al., 2020; Ouyang et al. 2013). In current research, all treatments with greater capacity to eliminate free radicals, EEtOH, FHex and FDCM, had eugenol mostly in the composition, in the literature the antioxidant capacity of this phenolic compound has already been elucidated (Dambolena et al., 2010; Dung et al., 2021). Furthermore, among the evaluated fractions, FHex showed the highest antioxidant capacity. This fraction has other photochemicals such as squalene and Vitamin E with previously documented antioxidant properties (Günes, 2013).

The preliminary phytochemical prospection of the EEtOH and fractions show that the chemical groups with antifungal and antioxidant activities observed in this study may be related to the presence of terpenes, such as monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes and steroids. In the study by Hamma et al. (2020), the presence of steroids, saponins, alkaloids, tannins and flavonoids was observed in the EEtOH and FAq extract from *O. gratissimum* leaves. Mann (2012) observed that nonpolar fractions (hexane and chloroform) had alkaloids, terpenoids, flavonoids and sterols in the phytochemical prospection of *O. gratissimum* collected in Nigeria.

In this study, the nonpolar fraction FDCM and the EEtOH extract showed the best antifungal activities and the GC/MS analysis indicates eugenol as the major compound. Eugenol is a phenylpropanoid commonly found in essential oils extracted from *O. gratissimum* leaves and, due to its nonpolar characteristic, it was easily identified in the less polar fractions and in the ethanolic extract in this study. Studies have reported that this compound is related to several biological activities, mainly against phytopathogens (Faria et al., 2006; Dambolena et al., 2010; Dung et al., 2021). *O. gratissimum* can be classified according to the essential oil chemotype in this species. The following chemotypes are found: thymol, eugenol, geraniol, linalool/methyl chavicol, methyl and ethyl cinnamates and thymol/terpinene/cymene (Castro et al., 2019; Mohr et al., 2017; Uchegbu et al., 2018). The presence of these chemotypes can be attributed to extrinsic (climatic, edaphic and climaticedaphic) and

intrinsic (genetic) factors, as well as the harvest time, pre-processing and extraction methods (Castro et al., 2019).

5. CONCLUSIONS

The results of this study confirmed that *O. gratissimum* extracts have antifungal and antioxidant activity, but the type of solvent used in the extraction can interfere with the chemical composition and biological properties. The mechanism of action can probably be related to the presence of eugenol. In addition, extracts can scavenge free radicals, which could reduce seed deterioration during storage. However, it is still necessary to verify the *in vivo* efficacy and improve the activity with the release of the active ingredient at the specific site of action.

6. REFERENCES

1. Assob, J. C. N., & Nsagha, D. S. 2014. African medicinal plant derived products as therapeutic arsenals against multidrug resistant microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 6(5): 59-69.
2. Bankole, S.A., Somorin, Y.M. 2010. Antifungal activity of extracts of *Ocimum gratissimum* and *Aframomum danielli* against moulds isolated from stored rice. *Julius-Kühn-Archiv* 425: p578.
3. Barros, S. T., OLIVEIRA, N. D., & Maia, L. C. 1995. Efeito de extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. *Summa Phytopathologica* 21:168-170.
4. Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256(12): 2166–2174.
5. Begum, M. A. J., Venudevan, B., & Jayanthi, M. 2013. Storage fungi in groundnut and the associate seed quality deterioration-a review. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)* 12(3): 127-134.
6. Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Wandjou, J. G. N., Koné-Bamba, D., Sagratini, G., ... & Caprioli, G. 2019. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. *Industrial Crops and products* 132: 377-385.
7. Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr, W. A., Borin, M. F., Lopez, R. F., & Fonseca, M. J. 2007. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International journal of pharmaceutics* 328(2): 183-190.
8. Chowdhary, K., Kumar, A., Sharma, S., Pathak, R., & Jangir, M. 2018. *Ocimum* sp.: Source of biorational pesticides. *Industrial Crops and Products* 122: 686-701.
9. da Silva, A. O., da Silva, A. O., Gomes, J. A., de Oliveira, R. C., Silva, D. A. S., & Viégas, I. D. J. M. 2021. Armazenamento de grãos na agricultura familiar: principais problemáticas e formas de armazenamento na região nordeste paraense. *Research, Society and Development*, 10 (1):e36610111835-e36610111835.
10. da Silva, F. D. A. S., de Azevedo, C. A. V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Assistance. In *7th World Congress on Computers in Agriculture Conference Proceedings, 22-24 June 2009, Reno, Nevada* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
11. Dambolena, J. S., Zunino, M. P., López, A. G., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., Mwangi, J. W., & Kariuki, S. T. 2010. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on

growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2): 410-414.

12. de Castro, J. A., Monteiro, O. S., Coutinho, D. F., Rodrigues, A. A., da Silva, J. K., & Maia, J. G. 2019. Seasonal and circadian study of a thymol/ γ -terpinene/p-cymene type oil of *Ocimum gratissimum* L. and its antioxidant and antifungal effects. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30:930-938.

13. Duh, P. D., Du, P. C., & Yen, G. C. 1999. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and chemical Toxicology* 37(11): 1055-1061.

14. Dung, P. N. T. et al. Extraction and analysis of chemical composition of *Ocimum gratissimum* L. essential oil in the North of Vietnam. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, p. 012092., 2021.

15. Dzoyem, J. P., Nganteng, D. N. D., Melong, R., Wafo, P., Ngadjui, B., Allémann, E., & Delie, F. 2021. Bioguided identification of pentacyclic triterpenoids as anti-inflammatory bioactive constituents of *Ocimum gratissimum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*: 268:113637.

16. Elisée, K. K. 2020. Total Phenolic Compounds Extraction in Leaves of *Ocimum gratissimum* L. and Their Potential Activity against Some Agricultural Contaminants. *Asian Research Journal of Agriculture*, 13 (4):1-10.

17. El-Sayed, A.M. 2018. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em:<<http://www.pherobase.com/>> Acesso em: 01 abr. 2022>

18. Faria, T. D. J., Ferreira, R. S., Yassumoto, L., Souza, J. R. P. D., Ishikawa, N. K., & Barbosa, A. D. M. 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L.(eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian archives of biology and technology* 49:867-871.

19. Galindo, L. A., de Moraes Pultrini, A., & Costa, M. 2010. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of natural medicines* 64(4): 436-441.

20. Güneş, F. E. 2013. Medical Use of Squalene as a Natural Antioxidant. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 3(4).

21. Hamma, I. I., Tafinta, I. Y., Abdulmalik, A., Theophilus, J., & Abubakar, M. 2020. Phytochemical screening and antibacterial activity of the crude extract of scent leaf (*Ocimum gratissimum*) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Plt Rese J* 5(2): 1-7.

22. Kannan, M., Kumar, T. S. & Rao, M. V. 2016. Antidiabetic and antioxidant properties of *Waltheria indica* L., an ethnomedicinal plant. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* 4(5): 1376-1384.

23. Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H. & Duru, M. E. 2003. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167.

24. Mann, A. 2012. Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) grown in Nigeria. *International Journal of plant research* 2(1): 51-58.
25. Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Ajami, M. 2017.. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, 43(6), 668-689.
26. Matos, F. 2007. *Plantas medicinais-guia de seleção e emprego de plantas medicinais usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*, Ed. UFC, Fortaleza, BR. 425p.
27. Mohr, F. B. M., Lermen, C., Gazim, Z. C., Gonçalves, J. E., & Alberton, O. 2017. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. *Genet. Mol. Res* 16(1): 1-10.
28. Nassazi, W., K'Owino, I., Makatiani, J., & Wachira, S. 2020. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of African Basil (*Ocimum gratissimum*) leaves. *Asian J Appl Chem Res*, 6(4):1-18.
29. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. 2018. NIST Chemistry WebBook. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em 20 jun. 2022
30. Nwofor, C.N. , Oyeka, C.A., Onyenwe, N.E., Fajana, A. 2021. Phytochemical analysis and in vitro screening of antifungal activity of *Jatropha multifida*, *Euphorbia hirta*, *Occimum gratissimum* and *Mitracarpus scaber* leaves extract. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 14:3, 098-112.
31. Oliveira, J. A. 1991. *Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativas L.) e pimentão (Capsicum annanum L.)*. 111f (Doctoral dissertation)–Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
32. Onaebi, C., Onyeke, C., Osibe, D., Ugwuja, F., Okoro, A., & Onyegirim, P. 2020. Antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* L. and *Carica papaya* L. against postharvest pathogens of avocado pear (*Persea americana* Mill.). *Journal of Plant Pathology* 102(2): 319-325.
33. Onyebuchi, C., & Kavaz, D. 2020. Effect of extraction temperature and solvent type on the bioactive potential of *Ocimum gratissimum* L. extracts. *Scientific reports* 10(1): 1-11.
34. Ouyang, X., Wei, L., Pan, Y., Huang, S., Wang, H., Begonia, G. B., & Ekunwe, S. I. 2013. Antioxidant properties and chemical constituents of ethanolic extract and its fractions of *Ocimum gratissimum*. *Medicinal Chemistry Research*, 22(3): 1124-1130.

35. Penido, A. B., Morais, S. M. D., Ribeiro, A. B., & Silva, A. Z. 2016. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. *Acta Amazonica* 46: 345-354.
36. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
37. Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry* 90(1-2):133-139.
38. Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280.
39. Sousa, C. M. D. M., Silva, H. R., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S. D., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., & Chaves, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova* 30: 351-355.
40. Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., & Aoumar, A. A. B. 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop protection* 35: 41-46.
41. Uchegbu, R. I.; Akalazu, J. N.; Sokwaibe, C. E. 2018. An Evaluation of the Chemical Compositions and Antifungal Activity of *Ocimum gratissimum* (Nchuanwu) Leaves against Some Plant Pathogens. *Asian Journal of Applied Chemistry Research* 1-7.
42. Venuprasad, M. P., Kandikattu, H. K., Razack, S., & Khanum, F. 2014. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. *South African Journal of Botany* 92: 151-158.
43. Wagner, H., & Bladt, S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. *Springer Science & Business Media*.
44. Zareiyan, F., & Khajehsharifi, H. 2022. In-vitro phytochemical analysis of essential oil and methanolic and hydromethanolic extracts of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 1-13.

**CAPITULO 3 – Proteção de sementes armazenadas com extratos de alfavaca-
cravo (*Ocimum gratissimum* L.)**

Autores: Juliana Trindade Lima¹ • Hildegardo Seibert França² • Antonio Fernando de Souza³

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

(2) Instituto Federal do Espírito Santo – *campus* Vila Velha, CEP 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil.

(3) Instituto Federal do Espírito Santo - *campus* Santa Teresa, CEP 29660-000, Santa Teresa, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: julianatrindade111@gmail.com

Periódico a ser submetido: Ciência e Agrotecnologia, março, 2023

RESUMO

Ocimum gratissimum L. possui metabólitos secundários com propriedades antifúngicas. Um estudo foi realizado com o objetivo de explorar o potencial fungicida de folhas dessa planta na proteção e viabilidade de sementes crioulas de feijão e milho durante a fase de armazenamento. As sementes foram adquiridas do banco de sementes do Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Santa Teresa, ES. As sementes foram submetidas ao extrato etanólico, fração diclorometano e a nanoemulsão de eugenol e armazenadas em recipientes de plásticos a temperatura ambiente. Foi realizado o teste de sanidade das sementes utilizando-se como substrato o papel de filtro, antes e após o armazenamento. Analisou-se também a influência dos extratos na germinação, índice de velocidade de germinação, primeira contagem de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento de raiz e comprimento de caule das sementes. O delineamento conduzido foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes. A diversidade fúngica identificada no teste de sanidade das sementes foi composta por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Nas sementes de feijão o tratamento com nanoemulsão de eugenol foi mais eficaz na redução da incidência dos patógenos, por outro lado, nas sementes de milho, o extrato etanólico e a fração diclorometano foram mais ativos. As sementes de feijão e milho tratadas com o extrato etanólico apresentaram 98.6 e 84.6% germinação após o armazenamento, respectivamente. A fração diclorometano e a nanoemulsão de eugenol afetaram negativamente o vigor das sementes de ambas as culturas. Os resultados indicam potencial do uso de extratos de *O. gratissimum* na preservação de sementes crioulas armazenadas.

Palavras-chave: Armazenamento • fitotóxico • fitoquímica • sanidade • vigor

ABSTRACT

Ocimum gratissimum L. has secondary metabolites with antifungal properties. A study was carried out with the objective of exploring the fungicidal potential of the leaves of this plant in the protection and viability of native bean and maize seeds during the storage phase. Seeds were purchased from the Instituto Federal do Espírito Santo seed bank, campus Santa Teresa, ES. The seeds were subjected to ethanolic extract, dichloromethane fraction and eugenol nanoemulsion and stored in plastic containers at room temperature. The seed health test was carried out using filter paper as substrate, before and after storage. The influence of extracts on germination, germination speed index, first germination count, emergence, emergence speed index, root length and stem length of seeds was also analyzed. The design conducted was completely randomized with four replications of 50 seeds. The fungal diversity identified in the seed health test was composed of fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*. In bean seeds, treatment with eugenol nanoemulsion was more effective in reducing the incidence of pathogens, on the other hand, in corn seeds, ethanolic extract and dichloromethane fraction were more active. The bean and corn seeds treated with the ethanolic extract showed 98.6 and 84.6% germination after storage, respectively. The dichloromethane fraction and the eugenol nanoemulsion negatively affected the seed vigor of both crops. The results indicate the potential of using *O. gratissimum* extracts in the preservation of stored native seeds

Keywords: Phytotoxic • phytochemistry • sanity • storage • vigor

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays L.*) e feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) tendo em 2021 produzido 105 e 2,9 milhões de toneladas, respectivamente (EMBRAPA, 2022). As sementes crioulas de feijão e milho são o patrimônio genético *in vivo*, pois não passaram por técnicas modernas de modificações genéticas (BARBOSA, et al., 2015). Estas sementes constituem a base econômica de comunidades tradicionais (ANTONELLO et al., 2009) e alimentar dos brasileiros. São altamente nutritivas, como fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (CELMELI, et al., 2018).

Em cultivos agroecológicos, estas sementes são armazenadas em garrafas de polietileno tereftalato (PET) para o uso doméstico, bem como para a formação de novos cultivos na safra seguinte. No entanto, os agricultores enfrentam dificuldades na conservação fisiológica devido às condições inadequadas de armazenamento e ao ataque de pragas e doenças (GAROFOLO et al., 2018). Altas temperaturas e umidade durante o armazenamento propiciam a proliferação de fungos comprometendo a germinação e vigor (GAROFOLO et al., 2018; LEITE et al., 2018; STEFANELLO et al., 2015). Além disso, as sementes contaminadas podem ser fonte de inóculo em novas áreas o que pode disseminar doenças no campo (SILVA et al., 2014).

O manejo de pragas com a aplicação de insumos químicos na agricultura tem sido um desafio em decorrência do uso extensivo visto que podem causar resistência de patógenos e toxicidade para organismos não alvo (LAMICHHANE et al., 2020). Assim, o uso de extratos e óleos essenciais de plantas é considerado uma alternativa ecologicamente mais segura e trabalhos têm relatado como eficazes no controle de fitopatógenos (MOHR et al., 2017; ONAEBI et al., 2020; UCHEGBU et al., 2018).

Ocimum gratissimum L. conhecida popularmente como alfavaca-cravo, é uma erva aromática com grande diversidade de compostos secundários, compostos fenólicos, flavonóides, terpenoides, ácidos graxos, taninos, alcaloides com potencial biológico (MANN, 2012; NASSAZI et al., 2020). Esta planta tem sido amplamente empregada na medicina tradicional por suas propriedades bioativas, tais como

alelopática, antioxidante, antibacteriana, citotóxica e antifúngica (ABIALLA et al., 2020; MARTENDAL et al., 2018; NASSAZI et al., 2020; OLEA et al., 2019; ONAEBI et al., 2020).

A atividade antifúngica de *O. gratissimum* foi estudada *in vitro* contra fungos de pós-colheita (FARIA et al., 2006; OLEA et al., 2019; SILVA et al., 2022). Trabalhos tem associado a ação fungicida ao componente principal do óleo, como eugenol, linalol e ácido n- hexadecanóico (FARIA et al., 2006; MOHR et al., 2017; UCHEGBU et al., 2018). Estudo preliminar desenvolvido por este grupo de pesquisa demonstrou o potencial fungicida do extrato etanólico e da fração diclorometano de folhas de *O. gratissimum* contra os fitopatógenos *Aspergillus sp.* e *Rhizopus sp.* em ensaios *in vitro*. Nesse estudo foi verificado o eugenol como composto majoritário nas amostras estudadas. Porém, nenhum trabalho, até o momento, abordou o uso dos extratos fracionados de *O. gratissimum*, bem como do eugenol puro na proteção de sementes crioulas de milho e feijão contra fungos durante o período de armazenamento.

Diante disso, objetivou-se com esse trabalho avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes crioulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays* L.) submetidas a tratamento com extratos de *O. gratissimum* a fim de identificar uma alternativa eficaz para a conservação de sementes crioulas durante o armazenamento em sistemas agroecológicos mantendo suas características originais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e identificação botânica da espécie vegetal

Folhas de *O. gratissimum* foram coletadas na Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Viana, ES. As folhas foram coletadas no período da tarde e levadas ao Laboratório de Química do Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) *campus* Vila Velha, onde permaneceram armazenadas em ultra freezer. A espécie foi identificada por pesquisadores da

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a exsicata foi depositada com o código VIES 36175 (*Ocimum gratissimum* L.) no Herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Ufes.

2.2. Preparação dos extratos

Os extratos vegetais foram preparados no Laboratório Ifes *campus* Vila Velha. As folhas coletadas foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24h e em seguida trituradas. Para a obtenção do extrato etanólico (EEtOH), as folhas foram maceradas em etanol 96%, na proporção de 1:10 (droga vegetal:etanol), à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-3 CH 9230 Flawil 1, Switzerland). O solvente recuperado foi adicionado ao resíduo das folhas e remacerado até o esgotamento total da droga vegetal. O resíduo concentrado (EEtOH) obtido foi armazenado em vidro âmbar sob refrigeração a 4°C. Para a obtenção da fração diclorometano, parte do EEtOH foi ressuspenso em mistura de etanol-água (8:2) e submetido às sucessivas partições líquido-líquido, com o solvente orgânico diclorometano (FDCM).

O eugenol puro foi preparado pelo método de nanoemulsão. A partir do óleo comercial de eugenol na proporção fixa máxima de 5% e os outros 95% eram distribuídos entre a água e os emulsificantes: 5% Óleo Eugenol + x% Emulsificantes + (95% - x%) Água = 100% Solução. Para a preparação da nanoemulsão foram utilizados os emulsificantes Polisorbato 20 (Tween 20 - EHL 16,7), polisorbato 80 (Tween 80 - EHL 15), Trioleato de sorbitano (Span 85- EHL 1,8) e monooleato de sorbitano (Span 80 - EHL 4,3) nos valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de 15, 13, 11 e 10 com variação de concentração de 20%, 15%, 10% e 5% de emulsificantes para cada um dos EHLs. Para calcular a quantidade, em gramas, de cada emulsificante (m_a e m_b), foi preciso levar em consideração o valor final de EHL (EHL_f), a porcentagem/massa de emulsificante total ($m_t = m_a + m_b$) desejado na solução, e por fim, quais são os valores de EHL dos emulsificantes utilizados (EHL_a e EHL_b): $EHL_f = (EHL_a \cdot m_a) + (EHL_b \cdot m_b) / m_a + m_b$

2.3. Obtenção das sementes e preparo das sementes crioulas

As sementes crioulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays* L.) foram oriundas do banco de sementes do Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Santa Teresa, ES. As sementes foram submetidas à imersão por 15 minutos nos seguintes produtos:

- Extrato etanólico (EEtOH) de folhas de *O. gratissimum* (5.0 mg/mL);
- Fração diclorometano (FDCM) de *O. gratissimum* (5.0 mg/mL);
- Fungicida Comercial tiofanato metílico (TM) - Cercobin[®] (Dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene) (3-thioallophanate) a 0.8 g/L (controle positivo);
- Nanoemulsão de eugenol (NE) a 2.5%;
- Água destilada (controle negativo).

Após a aplicação dos produtos, as sementes foram depositadas em bandejas plásticas para secagem natural por 24 horas. Após a secagem, as sementes foram colocadas em recipientes plásticos que foram vedados e armazenados durante 60 dias em temperatura ambiente simulando as condições de armazenamento feita em propriedades agroecológicas. As sementes foram avaliadas em dois períodos de armazenamento, após a aplicação imediata dos produtos e após os 60 dias de armazenamento.

2.4. Análise sanitária das sementes crioulas

O teste de sanidade das sementes foi realizado utilizando-se como substrato o papel de filtro, com quatro repetições de 25 sementes, distribuídas no interior de placas de Petri, sobre três folhas de papel de filtro, umedecidas com água destilada, mantidas incubadora tipo em Biological Oxygen Demand (B.O.D.) a temperatura de 25 °C, sob regime de iluminação com fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, as sementes foram levadas ao freezer permanecendo por 24 horas e depois levadas a incubadora e mantidas por 10 dias. Foram realizadas observações sob microscópio estereoscópico, para identificação dos fungos e contagem das sementes afetadas

(NEERGAARD, 1979). O resultado foi expresso em percentagem de sementes infestadas, conforme recomendações das regras de análise de sementes (BRASIL, 2009b).

2.5. Análise Fisiológica das sementes crioulas: Teor de água

Todas as análises fisiológicas foram realizadas no laboratório de Sementes e Ecofisiologia Florestal da UFES em Vitória (ES). O teor de água das sementes foi avaliado antes e após o armazenamento conforme prescrição nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009a) pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas, utilizando duas repetições de 25 sementes. O resultado foi expresso em percentagem (%) b.u. (base úmida - relação entre a massa de água presente na semente e a massa total da semente) de teor de água.

2.6. Análise Fisiológica das sementes crioulas: Germinação (G)

O Teste de germinação foi realizado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Utilizou-se quatro repetições de 25 sementes, colocadas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma folha, formando rolos que foram umedecidos com água destilada, na proporção de 2.5 partes de água por uma parte do peso do papel. Os rolos foram colocados no interior de sacos de polietileno e mantidos em B.O.D, sobre 25°C, sob regime de 12h de luz/ 12h de escuro. A avaliação das plântulas foi realizada diariamente após a instalação do teste, sendo os resultados obtidos expressos em percentagem de sementes germinadas.

2.7. Análise Fisiológica das sementes crioulas: Primeira contagem do teste de germinação (PCG)

Foi realizado concomitante com o teste de germinação, na qual a contagem das plântulas normais foi realizada no quinto dia (feijão) e quarto dia (milho) após a semeadura (BRASIL, 2009a) e os resultados expressos em porcentagem.

2.8. *Análise Fisiológica das sementes crioulas: Índice de velocidade de germinação (IVG)*

O Índice de velocidade de germinação (IVG) também foi analisado durante a realização do teste de germinação, avaliando-se todos os dias, a partir do dia em que as primeiras sementes emitiram radícula até o dia da última contagem estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). Para o cálculo foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G1}{T1} + \frac{G2}{T2} + \dots + \frac{Gi}{Ti}$$

Em que, IVG é o índice de velocidade de germinação; G1 até Gi é o número de plântulas germinadas a cada dia; T1 até Ti é o tempo em dias.

2.9. *Análise Fisiológica das sementes crioulas: Emergência de plântulas (E)*

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes, semeadas em células individuais, com substrato “areia”, em recipientes de isopor colocadas em sala de germinação. A avaliação foi feita aos 12 dias após a semeadura, considerando as plântulas emergidas presentes, expressando-se o resultado em porcentagem.

2.10. *Análise Fisiológica das sementes crioulas: Índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE)*

Feito em conjunto com o teste de emergência de plântulas, a contagem foi realizada diariamente, a partir da primeira plântula até o décimo dia, última contagem estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado segundo Maguire (1962):

$$IVE = \frac{E1}{T1} + \frac{E2}{T2} + \dots + \frac{Ei}{Ti}$$

Em que,

IVE é índice de velocidade de emergência; E1 até Ei é o número de emergências ocorridas a cada dia; T1 até Ti é o tempo em dias.

2.11. *Análise Estatística*

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5x2 (cinco produtos e dois períodos de armazenamento, respectivamente). Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativa optou-se pelo desdobramento da interação produtos x períodos de armazenamento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% ($p < 0.05$). Quando não significativa a interação procedeu-se a análise do fator isolado. A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa computacional RStudio versão 3.4.2 . O teor de água não foi submetido à análise estatística.

3. RESULTADOS

3.1. *Análise sanitária de sementes crioulas*

A qualidade sanitária das sementes crioulas de feijão e milho foi realizada para verificar em todos os tratamentos a presença de fungos. Foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. em ambas as sementes, diferindo entre si em quantidade (Figura 1).

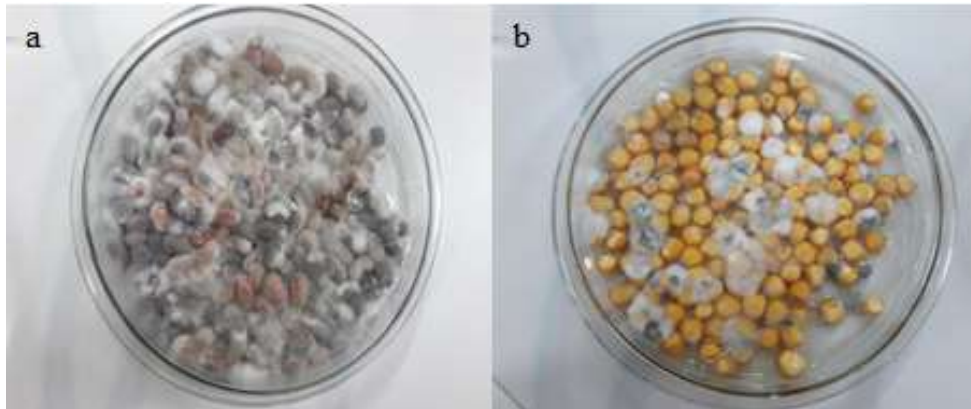


Figura 1: Incidência de fungos em sementes crioulas de feijão (a) e milho (b).

Constatou-se interação produtos x períodos de armazenamento nas sementes de feijão crioulo para os gêneros de fungos avaliados (Figura 2-a-c-e). Todos os tratamentos com produtos naturais e sintéticos foram eficientes em reduzir a incidência de *Aspergillus* sp., diferenciando-se do controle negativo, apesar do aumento da incidência desses fungos após o armazenamento das sementes (Figura 2-a). No período zero, a nanoemulsão de eugenol foi o produto mais eficiente no controle do fitopatógeno com apenas 4,4% de infestação quando comparado aos demais produtos, inclusive ao fungicida (11,5%) (Figura 2-a). Porém, após aos sessenta dias, o efeito fungitóxico da nanoemulsão de eugenol (11,1%) foi semelhante ao do cercobin (16,0%) e superior ao EEtOH (32,0%) e à FDCM (24,0%) (Figura 2-a). Aos sessenta dias o efeito dos produtos sobre o *Penicillium* sp. foi mais proeminente com a aplicação do fungicida (1,5%), seguido da nanoemulsão do eugenol (8,3%), FDCM (20,0%) e EEtOH (27,8%) (Figura 2-c).

As sementes de feijão submetidas ao tratamento com o fungicida sintético, EEtOH e com a nanoemulsão de eugenol apresentaram reduções na proliferação de *Rhizopus* sp. nos dois períodos de armazenamento quando comparado ao controle negativo (Figura 2-e). Porquanto a FDCM interferiu no crescimento desse fitopatógeno somente após o armazenamento com 5,6% de infestação, obtendo efeito semelhante ao fungicida (6,0%) e ao EEtOH (3,1%), produtos que proporcionaram reduções mais acentuadas em relação à nanoemulsão de eugenol (11,5%) e ao controle negativo (35,0%).

Na análise da infestação do *Aspergillus* sp. em sementes de milho crioulas, apenas a nanoemulsão de eugenol não apresentou efeito inibidor do crescimento do fungo no período zero, assemelhando-se ao controle negativo (Figura 2-b). Porém, após os 60 dias de armazenamento, houve redução da incidência do patógeno com a aplicação de todos os produtos, nos quais os menores índices de infestação foram obtidos no EEtOH (40,4%), seguido da FDCM (43,0%), fungicida (61,3%) e da nanoemulsão de eugenol (66,5%) (Figura 2-b).

O EEtOH e a FDCM foram os únicos produtos, antes do armazenamento, que obtiveram decréscimos na infestação por *Rhizopus* sp. nas sementes de milho com 2,7 e 1,3 %, respectivamente, diferindo do controle negativo (2,1%) (Figura 2-f). O armazenamento acarretou na proliferação desse microrganismo em todos os produtos, exceto da nanomeulsão de eugenol (9,0%) que, por sua vez, houve decréscimo, com resultado semelhante ao EEtOH (14,7%) e à FDCM (3,4%). Nenhum produto diferiu do controle negativo na inibição do crescimento de *Penicillium* sp. (Figura 2-d).

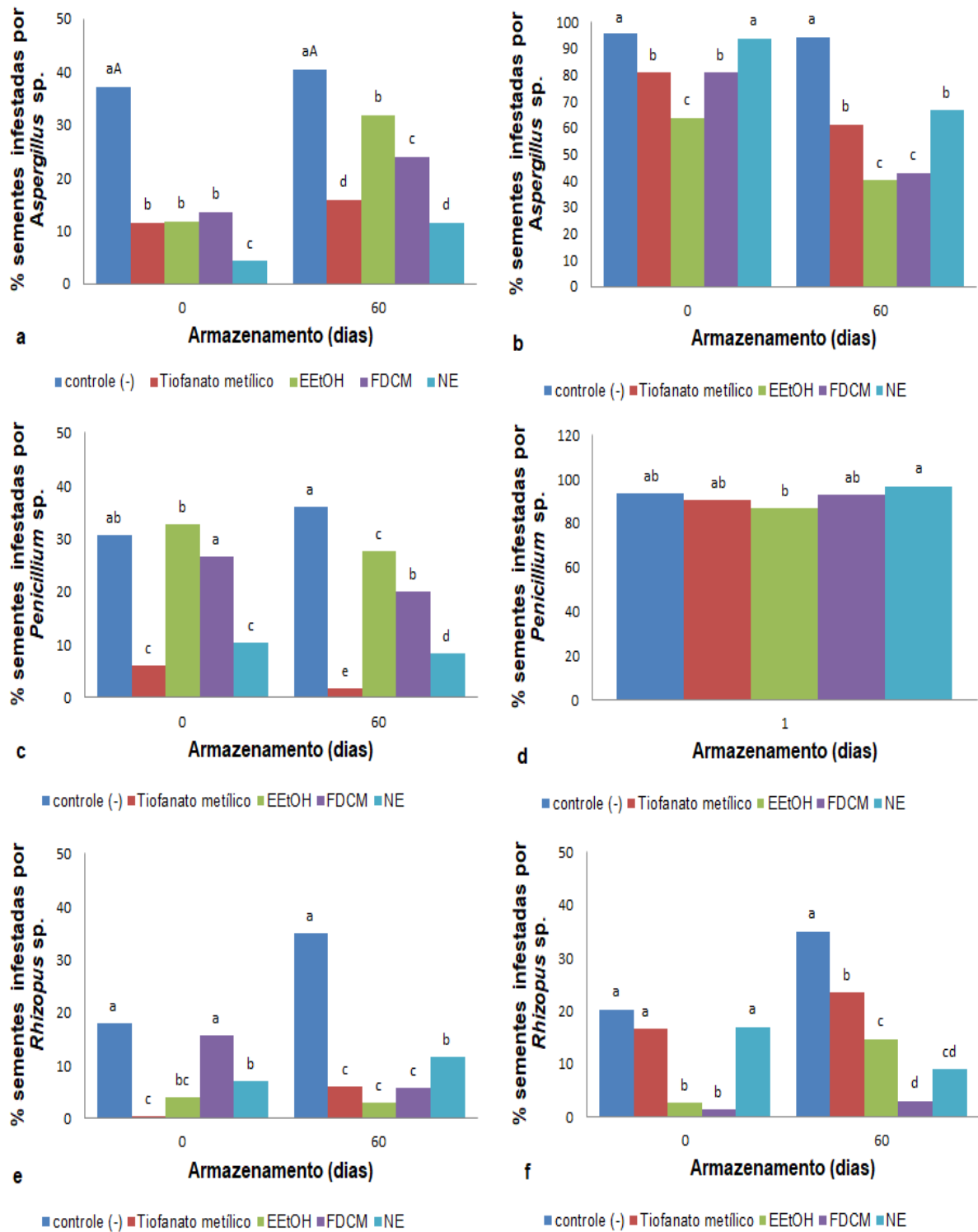


Figura 2: Incidência de fungos (%) em sementes crioulas de feijão (a-c- e) e milho (b-d-f) submetidas ao tratamento com diferentes produtos e armazenadas no pré e pós- armazenamento (0 e 60 dias). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, para cada produto. EEtOH= extrato etanólico, Tiofanato metílico = fungicida sintético, FDCM = fração diclorometano, NE=nanoemulsão de eugenol.

3.2. Análise fisiológica de sementes crioulas

O teor de água das sementes crioulas de feijão e milho tratadas com produtos naturais e sintéticos foi determinado para avaliar as condições de armazenamento. As sementes de feijão foram armazenadas com teor de água inicial entre 7,3 e 8,4 b.u. % (Figura 3-a) e as sementes de milho, por sua vez, entre 11,7 e 13,2 b.u.% (Figura 3- b). Não foram observadas diferenças no grau de umidade das sementes em função dos produtos aplicados, no entanto após o armazenamento houve um aumento do teor de água nas sementes de feijão (Figura 3-a).

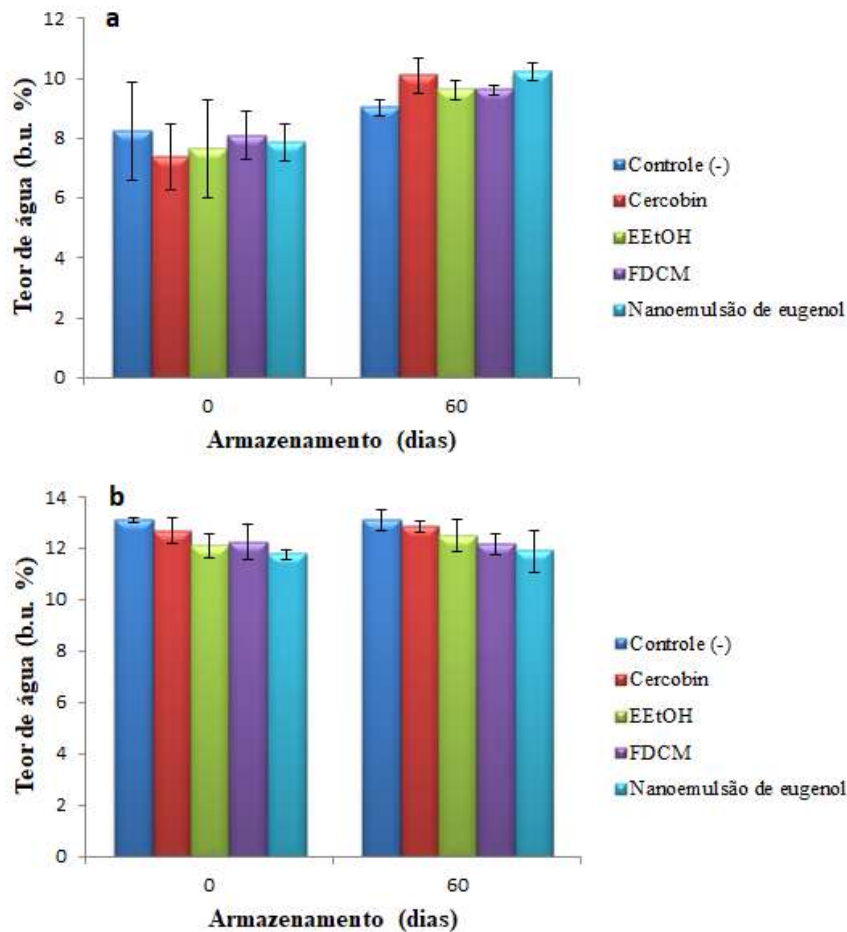


Figura 3: Teor de água (b.u.%) de sementes crioulas de feijão (a) e milho (b) armazenadas no pré e pós-armazenamento (0 e 60 dias)

Os resultados dos ensaios de germinação utilizando cinco produtos (água, fungicida sintético, extrato etanólico, fração diclorometano e nanoemulsão de eugenol) aplicados em sementes crioulas de feijão e milho e avaliados em dois

períodos distintos de armazenamento, zero e sessenta dias, são apresentados na Tabela 1. As interações significativas mostram que os efeitos dos produtos dependeram do armazenamento das sementes.

Houve efeito da interação produtos x tempo de armazenamento das sementes de feijão para as variáveis analisadas (Tabela 1). As sementes de feijão apresentaram respostas semelhantes em relação à germinação (G) para todos os tratamentos com valores entre 92 e 99%. Somente a nanoemulsão exibiu um efeito inferior quando comparado com os outros tratamentos no período anterior ao armazenamento (Tabela- 1).

Para o índice de velocidade de germinação (IVG), somente o EEtOH obteve índice superior ao controle negativo no período zero de armazenamento e, após este tempo, os produtos EEtOH (51,1%), FDCM (51,6%) e a nanoemulsão de eugenol (49,8%) proporcionaram resultados superiores ao fungicida (46,0%) assemelhando-se do controle negativo (52,2%) (Tabela 1).

Em relação ao comprimento de raiz, houve uma tendência de aumento após o armazenamento com as maiores médias para o EEtOH (15,1 cm) e a FDCM (12,8), a nanoemulsão de eugenol, por sua vez, exibiu a menor média com 10.4 cm comparado ao controle negativo (11,53 cm) (Tabela-1).No entanto, houve decréscimo de comprimento do caule após o armazenamento, mas os maiores valores de comprimento de caule foram observados no EEtOH (8,4cm), na FDCM (8,0 cm) e no fungicida (7,6 cm) (Tabela- 1).

Quanto à PCG e E, não houve efeito da interação produtos x tempo de armazenamento, logo procedeu-se a análise dos fatores isolados. O EEtOH e o cercobin exibiram as maiores médias da PGC com 89,2% e 88,0%, respectivamente. Em contrapartida, a FDCM e a nanoemulsão de eugenol registraram reduções, especialmente a nanoemulsão (68,4%). Resultados similares também foram obtidos na variável E. Nota-se decréscimos no IVE após o armazenamento em todos os produtos aplicados, com os menores valores para a nanoemulsão de eugenol (19,7) e a FDCM (21,4), em contrapartida, o EEtOH e o fungicida apresentaram as maiores médias com 33,0 e 33,3; respectivamente (Tabela- 1).

Tabela 1: Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Primeira contagem de germinação (PCG), Emergência (E), Índice de velocidade de emergência (IVE), Comprimento de raiz (Raiz), Comprimento de caule (Caule) de acordo com os tratamentos em cada tempo de armazenamento de sementes de feijão e milho crioulas.

Tratamentos em sementes de feijão	G (%)		IVG		IVE		Raiz (cm)		Caule (cm)		*PCG (%)	*E (%)
	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)		
Controle (-)	96.0 ^a	97.1 ^a	37.3 ^b	27.0 ^b	37.3 ^b	27.0 ^b	8.7 ^c	1.53 ^{bc}	8.0 ^c	6.4 ^b	83.3 ^{ab}	83.4 ^{ab}
Tiofanato metílico	99.3 ^a	98.0 ^a	42.8 ^a	30.3 ^{ab}	42.8 ^a	30.3 ^{ab}	11.5 ^b	12.0 ^{bc}	3.2 ^d	7.6 ^{ab}	88.0 ^a	88.3 ^a
EEtOH	97.0 ^a	98.6 ^a	43.7 ^a	33.0 ^a	43.7 ^a	33.0 ^a	14.2 ^a	15.1 ^a	13.7 ^a	8.4 ^a	89.2 ^a	89.2 ^a
FDCM	96.7 ^a	98.1 ^a	26.6 ^c	21.4 ^c	26.6 ^c	21.4 ^c	12.0 ^a	12.8 ^b	10.9 ^b	8.0 ^a	75.0 ^{bc}	75.0 ^{bc}
NE	92.8 ^b	97.0 ^a	44.5 ^c	49.8 ^a	24.3 ^c	19.7 ^c	8.0 ^c	10.4 ^c	7.8 ^c	7.1 ^b	68.4 ^c	68.3 ^c

Tratamentos em sementes de milho	G (%)		IVG		PCG (%)		Raiz (cm)		Caule (cm)		*E (%)	IVE*
	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)	Antes (T=0)	Após (T=60)		
Controle (-)	80.7 ^a	78.5 ^{ab}	31.8 ^b	27.5 ^a	38 ^{ab}	50.6 ^a	9.9 ^c	19.1 ^b	8.0 ^a	9.2 ^b	82.6 ^a	18.0 ^b
Tiofanato metílico	77.3 ^a	62.7 ^c	39.5 ^a	8.6 ^b	43.3 ^{ab}	40.6 ^b	16.6 ^b	24.7 ^a	7.4 ^a	6.7 ^c	76 ^a	15.5 ^b
EEtOH	82.0 ^a	84.6 ^a	27.8 ^b	10.4 ^b	44 ^a	42.7 ^{ab}	19.6 ^a	24.3 ^a	7.6 ^a	10.4 ^a	77 ^a	20.4 ^a
FDCM	62.7 ^b	78.0 ^{ab}	22.0 ^c	9.2 ^b	34 ^b	45.3 ^{ab}	15.9 ^b	20.6 ^b	8.2 ^a	11.2 ^a	79 ^a	19.8 ^a
NE	51.40 ^c	75.0 ^b	14.1 ^d	7.1 ^b	15.3 ^c	20.0 ^c	7.7 ^d	15.6 ^c	3.8 ^b	8.4 ^b	71 ^a	14.7 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. T=Tempo de armazenamento, EEtOH= extrato etanólico, Tiofanato metílico = fungicida sintético, FDCM = fração diclorometano, NE= nanoemulsão de eugenol.*interação não significativa

4. DISCUSSÃO

Fungos de armazenamento são prevalentes em sementes crioulas de feijão e milho (PINTO et al., 2021; STEFANELLO et al., 2015). A pesquisa atual constatou a presença de populações fúngicas de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. em ambas as sementes crioulas, porém em frequências distintas (Figura- 2). A alta infecção fúngica durante o armazenamento, provavelmente decorreu pelo aumento da disponibilidade de nutrientes e de água nas sementes (BHATTACHARYA; RAHA, 2002). O teor de água dessas sementes crioulas de milho antes do armazenamento estava acima de 13%, o que possivelmente favoreceu a atividade de fungos de armazenamento (NASCIMENTO; MORAES, 2011).

Aspergillus sp. e *Penicillium* sp. são patógenos que indicam deterioração em sementes por degradação de lipídios, proteínas e carboidratos, produção de micotoxinas, assim reduzem o potencial de germinação, vigor e o tempo de estocagem (BEGUM et al., 2013; REVERBERI et al., 2010). Por isso é necessário formular produtos naturais que mantenham a eficácia na proteção de sementes durante o armazenamento.

A aplicação dos extratos EEtOH e FDCM foi eficaz em reduzir a incidência de *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. (Figura- 2) nas sementes crioulas de milho corroborando com estudo preliminar *in vitro* dessa pesquisa. Nas sementes de feijão, a nanoemulsão de eugenol apresentou a maior redução na proliferação de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nos dois períodos avaliados (Figura- 2). A atividade antifúngica avaliada pode ser atribuída aos fitoquímicos, compostos fenólicos e terpenóides que os constituem os extratos e foram rastreados em estudo prévio desta pesquisa, e que já foram documentados na literatura com ação antifúngica *in vitro* (ELISÉE et al., 2020; MOHR et al., 2017).

O eugenol é um fenilpropanoide constituinte do óleo essencial de *O. gratissimum*, no trabalho prévio desta pesquisa foi detectado componente majoritário em ambos os produtos naturais, EEtOH e FDCM. Na literatura já foi relatada a ação desse fitoquímico contra alguns fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum lindemuthianum* (SILVA et al., 2022), *Botryosphaeria rhodina*;

Rhizoctonia sp. e *Alternaria* sp. (FARIA et al., 2006), *Botrytis Cinerea* (OLEA et al., 2019).

Diante disso, os resultados do presente estudo indicam que os extratos de *O. gratissimum* tem potencial fungicida no controle de fungos de armazenamento mediado pelo eugenol que pode estar atuando sinergicamente com outros fitoquímicos (MANN, 2012; NGUEFACK et al., 2012) e/ou estimulando o sistema de defesa das sementes de feijão e milho contra os fitopatógenos, o que justificaria mecanismo de ação distintos nas espécies vegetais contra os fungos testados (COLPAS et al., 2009). O mecanismo antifúngico do eugenol está relacionado à ruptura da membrana celular plasmática, à alteração do transporte de íons e ATP e à inibição da produção de toxinas (ULANOWSKA; OLAS, 2021).

Nessa pesquisa, o EEtOH não afetou a G das espécies vegetais avaliadas nos dois períodos de armazenamento (Tabela- 1). Os resultados corroboram com aqueles obtidos por Araujo et al. (2018), que não observaram efeitos na germinação com aplicação de extrato de *O. gratissimum* em sementes orgânicas de tomates cereja (*Lycopersicon esculentum* Mill), e por Silva (2021), no feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). Possivelmente pela ação antifúngica do extrato impedindo alterações bioquímicas causadas pelos fungos, o que prejudicaria a germinação (ABIALA et al., 2020; BHATTACHARYA; RAHA, 2002; SILVA, 2021). Além disso, a capacidade antioxidante do EEtOH de *O. gratissimum* verificada no trabalho preliminar realizado por este grupo de pesquisa, poderia estar impedindo reações oxidativas, o causaria a degradação de biomoléculas fundamentais para o processo de germinação (LI et al., 2022).

Entretanto, a G foi reduzida com a exposição imediata das sementes de milho à FDCM e à nanomeulsão de eugenol, que por sua vez, também acarretou em decréscimos na G das sementes de feijão, embora esse efeito tenha sido mitigado após o armazenamento (Tabela-1). Na literatura já foi descrita a fitotoxicidade de *O. gratissimum* observado em outras espécies *Euphorbia heterophylla* (MARTENDAL et al., 2018) e *Lactuca sativa* L. (MIRANDA et al., 2015), porém o estudo alelopático e a concomitante proteção do EEtOH, da FDCM e nanoemulsão de eugenol em sementes de feijão e milho crioulas na pós-colheita ainda não foi documentado.

O IVG é um parâmetro utilizado para determinação do vigor das sementes. Nesse estudo, o IVG das sementes de milho apresentou decréscimos no armazenamento com a aplicação de todos os produtos (EEtOH, FDCM e a nanoemulsão de eugenol). No feijão, por sua vez, somente a nanoemulsão de eugenol afetou o IVG, mas a FDCM também interferiu negativamente nas variáveis PCG, E e IVE. Estes resultados indicam efeito alelopático, principalmente pelos produtos FDCM e nanoemulsão de eugenol, sendo o milho a cultura mais suscetível ao potencial alelopático de *O. gratissimum* durante a estocagem concordando com Ighodaro et al. (2010) que constataram efeito alelopático de *O. gratissimum* nas sementes de feijão e milho comerciais. Na pesquisa atual, a diferença na toxicidade das culturas para os extratos pode ser devido à presença do tegumento da semente que atua como uma barreira entre o embrião e seu ambiente circundante, e a permeabilidade seletiva dos tegumentos da semente que pode proteger a atividade inibitória de compostos fitotóxicos (ISLAM; NOGUCHI, 2014).

O efeito alelopático dos extratos de *Ocimum* pode estar relacionado aos flavonoides e terpenóides (IGHODARO et al., 2018; MARTENDAL et al., 2018; MIRANDA et al., 2015). Verificou-se, no estudo atual, redução do crescimento aéreo e radicular com a aplicação da nanoemulsão de eugenol nas duas sementes; e esse efeito foi mantido nas raízes de milho após os sessenta dias de armazenamento. Miranda et al. (2015), verificaram decréscimos na germinação, no IVG e nos comprimentos das plântulas (parte aérea e raiz) de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas ao óleo essencial de *O. gratissimum* e ao seu componente principal (eugenol), que exibiu efeito mais acentuado corroborando com a atual pesquisa.

Por outro lado, em outro estudo o efeito alelopático de *O. gratissimum* foi correlacionado a bioatividade de flavonoides, o que diverge do presente estudo (IGHODARO et al., 2010). Pelos resultados observados, o potencial alelopático do EEtOH e da FDCM de alfavaca-cravo pôde ser atribuído parcialmente ao eugenol. Esse fitoquímico pode modificar a permeabilidade da membrana celular e alterar a atividade respiratória associada ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial reduzindo a energia do processo de germinação e crescimento das plântulas (MARTENDAL et al., 2018).

Para ser considerado um potencial agente de biocontrole é importante que o extrato com atividade contra um patógeno não exiba quaisquer efeitos fitotóxicos na semente/plântula. Na pesquisa atual, o EEtOH foi eficaz em manter a qualidade fisiológica das sementes de feijão durante o armazenamento. Além disso, estimulou o crescimento radicular e aéreo de ambas as plantas nos dois períodos avaliados corroborando com ABIALA et al. (2020) que verificaram melhora na G e crescimento de plântulas de milho tratadas com extratos aquosos de *O. gratissimum* indicando que a resposta do EEtOH na presente pesquisa ocorreu possivelmente pela baixa concentração e proporção dos fitoquímicos (MARTENDAL et al., 2018; MEKKY et al, 2019; SILVA, 2021). Por outro lado, a FDCM e a nanoemulsão do eugenol apresentaram efeito alelopático em ambas as sementes. Cabe ressaltar, que o efeito inibidor da nanoemulsão do eugenol foi mantido nos dois períodos de estocagem, o que é esperado, uma vez que, que sua formulação tem maior estabilidade físico-química e eficácia biológica de compostos bioativos (LUO et al., 2020).

5. CONCLUSÕES

De maneira geral, por meio dos resultados obtidos, pode-se inferir que o EEtOH de *O. gratissimum* é uma alternativa viável na proteção de sementes crioulas durante o armazenamento contra fungos, mantendo a germinabilidade das sementes devido à presença do eugenol e outras substâncias com propriedades fungicidas em sua composição. Além disso, sua capacidade antioxidante também pode ter contribuído para a manutenção da viabilidade das sementes. Este extrato é um produto biodegradável e pode ser uma solução para resistências de patógenos no campo, principalmente em agriculturas orgânicas. No entanto, ainda é necessário trabalho adicional para investigar nanoemulsões do extrato e frações de *O. gratissimum* que podem melhorar e prolongar a bioatividade deste extrato.

6. REFERÊNCIAS

ABIALA, M.A. et al. Combined Effects of *Ocimum gratissimum* and Soil-borne Phytopathogenic Fungi on Seedling Growth of Quality Protein Maize. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 23, n.3, p.25-32, 2020.

ANTONELLO, L.M. et al. Influência do tipo de embalagem na qualidade fisiológica de sementes de milho crioulo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.75-86, 2009.

ARAUJO, E. F. et al. Physiological and sanitary quality of organic tomato seeds treated with clove basil extracts. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 1, p. 26-33, 2018.

BARBOSA, V. L.; VIDOTTO, R. C; ARRUDA, T. P. Erosão Genética e Segurança Akimantar. In: **Anais do SICI –Simpósio Internacional De Ciências Integradas**, Campus Guarujá, Artigo, p.03, 2015.

BEGUM, M. A. J.; VENUDEVAN, B.; JAYANTHI, M. Storage fungi in groundnut and the associate seed quality deterioration-a review. **Plant Pathology Journal (Faisalabad)**. 12(3): 127-134, 2013.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009b. 200p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

CELMELI, T. et al., The nutritional content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *landraces* in comparison to modern varieties. **Agronomy**, v. 8, n. 9, p. 166, 2018.

COLPAS, F.T. et al. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (*Lamiaceae*) leaf extracts. **Summa phytopathologica**, v. 35, p. 191-195, 2009.

ELISÉE, K. K. et al., Total Phenolic Compounds Extraction in Leaves of *Ocimum gratissimum* L. and Their Potential Activity against Some Agricultural Contaminants. **Asian Research Journal of Agriculture**, v. 13, n. 4, p. 1-10, 2020.

EMBRAPA. **O Agro no Brasil e no Mundo**, n. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/26187851/O+agro+no+Brasil+e+no+mundo/098fc6c1-a4b4-7150-fad7-aaa026c94a40>>. Acesso em: 03 dez. 2022.

FARIA, T. D. J et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L.(eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, p. 867-871, 2006.

GAROFOLO, A.C.S.; RISSO, I.A.M.; BARBOSA, D. Conservação on farm de variedades crioulas em bancos familiares localizados em assentamentos rurais em território da cidadania no estado do Rio de Janeiro. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

IGHODARO, O.; AGUNBIADÉ, S.; AKINTOBI, O. Phytotoxic and anti-microbial activities of flavonoids in *Ocimum gratissimum*. **Life Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 45-48, 2010.

ISLAM, A.K.M.; KATO-NOGUCHI, H. Phytotoxic activity of *Ocimum tenuiflorum* extracts on germination and seedling growth of different plant species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LAMICHHANE, J. R. et al. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, p. 610-623, 2020.

LEITE, K. et al. Óleos essenciais no tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. durante o armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 2, p. 186-199, 2018.

Li, W. et al. Advances in the Understanding of Reactive Oxygen Species-Dependent Regulation on Seed Dormancy, Germination, and Deterioration in Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 291, 2022.

LUO, Y.; WANG, Q.; ZHANG, Y. Biopolymer-based nanotechnology approaches to deliver bioactive compounds for food applications: a perspective on the past,

present, and future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12993-13000, 2020.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MANN, A. Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) grown in Nigeria. **International Journal of plant research**, v. 2, n. 1, p. 51-58, 2012.

MARTENDAL, C.O.; MANTOVANELLI, G.C.; REIS, B.; CAVALEIRO, C.; IWAMOTO, E.L.I.; BONATO, C.M. Effects of *Ocimum gratissimum* L. extract on the germination, respiration and growth of *Euphorbia heterophylla* L. **Allelopathy Journal**, v. 45, n. 1, p. 29-44, 2018.

MEKKY, M.S.; HASSANIEN, A.M.A.; KAMEL, E.M.; ISMAIL, A.E.A. Allelopathic effect of *Ocimum basilicum* L. extracts on weeds and some crops and its possible use as new crude bio-herbicide. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 2, p. 211-221, 2019.

MIRANDA, C.A.S.F et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 1783-1797, 2015.

MOHR, F. B.M. et al.,. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genet. Mol. Res**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

NAKAGAWA, J. et al. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: **ABRATES**, v. 1, p. 1-24, 1999.

NASCIMENTO, W M.O.; MORAES, M.H.D. Fungos associados a sementes de açaí: efeito da temperatura e do teor de água das sementes durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 415-425, 2011.

NASSAZI, W. et al. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of African Basil (*Ocimum gratissimum*) leaves. **Asian J Appl Chem Res**, v. 6, n. 4, p. 1-18, 2020.

- NEERGAARD, P. Seed pathology. **London: Macmillan Press**, 1979. v. 1.
- NGUEFACK, J. et al E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.
- OLEA, A.F. et al. Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis cinerea*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1239, 2019.
- ONAEBI, C. et al P. Antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* L. and *Carica papaya* L. against postharvest pathogens of avocado pear (*Persea americana* Mill.). **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n.2, p. 319-325, 2020.
- PINTO, K. M.; DE NORONHA, D. A.; MOSSER, L. M. Qualidade sanitária de sementes crioulas de feijão no agreste de Pernambuco. **Brazilian Journal of Agroecology and Sustainability**, v.2, n.1, p.153-167, 2021.
- REVERBERI, M.; RICELLI, A.; ZLALIC, S.; FABBRI, A.A.; FANELLI, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 899-911, 2010.
- RSTUDIO Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. 2020.
- SILVA, A.A. et al. Inhibition of anthracnose symptoms in common bean by treatment of seeds with essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Syzygium aromaticum* and eugenol. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-10, 2022.
- SILVA, C. M. Extratos naturais na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijão-caupi. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021. 82 f.
- SILVA, M. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão-comum produzidas no norte de Minas Gerais. **Revista Agro Ambiente**, v.8, p.97-103, 2014.

STEFANELLO, R. et al Physiological and sanitary qualities of maize landrace seeds stored under two conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 339-347, 2015.

UCHEGBU, R.I.; AKALAZU, J.N.; SOKWAIBE, C E. An Evaluation of the Chemical Compositions and Antifungal Activity of *Ocimum gratissimum* (Nchuanwu) Leaves against Some Plant Pathogens. **Asian Journal of Applied Chemistry Research**. p. 1-7, 2018.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and prospects for the application of eugenol-A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.